

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO (DGE)
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ELLEN DE SOUSA SILVA

Bases bioquímicas e funcionais dos mecanismos de resistência do ensitrelvir e nirmatrelvir contra polimorfismos naturais protease principal de SARS-CoV-2.

SÃO CARLOS

2024

ELLEN DE SOUSA SILVA

Bases bioquímicas e funcionais dos mecanismos de resistência do ensitrelvir e nirmatrelvir
contra polimorfismos naturais protease principal de SARS-CoV-2.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Carlos como
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Dr. Andre Schutzer Godoy

Coorientadora: Profa. Dra. Andrea Soares da
Costa Fuentes

SÃO CARLOS

2024

Á Deus, por permitir tudo isso.

Aos meus pais, Maria e Francivaldo, por me permiterem concretizar esse sonho.

Aos meus irmãos, Érica e Ricardo, por serem suporte e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo, apoio incansável e por sonharem junto comigo. Vocês são meu alicerce e a razão de eu nunca desistir.

Ao Prof. Dr. Galucius Oliva, gostaria de expressar minha gratidão por ter disponibilizado o espaço em seu laboratório para a realização deste trabalho.

À Gabriela Dias Noske, pelos ensinamentos, paciência e momentos memoráveis vividos dentro e fora do laboratório.

À Isabela Dolci, agradeço de coração por abrir uma porta de oportunidades para mim, pela sua companhia inestimável no laboratório e por embarcar comigo nas aventuras científicas.

Aos meus professores, expressei meu reconhecimento por suas lições valiosas, dedicação e pela inspiração que proporcionaram ao longo de minha jornada na graduação.

Aos meus amigos, Giovanni Oliveira e Wesley Santos por cada memória que construímos, pelo suporte e por sempre acreditarem em mim. Vocês foram fundamentais nessa trajetória.

As minhas amigas, Isabela Costa, Nicolle Vieira e Maria Bertazzo, com quem compartilhei a casa e a vida durante esses anos. Obrigada pela amizade, risadas, desabafos e companheirismo.

As minhas amigas de longa data, Jéssica Gonçalves e Marinêz Campos, pelo incentivo desde a escolha do curso até agora, pelas incontáveis memórias e por se fazerem presentes mesmo com a distância.

Aos demais pesquisadores do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) e Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CIBFar) que contribuíram também para a realização desse trabalho, meus profundos agradecimentos.

E principalmente, ao meu orientador, Dr. Andre Schutzer Godoy, pela orientação, inspiração, pela oportunidade de integrar a um laboratório, pelos ensinamentos valiosos e por me possibilitar viver experiências incríveis deste universo da pesquisa.

RESUMO

A pandemia causada pelo SARS-CoV-2 trouxe diversos desafios para a sociedade, afetando social e economicamente o mundo. Após os primeiros casos de COVID-19 registrados na China, o vírus se disseminou rapidamente, levando milhões de pessoas à morte. Devido à propagação acelerada do vírus, a comunidade científica de diversos países se voltou para o desenvolvimento de vacinas e antivirais, o que ocasionou na rápida aprovação de vários candidatos vacinais. Mesmo no contexto da existência da vacina, faz-se necessária e imprescindível a busca por alternativas terapêuticas, como os antivirais, visto que a cobertura e eficácia vacinal sugerem que casos de COVID-19 ainda continuarão a acontecer. A principal protease viral (M^{pro}) é uma enzima chave para o ciclo viral e um dos alvos mais promissores para o desenvolvimento de medicamentos. Os inibidores de M^{pro} , nirmatrelvir e ensitrelvir, demonstram um potencial significativo no tratamento da infecção viral. Apesar de suas altas eficiências contra a M^{pro} do tipo selvagem, ainda se sabe muito pouco sobre como as mutações no sítio ativo da enzima poderiam gerar resistências a esses antivirais. Nesse contexto, identificamos aqui em bancos de dados genômicos quatorze mutações que existem no raio de ação do nirmatrelvir e ensitrelvir, e podem afetar sua atividade. Utilizando biologia molecular e técnicas bioquímicas, produzimos a versão recombinante de todos esses mutantes únicos. Todas as proteínas foram purificadas utilizando técnicas padrão. Realizamos caracterização cinética enzimática para todos os mutantes M^{pro} e comparamos com o tipo selvagem. Além disso, testamos a potência dos antivirais contra cada um dos mutantes para identificar possíveis mutantes resistentes. O nirmatrelvir manteve sua eficácia contra a maioria dos polimorfismos avaliados, embora os mutantes Q189K e G143S apresentaram resistência significativa, com aumento de K_i de 16,4 e 147,7, respectivamente, quando comparados com o tipo selvagem. Em relação ao ensitrelvir, observou-se uma diminuição das constantes de inibição para os polimorfismos M49I, G143S e R188S, mas não para o Q189K, indicando um padrão de resistência diferenciado entre os inibidores. Assim, estes resultados são cruciais tanto para o acompanhamento do surgimento de variantes resistentes do SARS-CoV-2 quanto para a elaboração de estratégias de tratamento mais eficazes, caso essas mutações evoluam para variantes de preocupação.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – **A)** Representação das proteínas estruturais do SARS-CoV-2. **B)** Esquema do genoma viral do SARS-CoV-2 e da poliproteína viral pp1ab, com setas indicando os sítios de clivagem de cada uma das proteases virais..... 10
- Figura 2** – **A)** Estrutura 3D da Main-protease ou M^{pro} do SARS-CoV-2 (PDB: 6Y2E, DAI et al., 2020). **B)** Representação dos três domínios da protease.. 11
- Figura 3** - Ilustração do princípio por trás do ensaio de protease M^{pro} baseado em FRET.. 18
- Figura 4** – **A)** Modelo M^{pro} mostrando variantes identificadas no banco de dados genômico, utilizando um limite de $n \geq 10$. **B)** Representação da distância e interações mais próximas das mutações selecionadas com o composto nirmatrelvir. **C)** Representação da distância e interações mais próximas das mutações selecionadas com o composto ensitrelvir..... 19
- Figura 5** – Cromatogramas correspondentes a purificação da M^{pro} selvagem. **A)** Etapa de cromatografia por exclusão molecular. **B)** Etapa de cromatografia de troca iônica..... 21
- Figura 6** – SDS-PAGE das etapas de purificação. **A)** Etapas do processo de purificação. **B)** Cromatografia de troca iônica. 21
- Figura 7** – Gráficos de cinética enzimática. **A)** Gráficos de Michaelis-Menten referentes a enzima selvagem e mutantes M49T, M49I, N142S, N142D, G143S, M165I, R188S e R188K. **B)** Gráficos de Michaelis-Menten referentes a enzima selvagem e mutantes Q189K, T190I, A191T, A191V, A193V, A193S e A193T. As barras de erros apresentadas correspondem ao desvio padrão das triplicatas.....22
- Figura 8** – **A)** Gráfico referente as eficiências catalíticas relativas dos mutantes e enzima selvagem frente ao substrato fluorogênico. **B)** Gráfico de constante de inibição para o nirmatrelvir e ensitrelvir contra o painel de mutantes e enzima selvagem..... 23
- Figura 9** – Gráficos da curvas dose-resposta. **A)** Gráficos dose-reposta de nirmatrelvir contra enzima selvagem e mutantes M49T, M49I, N142S, N142D, G143S, M165I, R188S e R188K. **B)** Gráficos dose-reposta de nirmatrelvir contra a enzima selvagem e mutantes Q189K, T190I, A191T, A191V, A193V, A193S e A193T. **C)** Gráficos dose-reposta de ensitrelvir contra enzima selvagem e mutantes M49T, M49I, N142S, N142D, G143S, M165I, R188S e R188K. **D)** Gráficos dose-reposta de ensitrelvir contra a enzima selvagem e mutantes Q189K, T190I, A191T, A191V, A193V, A193S e A193T..... 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers usados na PCR inversa para cada polimorfismo da M ^{pro}	16
Tabela 2 – Polimorfismos identificados referentes a M ^{pro}	20
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos dos mutantes e M ^{pro} selvagem..	22
Tabela 4 – Parâmetros inibição de nirmatrelvir e ensitrelvir frente aos mutantes e M ^{pro} selvagem.	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 SARS-CoV-2 e pandemia de COVID-19	9
1.2 Biologia estrutural do vírus	10
1.3 Main protease (M^{pro})	11
1.4 Agentes Antivirais	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. METODOLOGIA	15
3.1 Identificação de polimorfismos da M^{pro}	15
3.2 Clonagem, expressão e purificação de proteínas	15
3.3 Ensaio de atividade e inibição	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Identificação dos polimorfismos da enzima M^{pro}	18
4.2 Mutagênese, expressão e purificação das enzimas	20
4.3 Cinética enzimática	21
4.4 Inibição enzimática	23
5. CONCLUSÃO	28
6. REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 SARS-CoV-2 e pandemia da COVID-19

O vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), ocasionou uma crise econômica e humanitária no mundo. Agente causador da doença Coronavírus 2019 (COVID-19), o SARS-CoV-2 se disseminou de forma rápida e sem precedentes por todo o globo. Em março de 2020, três meses após o primeiro caso registrado em Wuhan, na China (ZHOU et al., 2020), a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o surto da doença como pandemia. A urgência ocasionada pelo crescente número de casos motivou pesquisadores do mundo todo para o desenvolvimento de fármacos e vacinas contra a COVID-19 (GORDON et al., 2020).

A principal forma de transmissão do SARS-COV-2 se dá por meio da propagação de fluidos respiratórios de uma pessoa infectada para outra pessoa a partir de gotículas suspensas no ar ao tossir ou espirrar. Os sintomas variam, podendo ser mais leves, moderados ou graves. Dentre os sintomas mais comumente apresentados por adultos infectados estão a febre, tosse seca, congestão nasal, perda do paladar ou olfato, dor de cabeça e dor muscular. Apesar de crianças apresentarem em sua maioria, um quadro clínico assintomático, alguns sintomas como a dispneia, conjuntivite, erupção cutânea e dor de garganta se mostraram mais predominantes em comparação a adultos infectados (MIZRAHI et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

Atualmente, existem diversas vacinas aprovadas contra o novo coronavírus, sendo as principais aplicadas no Brasil as vacinas da Pfizer/BionTech, Sinovac/Coronavac e Astra-Zeneca/Oxford. Embora as taxas de cobertura vacinal das três primeiras doses tenham sido altas, a exata eficácia e duração da imunidade vacinal ainda é desconhecida e o surgimento de variantes dificulta o controle do vírus (SINGH et al., 2023). Desde o início da pandemia em 2020, novas variantes do vírus passaram a circular no mundo. Alterações no código genético do SARS-CoV-2 ocasionado por mutações genéticas ou recombinação viral, resultaram em variantes com maior transmissibilidade e patogenicidade. Dentre as variantes detectadas, cinco são classificadas como variantes de preocupação, sendo elas: Alfa, primeira identificada no Reino Unido, Beta, Gama, Delta e a mais recente Ômicron (TREGONING et al., 2021). Portanto, mesmo no contexto da existência da vacina, faz-se necessária e imprescindível a busca por alternativas terapêuticas, como os antivirais, visto que a cobertura e eficácia vacinal sugerem que casos de COVID-19 ainda continuarão a acontecer.

1.2 Biologia estrutural do vírus

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de sentido positivo ((+) ssRNA), envelopado, pertencente à família *Coronaviridae* e do gênero dos β -*coronavírus*, que inclui também o SARS-CoV, com quem compartilha cerca de 80% de identidade sequencial e o Vírus Respiratório do Oriente Médio (MERS-CoV) (ZHOU et al., 2020). O genoma viral do SARS-CoV-2 é composto por aproximadamente 30 Kb, abrangendo cerca de um terço do genoma estão os *Open Reading Frames* (ORFs) 1a e 1b que codificam duas poliproteínas virais, pp1a e pp1ab, quatro proteínas estruturais e ao menos seis proteínas acessórias. As proteínas estruturais são a glicoproteína spike (S), a proteína do envelope (E), a proteína da matriz (M), e a proteína do nucleocapsídeo (N), enquanto as proteínas acessórias são ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10 (GORDON et al., 2020; HELMY et al., 2020). As poliproteínas possuem 16 proteínas não estruturais (NSP), essenciais para a replicação viral, clivadas pela ação de duas proteases virais Papain-like-protease (PL^{pro}) e Main protease (M^{pro}), durante a replicação liberando proteínas não estruturais maduras formadoras do complexo de replicação viral (JIN et al., 2020b; WU et al., 2020).

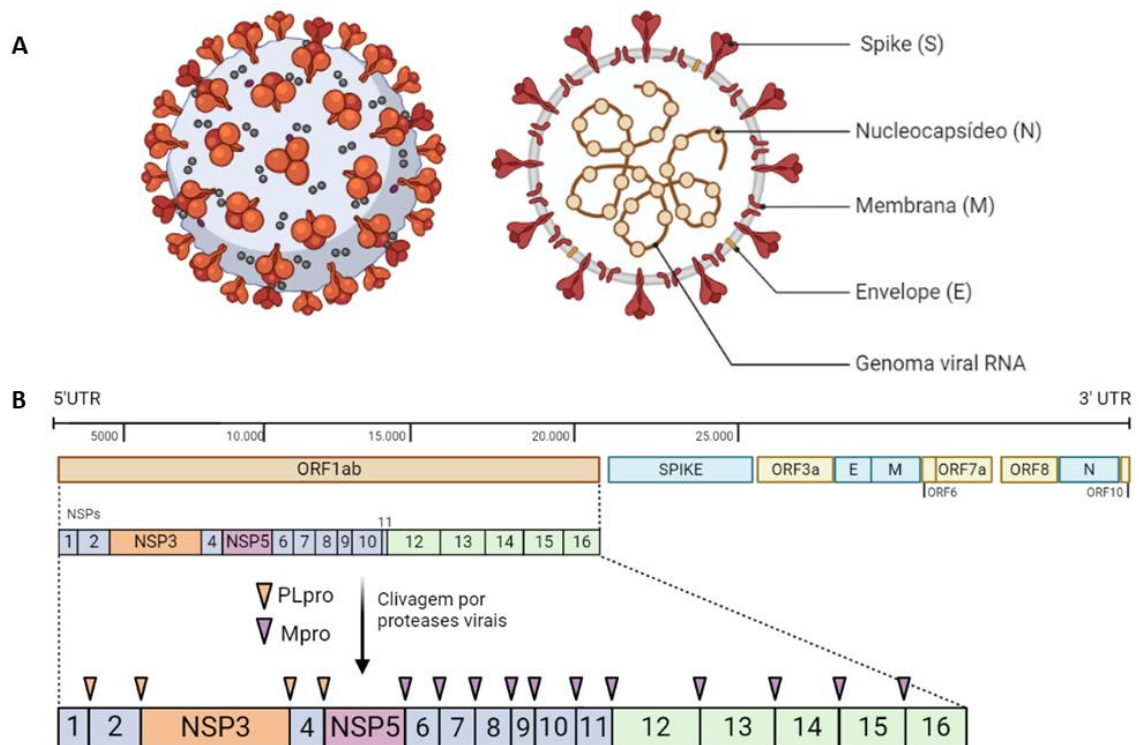


Figura 1 – **A)** Representação das proteínas estruturais do SARS-CoV-2. **B)** Esquema do genoma viral do SARS-CoV-2 e da poliproteína viral pp1ab, com setas indicando os sítios de clivagem de cada uma das proteases virais. Indicado por triângulos, estão representados os sítios de clivagem de cada uma das proteases virais. Em laranja, estão representados os sítios de clivagem da enzima PL^{pro} e em roxo, os sítios da enzima M^{pro} .

Fonte: Elaborada pelo autor. Criada com BioRender.com

1.3 Main protease (M^{PRO})

A protease principal, ou main protease (M^{PRO}), também denominada protease semelhante a 3-quimotripsina (3CL^{PRO}), é a principal protease responsável pela clivagem em onze locais conservados nas poliproteínas virais, incluindo seus próprios N e C terminais (HU et al., 2022; LEE et al., 2020b). A protease 3CL^{PRO} corresponde à NSP5 e pertence a uma classe de hidrolases de cisteína dimérica, os sítios ativos dessa protease são compostos por quatro sítios S1', S1, S2 e S4 que são altamente conservadas em *β-coronavírus* (HU et al., 2022). A M^{PRO} possui estrutura dimérica, composta por três domínios, e apresenta uma díade catalítica cisteína-histidina, localizada na fenda entre os domínios I e II, onde enxofre da cisteína (Cys¹⁴⁵) atua como um nucleófilo e o anel imidazólico da histidina (His⁴¹) como uma base geral (LEE et al., 2020b; RYU et al., 2010). O sítio de ligação ao substrato possui características únicas, podendo reconhecer e clivar exclusivamente o resíduo glutamina na posição P1, além disso, a posição P2 tem preferência por resíduos hidrofóbicos e pequenos aminoácidos como, serina, alanina ou glicina, na posição P1'(P2:Leu/Met/Phe/Val)-P1:Gln↓-(P1':Ser/Ala/Gly/Asn) (LEE et al., 2020b). Devido às características de alta especificidade da enzima, do seu papel fundamental na replicação e maturação viral e a ausência de proteases homólogas em humanos, a 3CL^{PRO} é um potencial alvo para o desenvolvimento de antivirais eficazes e específicos.

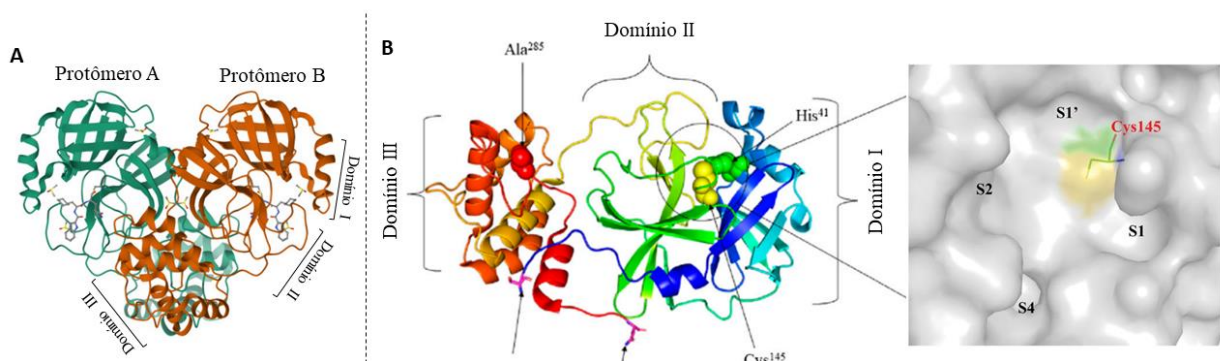


Figura 2 – **A)** Estrutura 3D da Main-protease ou M^{PRO} do SARS-CoV-2 (PDB: 6Y2E, DAI et al., 2020). **B)** Representação dos três domínios da protease. Os resíduos His41 e Cys145, que compõem a díade catalítica se encontram representados em verde e amarelo, respectivamente.

Fonte: Adaptada de HU et al. (2022); MENGIST; DILNESSA; JIN (2021).

1.4 Agentes Antivirais

Os antivirais representam uma classe de fármacos empregada no tratamento de infecções causadas por vírus. Além de proteger as pessoas contra doenças, também atuam preventivamente, e auxiliam no controle da disseminação do vírus. O mecanismo de ação desses fármacos visa impedir a multiplicação do vírus nas células do hospedeiro utilizando inibidores que afetam a entrada do vírus, suas ligações, as polimerases, as proteases e diversos outros

alvos. Apesar de não abranger todas as doenças virais, existem alguns antivirais contra herpesvírus, vírus da hepatite B e C, HIV e vírus da influenza A e B (KAUSAR et al., 2021).

Em 2021 a OMS aprovou o uso do antiviral oral específico contra a COVID-19 o Paxlovid[®], da farmacêutica Pfizer. Além dele foram identificados outros antivirais como boceprevir, carmofur, MAT-POS-e194df51-1 e o inibidor não covalente de M^{pro}, ensitrelvir (S-217622) (AKINOSOGLOU; SCHINAS; GOGOS, 2022; JIN et al., 2020a; TYNDALL, 2022). O Paxlovid[®] funciona como um inibidor covalente, fazendo uma ligação direta com o resíduo de cisteína catalítica da enzima. Ele é uma combinação das substâncias ativas nirmatrelvir (PF-07321332) inibidor da M^{pro} e ritonavir, forte inibidor do citocromo P50-3A4 (CYP3A4). O ritonavir é amplamente empregado para prolongar o efeito terapêutico de outros inibidores de proteases, uma vez que diminui a ação oxidativa do citocromo. O ritonavir tem a capacidade de inibir o citocromo P450 3A4, uma enzima do sistema de metabolismo hepático que desempenha um papel fundamental na metabolização de muitos medicamentos e substâncias químicas no organismo. Sua ação inibitória resulta em um aumento das concentrações sanguíneas dos medicamentos associados a ele, tornando-os mais eficazes (AKINOSOGLOU; SCHINAS; GOGOS, 2022). O nirmatrelvir é um inibidor peptidomimético covalente que utiliza uma ogiva de nitrila para se se liga ao sítio ativo de M^{pro} formando uma ligação covalente reversível com o resíduo catalítico de cisteína, Cys¹⁴⁵ (TYNDALL, 2022; ULLRICH et al., 2022). Além disso, a eficácia *in vitro* do nirmatrelvir contra as variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B1.617.2), Gama (P.1), Lambda (B.1.1.1.37/C37) e Omicron (B.1.1.529) já foi demonstrado (GREASLEY et al., 2022).

De igual modo, o composto S-217622, da farmacêutica japonesa Shionogi, foi identificado através de uma combinação de triagem virtual e testes biológicos realizados em uma coleção interna de compostos. Posteriormente, o composto inicial passou por um processo de aprimoramento utilizando técnicas de design de fármacos guiadas por estrutura. Nesta fase de otimização, ajustes foram feitos para aprimorar sua eficácia como inibidor enzimático. Essas modificações levaram à criação do S-217622, que evoluiu para ser um candidato a fármaco clínico. O ensitrelvir apresentou atividade antiviral *in vitro* contra as atuais variantes do SARS-CoV-2 e propriedades farmacocinéticas em testes *in vivo*, o que indica a possibilidade de doses terapêuticas que possam ser alcançadas sem a necessidade de inibidores de citocromo, sendo um promissor inibidor não peptídico e não covalente da M^{pro} (TYNDALL, 2022; UNOH et al., 2022).

O mecanismo de reconhecimento da enzima M^{pro} envolve a interação específica com sequências de aminoácidos presentes nas poliproteínas virais. A M^{pro} reconhece e cliva essas poliproteínas em resíduos específicos, geralmente após a sequência consenso Leu-Gln↓(Ser, Ala, Gly), liberando proteínas funcionais que são essenciais para a montagem do vírus. Devido a isso, a estrutura tridimensional da enzima é crucial para o seu mecanismo de reconhecimento (MENGIST; DILNESSA; JIN, 2021). Alterações nos resíduos da M^{pro} podem afetar sua capacidade de reconhecer e clivar poliproteínas virais de maneira eficiente. Isso pode levar a mudanças na taxa de replicação viral ou na produção de proteínas essenciais para o vírus. Em alguns casos, as mutações nos resíduos da M^{pro} podem conferir resistência a antivirais, ou seja, se a mutação ocorrer em uma região crucial para a ligação de um inibidor, a eficácia desse inibidor no bloqueio da atividade da enzima pode ser reduzida. Portanto, estudos *in vitro* dos efeitos de mutações pontuais na atividade dos fármacos são de vital importância para prevenir a seleção de mutantes resistentes aos fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo desse projeto é utilizar análises genômicas de bancos de dados para identificar polimorfismos naturais da enzima M^{pro} que estejam no raio de ação dos fármacos ensitrelvir e nirmatrelvir. Em seguida, utilizando técnicas de bioquímica e biologia molecular, iremos clonar e produzir essas enzimas polimórficas com objetivo de realizar estudos de caracterização enzimática e perfil de resistência contra os fármacos. Com isso buscamos compreender como cada um dos mutantes afeta a atividade enzimática e a eficácia desses fármacos, possibilitando antever mutações que possam conceder resistência as moléculas em questão.

2.2 Objetivos específicos

- Identificação de polimorfismos no sítio ativo da enzima com base nas informações estruturais e bancos de sequências gênicas.
- Expressão recombinante e purificação da enzima M^{pro} do vírus SARS-CoV-2 em diferentes construções. Determinação dos parâmetros cinéticos e constantes inibitórias dos compostos nirmatrelvir e ensitrelvir.

3. METODOLOGIA

3.1 Identificação de polimorfismos da M^{pro}

Para a seleção das versões polimórficas da M^{pro}, foram utilizados dados de sequenciamento disponíveis no banco de dados Sistema Global de Vigilância e Resposta à Influenza (GISAID) hCoV-19/SARS-CoV-2 (KHARE et al., 2021) em CoV-GLUE (<http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk>) . Em seguida, foram selecionados 16 mutantes que estavam dentro de um raio de 8,0 Å dos compostos de interesse, com frequência maior ou igual a 10 indivíduos. Estes dados correspondiam ao mês de dezembro de 2021 e diziam respeito à M^{pro}.

3.2 Clonagem, expressão e purificação de proteínas

A clonagem e a expressão foram realizadas conforme descrito em Noske et al, 2021. O modelo de cDNA do SARS-CoV-2 (GenBank MT126808.1), foi concedido pelo Dr. Edison Durigon da Universidade de São Paulo. O material genético foi sintetizado usando o SCRIPT One-Step RT-Kit de PCR (Cellco Biotec) com primers hexâmeros aleatórios. A região codificadora da M^{pro}, resíduos 3264–3569, foram inseridos no vetor pET_M11, que codifica uma N-terminal 6xHis-tag seguido de um sítio TEV protease de clivagem de protease, utilizando a método de clonagem molecular independente de ligação (LIC), conforme descrito em Aslanidis; de Jong, 1990. Para todas as reações PCRs realizadas foi utilizada a polimerase FastPol High Fidelity (Cellco Biotec) e primers listados na **Tabela 1**. O produto da amplificação passou por digestão enzimática com a enzima DpnI (NEB), seguido por tratamento com T4 Polinucleotídeo quinase (Thermo Fisher Scientific) e T4 DNA ligase (Cellco Biotec). As mutações foram confirmadas por sequenciamento.

Tabela 1 - Primers usados na PCR inversa para cada polimorfismo da M^{pro}. **Fonte:** Elaborada pelo autor.

Polimorfismo	Primer Forward	Primer Reverse
M49I	CCTCTGAAGACATTCTTAACCC	TGCAGATCACATGTCTTGG
M49T	CTCTGAAGACACGCTTAACCC	GTGCAGATCACATGTCTTGGGA
N142S	CATTCCTTAGTGGTTCATGTGG	AACCCTTAATAGTGAAATTGGGC
N142D	CATTCCTTGATGGTTCATGTG	AACCCTTAATAGTGAAATTGGGC
N142L	CATTCCTTCTTGGTTCATGTG	AACCCTTAATAGTGAAATTGGGC
G143S	CATTCCTTAATAGTTCATGTGGTAGTG	AACCCTTAATAGTGAAATTGGGC
M165I	CATGCACCATATTGAATTACCAAC	TAACAAAAAGAGACACAGTCATAATCTATGTT
R188K	GTTGACAAGCAAACAGCAC	AAAAGGTCCATAAAAAGTTACCTTC
R188S	GTTGACAGCCAAACAGC	AAAAGGTCCATAAAAAGTTACCTT
Q189K	GACAGGAAAACAGCACAAAG	AACAAAAGGTCCATAAAAAGTTAC
T190I	GGCAAATTGCACAAGC	TGTCAACAAAAGGTCCATAAAA
A191T	GCAAACAACACAAGCAGCTG	CTGTCAACAAAAGGTCCATAAAAAGTTAC
A191V	GGCAAACAGTACAAGCAGCTG	TGTCAACAAAAGGTCCATAAAAAGTTAC
A193S	GCACAATCAGCTGGTACG	TGTTTGCCTGTCAACAAAA
A193T	GCACAAACAGCTGGTACG	TGTTTGCCTGTCAACAAAAAG
A193V	CAGCACAAAGTAGCTGGTACGG	TTTGCCTGTCAACAAAAGGTC

Para a expressão das proteínas, foram utilizadas células BL21 (DE3) de *E. coli* que continham os plasmídeos recombinantes. As células foram cultivadas em meio ZYM 5052 (F. WILLIAM, 2005) a 37 °C e 200 rpm. O cultivo foi conduzido até que a densidade óptica a 600 nm (A_{600}) atingisse o valor de 0,6, momento em que a expressão da proteína foi induzida pela diminuição da temperatura para 18°C. As células foram cultivadas por mais 16 horas. Em seguida, foram colhidas por centrifugação a 5.000 g, a 4°C por 40 min e ressuspensas em tampão de lise (20 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) com adição de 1µg/mL lisozima e 10 U/mL benzonase. Posteriormente, as células foram submetidas à sonicação. O lisado foi clarificado por centrifugação a 15.000 g, a 4 °C por 30 min. A proteína foi obtida por precipitação com 1,5 M de sulfato de amônio. O precipitado foi incubado no gelo por 10 minutos e, em seguida, isolado por centrifugação a 15.000 g, a 4 °C, por 15 minutos.

A proteína de interesse foi ressuspensa em tampão de lise e injetada em uma coluna Superdex 200 26/100 (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão de gel filtração (20 mM Tris pH 7,8, 50 mM NaCl, 1 mM DTT). Após cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), a proteína teve o tampão substituído por um tampão composto por 20 mM Tris pH 8,0, 1 mM DTT, sendo então purificada por meio de cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna Mono-Q (GE Healthcare). A eluição da proteína foi realizada com um gradiente linear com o tampão contendo 20 mM Tris pH 8,0, 1 M NaCl e 1 mM DTT. As frações que continham

a proteína purificada foram coletadas e quantificadas usando as absorvâncias medidas a 280 nm e o coeficiente de extinção teórico de $32.890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A pureza da proteína foi avaliada por SDS-PAGE. Para ensaios enzimáticos, foram feitas alíquotas da proteína a 0,5 mg/ml e congelada rapidamente usando nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o uso. Os mesmos protocolos de expressão e purificação foram usados para obtenção dos mutantes M^{Pro}.

3.3 Ensaios de atividade e inibição

O composto ensitrelvir foi adquirido da empresa TCG lifesciences, enquanto o composto nirmatrelvir foi gentilmente fornecido pelo Prof. Carlos Alberto Montanari (IQSC-USP). Os ensaios enzimáticos foram realizados baseando-se no mecanismo de Transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), utilizando o substrato fluorogênico DABCYL-KTSAVLQ↓SGFRKM-E(EDANS)-NH₂. Os mutantes M^{Pro} foram diluídos para a concentração final de 40 nM em tampão 20 mM Tris pH 7,3, 1 mM EDTA, 1 mM DTT. Para avaliação dos parâmetros cinéticos (K_M , V_{\max} e k_{cat}), o substrato foi diluído para a faixa de concentração 200 μM a 0,1 μM . As reações foram previamente incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min e iniciadas após adição de substrato nas diferentes concentrações. As fluorescências foram medidas no SpectraMax Gemini EM Microplate Reader com excitação (λ_{exc}) de 360 nm e emissão (λ_{emi}) de 460 nm. Essas medidas foram realizadas a cada 60 segundos ao longo de 1 hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. As reações foram feitas em placas Corning® brancas de 384 poços. A velocidade inicial foi derivada da inclinação da fase linear de cada reação ao longo do tempo, e o ajuste de Michaelis–Menten foi obtido usando o software Origin Pro 9.5.1 (OriginLab).

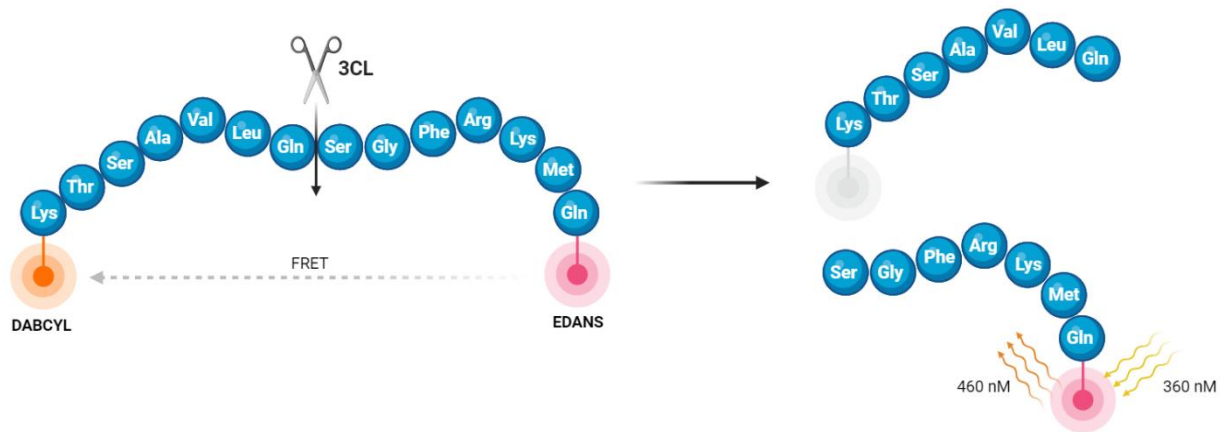


Figura 2 - Ilustração do princípio por trás do ensaio de protease M^{pro} baseado em FRET. A fluorescência emitida pelo fluoróforo doador EDANS é absorvida devido à proximidade do aceitador DABCYL no peptídeo intacto. Após proteólise pela protease 3CL entre glutamina e serina, o fragmento peptídico altamente fluorescente SGFRKME-EDANS é gerado que pode ser verificado nos comprimentos de onda de $\lambda_{exc}/\lambda_{emi}$ de 360/460 nm, respectivamente. A intensidade da fluorescência aumenta proporcionalmente à atividade da protease. **Fonte:** Elaborada pelo autor. Criada com BioRender.com

A eficiência relativa dos mutantes da M^{pro} foi calculada comparando o k_{cat}/K_m relativo ao da protease selvagem. Para determinar o IC_{50} dos inibidores nirmatrelvir e ensitrelvir, as reações foram previamente incubadas a 37 °C por 10 min contendo de 10 μM a 0,0006 nM dos inibidores e foram iniciadas após adição de 10 μM do substrato. A porcentagem de inibição foi calculada comparando os resultados com um controle usando DMSO. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes, e os valores apresentados foram determinados a partir de valores médios. Os erros associados a esses valores foram determinados usando o desvio padrão das triplicatas. Os valores de K_i , que indicam a afinidade do inibidor pela enzima, foram calculados usando a seguinte fórmula: $K_i = (IC_{50}) / ((S/K_m + 1))$, onde S é a concentração do substrato (CER et al., 2009). Nesse estudo, o nirmatrelvir foi considerado um inibidor não competitivo, enquanto o ensitrelvir foi considerado um inibidor competitivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos polimorfismos da enzima M^{pro}

Com o intuito de estudar principalmente como substituições próximas ao sítio ativo impactam nas interações dos compostos com a enzima, visamos identificar polimorfismos através da utilização das informações estruturais disponíveis para estabelecer um parâmetro para a seleção dos mutantes. Assim, foram selecionados aqueles que se encontravam em um raio menor ou igual a 8.0 Å de cada inibidor.

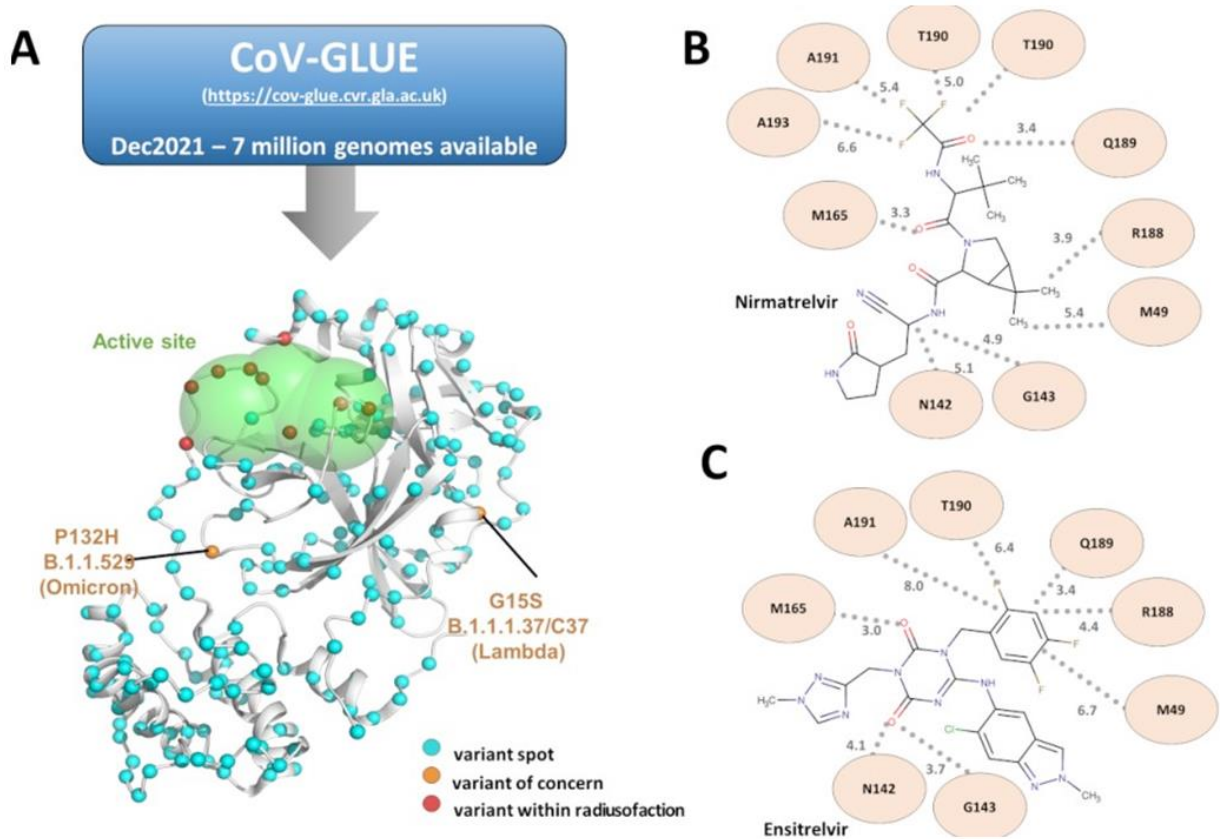


Figura 3 – **A)** Modelo M^{pro} mostrando variantes identificadas no banco de dados genômico, utilizando um limite de $n \geq 10$. As variantes identificadas estão representadas como esferas ciano, as esferas vermelhas representam as variantes localizadas dentro de um raio de ligação de 8 \AA e as esferas laranjas indicam variantes de maior preocupação. O sítio ativo da M^{pro} é destacado pela coloração verde. **B)** Representação da distância e interações mais próximas das mutações selecionadas com o composto nirmatrelvir. **C)** Representação da distância e interações mais próximas das mutações selecionadas com o composto ensitrelvir. **Fonte:** Adaptado de Noske et al, 2023.

Foram analisados dados de sequenciamentos relativos a M^{pro} disponíveis no banco de dados GISAID hCoV-19/SARS-CoV-2 em CoV-GLUE (Dezembro de 2021). Dentre as 7 milhões de seqüências disponíveis, foram identificados 16 polimorfismos da enzima com mais de 10 indivíduos, conforme descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Polimorfismos identificados referentes a M^{pro}. **Fonte:** Elaborada pelo autor.

Polimorfismo	Original	Substituição	Nº de sequências identificadas
M49I	M	I	116
M49T	M	T	14
N142S	N	S	35
N142D	N	D	11
N142L	N	L	10
G143S	G	S	14
M165I	M	I	14
M165I	M	I	14
P168S	P	S	73
V186F	V	F	161
V186I	V	I	24
R188K	R	K	38
R188S	R	S	29
Q189K	Q	K	60
T190I	T	I	295
A191S	A	S	11
A191T	A	T	35
A191V	A	V	1899
A193S	A	S	41
A193T	A	T	182
A193V	A	V	851

4.2 Mutagêneses, expressão e purificação das enzimas

Visando compreender melhor o impacto das mutações presentes na protease, aplicamos o método de mutagênese sítio dirigida para obtenção dos 16 polimorfismos da enzima. Para cada um deles três colônias foram selecionadas e a presença das mutações foram confirmadas por sequenciamento. Após a confirmação da presença das mutações, ambas as enzimas, selvagem e 15 dos mutantes foram expressos e purificados, e os resultados da purificação foram analisados por SDS-PAGE. Como exemplificado na **Figura 5B**, ambas as enzimas foram obtidas na etapa final de purificação com elevada pureza e foram utilizadas nos ensaios subsequentes de caracterização. O mutante N142L não gerou nenhuma proteína solúvel e, portanto, não foi mais caracterizado.

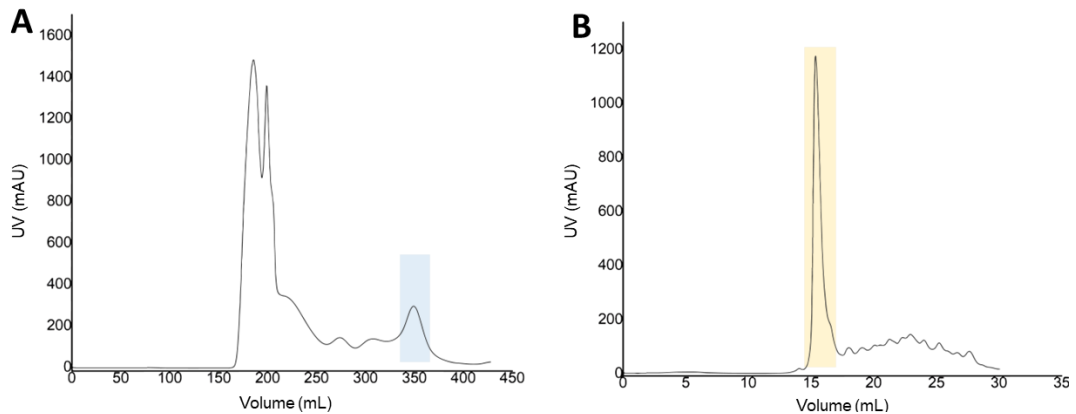


Figura 4 – Cromatogramas correspondentes a purificação da M^{pro} selvagem. **A)** Etapa de cromatografia por exclusão molecular com uma coluna Superdex 200 26/100 (GE Healthcare), o pico referente a eluição da proteína está indicado pela cor azul. **B)** Etapa de cromatografia de troca iônica usando uma coluna Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare), a eluição da proteína é indicada pela cor laranja.
Fonte: Elaborada pelo autor.

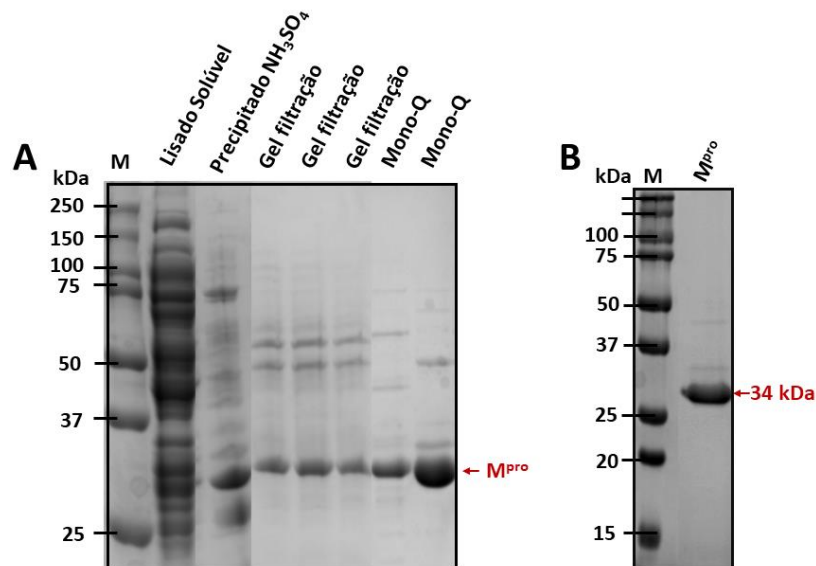


Figura 5 – SDS-PAGE das etapas de purificação. A) Etapas do processo de purificação. B) Cromatografia de troca iônica.
Fonte: Autoral.

4.3 Cinética enzimática

Todos os mutantes testados foram eficazes em reconhecer e clivar o substrato fluorogênico (**Figura 7**). Desta forma, utilizando este ensaio foi possível estimar os valores referentes a constante cinética (k_{cat}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) para todos os mutantes. Os valores de eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) obtidos em comparação enzima selvagem estão descritos na **Tabela 3**, junto aos demais parâmetros cinéticos determinados. Para o tipo selvagem da enzima o K_m e k_{cat} apresentaram valores de $22 \pm 2 \mu\text{M}$ e $31 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ respectivamente,

similares aos valores $16,4 \mu\text{M}$ e 28 s^{-1} , já publicados para o mesmo substrato fluorogênico (NOSKE et al., 2021). Enquanto os mutantes apresentaram valores de K_m variando de $6,4$ a $25,4 \mu\text{M}$ e eficiências catalíticas entre 3 e 205% em comparação a enzima selvagem.

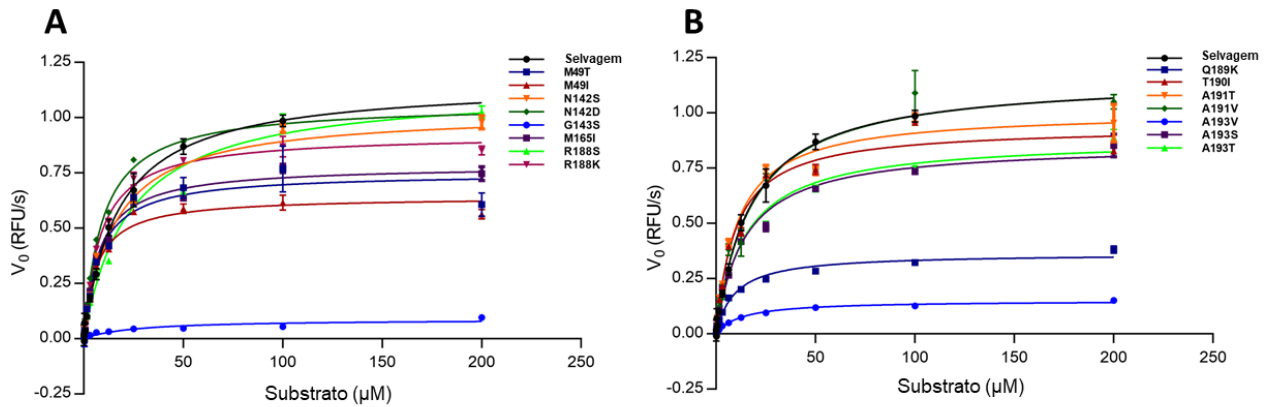


Figura 7 – Gráficos de cinética enzimática. **A)** Gráficos de Michaelis-Menten referentes a enzima selvagem e mutantes M49I, M49T, N142S, N142D, G143S, M165I, R188S e R188K. **B)** Gráficos de Michaelis-Menten referentes a enzima selvagem e mutantes Q189K, T190I, A191T, A191V, A193S e A193T. As barras de erros apresentadas correspondem ao desvio padrão das triplicatas.

Fonte: Adaptado de Noske et al, 2023.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos dos mutantes e M^{PPO} selvagem. **Fonte:** Elaborada pelo autor.

Polimorfismo	K_M (μM)	k_{cat} (RFU/ $\mu\text{M}\cdot\text{s}$)	Eficiência relativa
M49I	6 ± 1	$16,0 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,2$
M49T	7 ± 2	19 ± 1	$1,8 \pm 0,2$
N142S	15 ± 3	25 ± 1	$1,2 \pm 0,2$
N142D	9 ± 1	27 ± 2	$2,0 \pm 0,1$
G143S	25 ± 11	$1,0 \pm 0,1$	$0,030 \pm 0,001$
M165I	$7,7 \pm 0,7$	$19,6 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,1$
R188K	$8,2 \pm 0,9$	23 ± 1	$2,00 \pm 0,08$
R188S	22 ± 4	28 ± 2	$0,9 \pm 0,3$
Q189K	9 ± 1	$4,5 \pm 0,2$	$0,30 \pm 0,09$
T190I	10 ± 2	23 ± 1	$1,7 \pm 0,02$
A191T	11 ± 1	25 ± 1	$1,7 \pm 0,02$
A191V	18 ± 3	29 ± 2	$1,3 \pm 0,3$
A193S	14 ± 2	$21,5 \pm 0,8$	$1,1 \pm 0,2$
A193T	14 ± 2	$22,1 \pm 0,9$	$1,0 \pm 0,2$
A193V	13 ± 2	$7,5 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$
Enzima selvagem	22 ± 2	$30,8 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,2$

Os dados apresentados são em média \pm desvio-padrão (SD, *standard deviation*).

A eficiência relativa dos mutantes M49I, M49T, N142D, M165I, R188K, T190I e A191T se mostrou até duas vezes maior do que da enzima selvagem, destacando os mutantes N142D e R188K com as maiores eficiências relativas apresentadas. Os mutantes G143S, Q189K e A193V mostraram eficiências relativas diminuídas, com uma redução de 33, 3 e 2

vezes, respectivamente, em comparação com a enzima selvagem. Enquanto as eficiências relativas dos mutantes N142S, R188S, A191V, A193S e A193T se mostraram similares a enzima selvagem (**Figura 8A**).

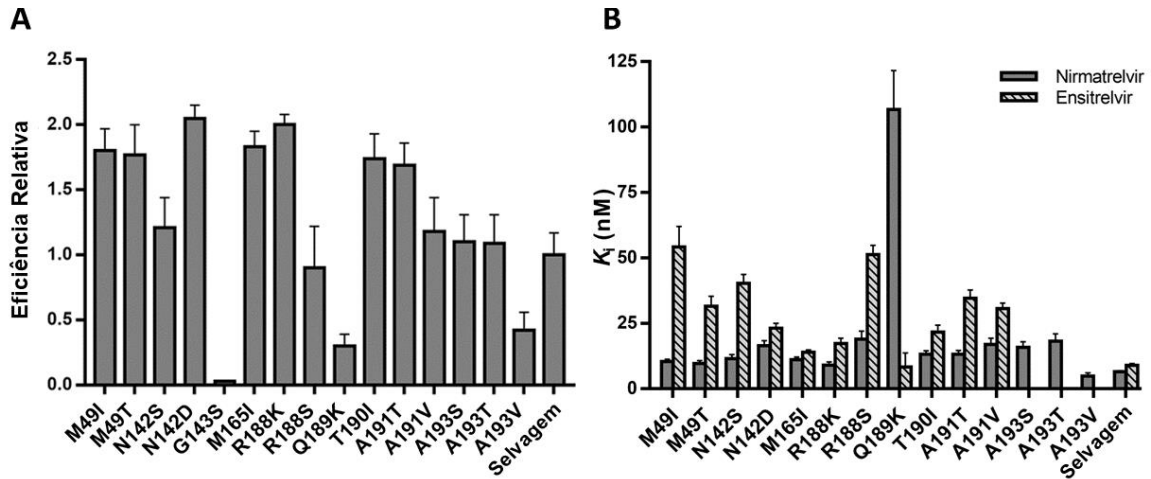


Figura 6 – **A**) Gráfico referente as eficiências catalíticas relativas dos mutantes e enzima selvagem frente ao substrato fluorogênico. Os dados apresentados são em média \pm desvio-padrão, (SD, *standard deviation*), $n = 3$. **B**) Gráfico de constante de inibição para o nirmatrelvir e ensitrelvir contra o painel de mutantes e enzima selvagem. Para uma melhor visualização, os valores de inibição do mutante G143S não foram representados. Os dados apresentados são em média \pm desvio-padrão (SD, *standard deviation*).

Fonte: Adaptado de Noske et al, 2023.

4.4 Inibição enzimática

A avaliação da inibição enzimática pelos compostos nirmatrelvir e ensitrelvir mostrou que ambos podem ser considerados potentes inibidores na faixa de nanomolar da enzima selvagem e de seus mutantes (**Figura 8**).

O nirmatrelvir conseguiu inibir a enzima selvagem apresentando IC_{50} de $0,022 \pm 0,004 \mu\text{M}$ e K_i de $0,006 \pm 0,0005 \mu\text{M}$ (**Tabela 4**), em concordância com valores publicados de $0,003 \mu\text{M}$ para o K_i (OWEN et al., 2021a) e $0,0192 \mu\text{M}$ para o IC_{50} (LAMB, 2022). Com exceção do mutante G143S, que apresentou o maior valor de K_i dentre os mutantes avaliados ($0,96 \pm 0,23 \mu\text{M}$), o nirmatrelvir conseguiu inibir os demais mutantes apresentando valores de K_i de $0,005$ a $0,106 \mu\text{M}$ (**Figura 8B**). Ao comparar com a enzima selvagem, os mutantes M49I, M49T, N142S, M165I, R188K, T190I, A191T e A193V apresentaram uma maior afinidade pelo composto com valores de K_i variando de $0,005$ a $0,013 \mu\text{M}$ (**Tabela 4**). Os mutantes N142D, R188S, A191V, A193S e A193T apresentaram aumento de duas a três vezes nos valores de K_i em relação à enzima selvagem (**Figura 8B**). Enquanto os mutantes Q189K e G143S exibiram as maiores constantes inibitórias. Mais especificamente, houve um aumento de 16 vezes para a mutação Q189K e um aumento de 147 vezes para a mutação G143S em comparação a enzima selvagem (**Tabela 4**).

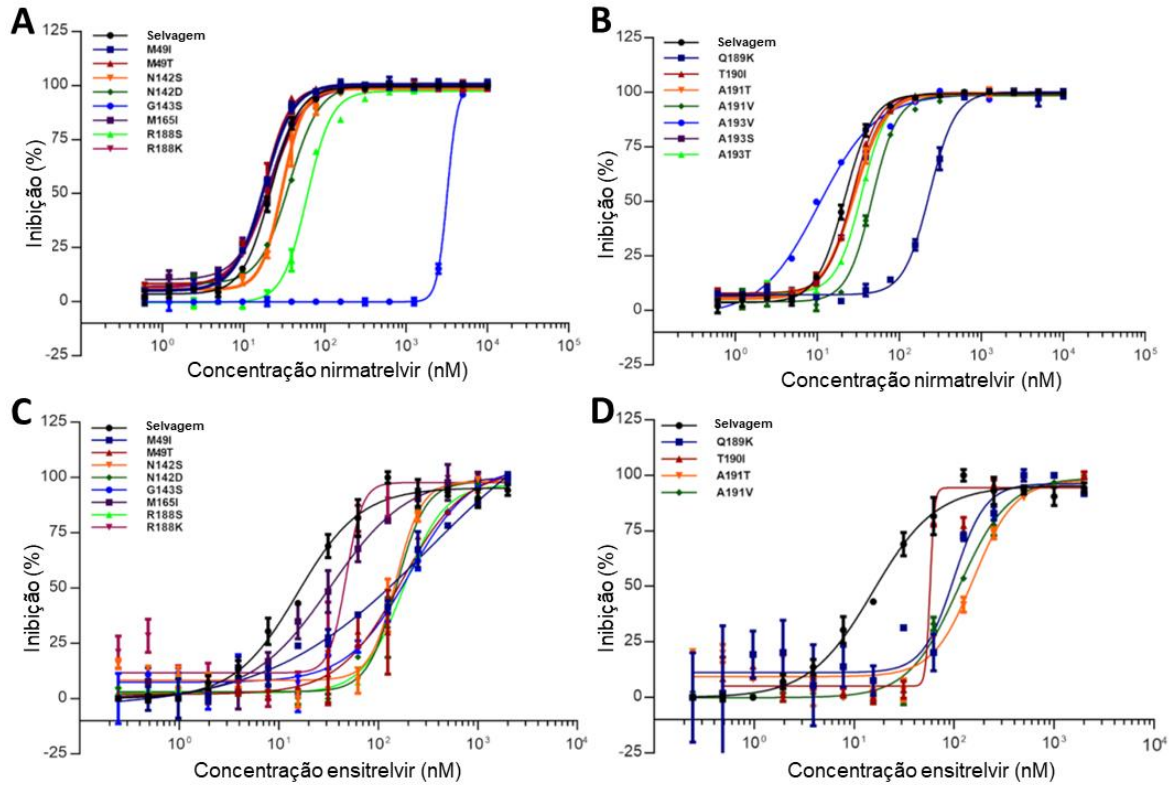


Figura 7 – Gráficos da curvas dose-resposta. **A)** Gráficos dose-reposta de nirmatrelvir contra enzima selvagem e mutantes M49T, M49I, N142S, N142D, G143S, M165I, R188S e R188K. **B)** Gráficos dose-reposta de nirmatrelvir contra a enzima selvagem e mutantes Q189K, T190I, A191T, A191V, A193V, A193S e A193T. **C)** Gráficos dose-reposta de ensitrelvir contra enzima selvagem e mutantes M49T, M49I, N142S, N142D, G143S, M165I, R188S e R188K. **D)** Gráficos dose-reposta de ensitrelvir contra a enzima selvagem e mutantes Q189K, T190I, A191T, A191V, A193V, A193S e A193T. **Fonte:** Adaptado de Noske et al, 2023.

O ensitrelvir também conseguiu inibir a enzima selvagem com valores de IC_{50} de $0,013 \pm 0,001 \mu\text{M}$ e K_i de $0,009 \pm 0,0007 \mu\text{M}$ (**Tabela 4**), em concordância com valores relatados anteriormente de $0,013 \mu\text{M}$ para o IC_{50} (UNOH et al., 2022). Os mutantes M165I, R188K e Q189K obtiveram uma maior afinidade ao ensitrelvir, com constantes inibitórias variando de $0,008$ a $0,017 \mu\text{M}$, em relação à enzima selvagem (**Figura 8B**). Enquanto, os mutantes N142D e T190I apresentaram valores de K_i de $0,023 \pm 0,002$ e $0,021 \pm 0,002$ respectivamente, o que representou um aumento de quase três vezes comparado ao K_i da enzima selvagem. As constantes inibitórias dos mutantes M49T, N142S, A191T e A191V apresentaram valores de K_i com aumento de três a cinco vezes comparados ao K_i da enzima selvagem (**Figura 8B**). Os mutantes M49I, G143S e R188S apresentaram as maiores constantes inibitórias para o ensitrelvir, exibindo aumento de 6, 15 e 5,7 vezes nos valores relativos de K_i , respectivamente (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Parâmetros inibição de nirmatrelvir e ensitrelvir frente aos mutantes e M^{Pro} selvagem.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Polimorfismo	Nirmatrelvir		Ensitrelvir	
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)
M49I	17,1 ± 0,5	10,4 ± 0,87	139 ± 8	54,2 ± 7,8
M49T	16,9 ± 0,5	9,6 ± 1,15	73 ± 0,3	31,6 ± 3,6
N142S	29 ± 1	11,5 ± 1,57	67 ± 2	40,4 ± 3,3
N142D	32 ± 1	16,45 ± 1,90	48 ± 0,2	23,2 ± 1,9
G143S	3380 ± 128	960,2 ± 237	197 ± 0,5	141,3 ± 17
M165I	19 ± 1	11,1 ± 0,99	3,2 ± 0,4	13,9 ± 0,9
R188K	17 ± 1	9 ± 1,22	38 ± 3	17,2 ± 2,1
R188S	61 ± 3	18,95 ± 3,11	74 ± 1	51,3 ± 3,5
Q189K	203 ± 16	106,7 ± 14,9	38 ± 9	8,3 ± 2,4
T190I	25 ± 1	13,2 ± 1,38	44 ± 2	21,6 ± 2,7
A191T	27 ± 1	13,2 ± 1,43	67 ± 2	34,6 ± 3,2
A191V	46 ± 2	16,9 ± 2,45	48 ± 0,1	30,7 ± 2,1
A193S	27 ± 1	15,8 ± 2,15	N.D.	N.D.
A193T	32 ± 1	18,2 ± 2,75	N.D.	N.D.
A193V	11 ± 2	4,8 ± 1,3	N.D.	N.D.
Enzima selvagem	21,9 ± 0,4	6,5 ± 0,46	13 ± 1	8,9 ± 0,71

Valores de IC₅₀ em comparação com a enzima selvagem.

Os dados apresentados são em média ± desvio-padrão (SD, *standard deviation*).

Abreviatura: N.D., não determinado.

Com base nos critérios previamente mencionados na seleção dos mutantes, foram encontrados 15 polimorfismos no sítio ativo da enzima para o nirmatrelvir e 13 para o ensitrelvir. A M^{Pro} age por meio da interação específica ao reconhecer e clivar determinadas sequências de aminoácidos nas poliproteínas virais, esse mecanismo de ação libera proteínas virais essenciais para a montagem do vírus. Devido a isso, alterações nos resíduos da enzima podem impactar sua habilidade de processar poliproteínas, afetando a replicação viral e a produção de proteínas cruciais para o vírus. Ademais, mutações em pontos chaves podem levar à resistência a antivirais, especialmente se afetarem a região que interage com inibidores, comprometendo a eficácia destes na inibição da enzima. Dos polimorfismos aqui testados, apenas os mutantes G143S, Q189K e A193V apresentaram uma redução significativa na eficiência enzimática quando confrontadas com o substrato fluorogênico.

O nirmatrelvir é um inibidor reversível M^{Pro} do SARS-CoV-2, desenvolvido pela Pfizer e projetado para concorrer com o substrato nos subsítios P1 e P2 da enzima (OWEN et al., 2021b). As mutações que afetam os resíduos do subsítio P2 que interage diretamente com o sítio ativo da enzima, M49 e M165, tiveram um efeito menor na atividade do nirmatrelvir, com aumento de 1,8 vezes na eficiência catalítica em relação a enzima selvagem. Um estudo conduzido por HU et al., 2023 revelou que as mutações M49, T135, N142, H164, M165 e Q189

são capazes de tolerar várias mutações sem causar um impacto significativo na atividade enzimática e na capacidade de inibição por drogas. Além disso o mesmo estudo demonstrou que a alteração no resíduo M165 de uma isoleucina, um aminoácido polar, para treonina, apolar, apresentou uma resistência significativa contra o nirmatrelvir, com aumento de quase 30 vezes o valor do K_i (HU et al., 2023). Contudo, nosso estudo mostrou que a depender da mutação nesses resíduos alterações significativas sobre a enzima podem ocorrer, principalmente com a mutação Q189K, com uma redução na eficiência enzimática e aumento de até 16 vezes na constante de inibição indicando uma menor afinidade entre a enzima e o nirmatrelvir. Além disso, pelos nossos resultados observamos que mutações menos conservadas em um determinado aminoácido tendem a exercer um impacto mais significativo nas constantes de inibição dos compostos. Isso é ilustrado pela comparação entre R188K e R188S, onde o aumento do K_i foi de 1,4 e 2,9 vezes, respectivamente. Em outro estudo que também considerou os impactos dos polimorfismos na M^{pro} , a substituição Q189K reduziu em até 65 vezes a atividade enzimática (LAMB, 2022).

O mutante R188K foi identificado como uma mutação não preocupante frente ao nirmatrelvir, exibindo uma das maiores eficiências relativas e uma constante de inibição menor. Isso sugere uma maior afinidade, o que significa que o nirmatrelvir apresenta uma eficácia superior diante dessa mutação. Por outro lado, a mutação G143S revelou um potencial de resistência ao nirmatrelvir, exibindo uma eficiência relativa menor e uma constante de inibição mais elevada. Isso evidencia que mutações nesse resíduo têm um impacto significativo na afinidade do nirmatrelvir com a enzima, exigindo uma quantidade maior do inibidor para competir com o substrato pelo sítio ativo.

O ensitrelvir é um inibidor não covalente e não peptídico da M^{pro} do SARS-CoV-2, desenvolvido pela farmacêutica Shionogi, que demonstrou potência promissora contra a enzima e uma alta seletividade para proteases de coronavírus (UNOH et al., 2022). Em nosso estudo, foram avaliados os efeitos de mutações únicas próximas ao sítio ativo da M^{pro} sobre a atividade inibitória do ensitrelvir. Os resultados indicaram que a maioria dos polimorfismos testados não afetou significativamente a eficácia inibitória do ensitrelvir. No entanto, os mutantes M49I, G143S e R188S foram associados a constantes de inibição diminuídas, sugerindo que esses resíduos mutantes são mais críticos para a atividade inibitória do ensitrelvir.

Diferentemente do nirmatrelvir, o ensitrelvir é aparentemente mais vulnerável a mutações que impactam o subsítio P2, como as mutações M49I e M49T. É possível que, devido à maior hidrofobicidade da isoleucina na cadeia lateral no complexo M49I com ensitrelvir, o inibidor seja deslocado para a cavidade P2, afetando assim sua capacidade inibitória. No estudo

de MOGHADASI et al, realizado em 2023, a mutação M49I foi examinada, assim como as mutações S144A e L167F, sendo todas consideradas críticas para a eficácia do ensitrelvir. Além disso, este estudo salienta a mutação E166V, que induz uma resistência consideravelmente alta ao nirmatrelvir e resistência de nível intermediário ao ensitrelvir.

Outra distinção notável nos padrões de resistência entre o ensitrelvir e o nirmatrelvir é a aparente capacidade do ensitrelvir de manter quase integralmente sua eficácia contra a variante mutante Q189K. O fato de o ensitrelvir reter quase a totalidade da sua eficácia contra o mutante Q189K, em contraste com o nirmatrelvir, é relevante clinicamente. Isso significa que o ensitrelvir pode ser uma opção mais eficaz de tratamento para variantes do vírus que apresentam essa mutação específica, enquanto o nirmatrelvir pode ter sua eficácia reduzida.

Os resultados indicam que o ensitrelvir pode ser efetivo em certas situações onde há resistência ao nirmatrelvir, e o inverso também pode ser verdadeiro. Isso se deve por apresentarem perfis de resistência variados contra um conjunto de variantes mutantes, o que pode ser atribuído às suas diferentes formas de ligação a M^{pro}. Em outras palavras, uma mutação que torna um vírus resistente a um dos compostos pode não comprometer a eficácia do outro. Ademais, um estudo dos complexos formados entre os inibidores e as variantes mutantes pode revelar detalhes valiosos sobre aspectos estruturais que promovem resistência. Este entendimento é fundamental para o desenvolvimento de novas gerações de inibidores da M^{pro} e para assegurar a continuidade da eficácia dos tratamentos atuais contra o SARS-CoV-2.

5. CONCLUSÃO

A análise dos inibidores nirmatrelvir e ensitrelvir revelou eficácia na inibição da principal protease (M^{pro}) do SARS-CoV-2, embora tenham sido identificados alguns polimorfismos associados a uma redução na capacidade de inibição desses medicamentos, como os mutantes G143S, Q189K, A193V para o nirmatrelvir e M49I, G143S, R188S para o ensitrelvir. Por outro lado, certos mutantes, como M165I, R188K e Q189K para o ensitrelvir, mostraram maior suscetibilidade a esse medicamento. Esses achados são essenciais não apenas para monitorar o surgimento de cepas resistentes do SARS-CoV-2, mas também para compreender a resistência aos inibidores, oferecendo pistas valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes contra o SARS-CoV-2. Esse trabalho foi recentemente publicado na *Journal of Biological Chemistry*, onde além dos dados enzimáticos e funcionais aqui apresentados nós discutimos os mecanismos estruturais com base na estrutura cristalográfica de nove desses polimorfismos em complexo com os fármacos de interesse (NOSKE et al., 2023), todas obtidas na nova linha de luz do SIRIUS (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas).

6. REFERÊNCIAS

AKINOSOGLU, K.; SCHINAS, G.; GOGOS, C. Oral Antiviral Treatment for COVID-19: a comprehensive review on nirmatrelvir/ritonavir. **Viruses**, v. 14, n. 11, p. 2540, 2022

CER, R. Z.; MUDUNURI, U.; STEPHENS, R.; LEBEDA, F. J. IC50-to-Ki: a web-based tool for converting ic50 to ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 441-445, 2009.

DAI, W. et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. **Science**, v. 368, n. 6497, p. 1331–1335, 2020.

F. WILLIAM, S. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

GORDON, D. E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, v. 583, p. 459–468, 2020.

GREASLEY, S. E. et al. Structural basis for the in vitro efficacy of nirmatrelvir against SARS-CoV-2 variants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 6, 2022.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, 2020.

HU, Q. et al. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. **MedComm**, v. 3, n. 3, 2022.

HU, Y. et al. Naturally Occurring Mutations of SARS-CoV-2 Main Protease Confer Drug Resistance to Nirmatrelvir. **ACS Central Science**, v. 9, n. 8, p. 1658–1669, 2023.

JIN, Z. et al. Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 27, n. 6, p. 529–532, 2020a.

JIN, Z. et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289–293, 2020b.

KAUSAR, S. et al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 35, 2021.

KHARE, S. et al. GISAID's Role in Pandemic Response. **China CDC Weekly**, v. 3, n. 49, p. 1049–1051, 2021.

LAMB, Y. N. Nirmatrelvir Plus Ritonavir: First Approval. **Drugs**, v. 82, n. 5, p. 585-591, 2022.

- LEE, J. et al. Crystallographic structure of wild-type SARS-CoV-2 main protease acyl-enzyme intermediate with physiological C-terminal autoprocessing site. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2020a.
- MENGIST, H. M.; DILNESSA, T.; JIN, T. Structural Basis of Potential Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 2021.
- MIZRAHI, B. et al. Longitudinal symptom dynamics of COVID-19 infection. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.
- NOSKE, G. D. et al. A Crystallographic Snapshot of SARS-CoV-2 Main Protease Maturation Process: SARS-CoV-2 Mpro maturation. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 18, 2021.
- NOSKE, G. D. et al. Structural basis of nirmatrelvir and ensitrelvir activity against naturally occurring polymorphisms of the SARS-CoV-2 main protease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 3, 2023.
- OWEN, D. R. et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. **Science**, v. 374, n. 6575, p. 1586–1593, 2021a.
- OWEN, D. R. et al. An oral SARS-CoV-2 M pro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. **Science**, v. 374, n. 6575, p. 1586-1593, 2021.
- RYU, Y. B. et al. SARS-CoV 3CLpro inhibitory effects of quinone-methide triterpenes from *Tripterygium regelii*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 6, p. 1873–1876, 2010.
- SINGH, R. S. et al. A comprehensive insight on the challenges for COVID-19 vaccine: A lesson learnt from other viral vaccines. **Heliyon** v. 9, n. 6, p. e16813–e16813, 2023.
- 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.
- 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.
- ULLRICH, S. et al. Main protease mutants of SARS-CoV-2 variants remain susceptible to nirmatrelvir. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 62, p. 128629–128629, 2022.
- 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.
- WU, A. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 3, p. 325–328, 2020.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

CHARALAMPOS ASLANIDIS; JONG. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.