

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación de las interacciones fármaco-proteína involucradas en el tratamiento del COVID 19. Proteínas presentes en el SARS-CoV-2 y en el genoma humano.**

**Leonardo Joshué Enríquez Martínez**

**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 17 de diciembre de 2021

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Evaluación de las interacciones fármaco-proteína involucradas en el tratamiento del COVID 19. Proteínas presentes en el SARS-CoV-2 y en el genoma humano.**

**Leonardo Joshué Enríquez Martínez**

**Nombre del profesor, Título académico**

**José Ramón Mora, PhD**

Quito, 17 de diciembre de 2021

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Leonardo Joshué Enríquez Martínez

Código: 00200541

Cédula de identidad: 1718900648

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

El SARS-CoV-2, causante de la pandemia tras su descubrimiento en el año 2019, ha tenido un impacto de salud, generando millones de contagios y muertes asociadas al COVID-19. La caracterización inmediata de proteínas estructurales y no estructurales, dio paso a que se realicen experimentos *in silico*, para determinar el mejor candidato para su tratamiento. Es crucial generar un tratamiento mediado por fármacos. Por ello, en este trabajo, se estudió las interacciones fármaco-proteína y con proteínas del genoma humano, para determinar el candidato ideal para el tratamiento del COVID-19, empleando proteínas virales como Mpro, Plpro y RdRp. Se empleó un cribado virtual, de varias data bases con evidencia científica, extrayendo 40 fármacos. Se realizó un acoplamiento molecular de los fármacos por cada proteína, dirigido al sitio activo. Los 40 fármacos fueron cargados al software ACID, obteniendo las interacciones con proteínas del genoma humano. Se empleó el cálculo del Índice de Selectividad, para filtrar los fármacos, empleando como modelo referencial la Mpro. Se realizó simulaciones, Dinámica Molecular para estudiar a profundidad los modelos obtenidos. Los resultados evaluados mostraron varias interacciones, como Puentes de Hidrógeno, Fuerzas de van der Waals, entre otras. Obteniendo que el candidato ideal corresponde a Digoxina, fármaco que se mantuvo en el sitio activo de la Mpro, durante los 200 ns. Por otro lado, el fármaco Mesilato de Nafamostat, se dirigió hacia una proteína presente en el genoma humano, acoplándose durante toda la Dinámica Molecular. Los cálculos de dinámica molecular mostraron ser esenciales para determinar el candidato ideal para el tratamiento del COVID-19, permite identificar que el acoplamiento molecular no es suficiente para dar conclusiones determinantes. Se encontró en este estudio que el mal manejo de fármacos, puede afectar a proteínas del genoma humano.

Palabras clave: Mpro, Plpro, RdRp, Acoplamiento Molecular, Dinámica Molecular.

## ABSTRACT

SARS-CoV-2, the cause of the pandemic after its discovery in 2019, has had a health impact, generating millions of infections and deaths associated with COVID-19. The immediate characterization of structural and non-structural proteins gave way to *in silico* experiments, to determine the best candidate for their treatment. Generating drug-mediated treatment is crucial. Therefore, in this work, drug-protein and protein interactions of the human genome were studied to determine the ideal candidate for the treatment of COVID-19, using viral proteins such as Mpro, Plpro and RdRp. A virtual screening was used, of several data bases with scientific evidence, extracting 40 drugs. A Molecular Docking of the drugs was carried out for each protein, directed to the active site. The 40 drugs were loaded into the ACID software, obtaining the interactions with proteins of the human genome. The Selectivity Index calculation was used to filter the drugs, using the Mpro as a reference model. Molecular Dynamics simulations were carried out to study in depth the obtained models. The evaluated results showed several interactions, such as Hydrogen Bridges, Van der Waals Forces, among others. Obtaining that the ideal candidate corresponds to Digoxin, a drug that remained in the active site of Mpro, during the 200 ns. On the other hand, the drug Mesylate Nafamostat, targeted a protein present in the human genome, acupluding itself throughout Molecular Dynamics. The Molecular Dynamics calculations showed to be essential to determine the ideal candidate for the treatment of COVID-19, it allows to identify that the Molecular Docking is not enough to give decisive conclusions. It was found in this study that the mishandling of drugs can affect proteins of the human genome.

Key Words: Mpro, Plpro, RdRp, Molecular Docking, Molecular Dynamics.

**TABLA DE CONTENIDO**

Introducción.....	11
Métodos .....	15
Cribado virtual.....	15
Acoplamiento molecular.....	15
Acoplamiento reverso.....	16
Índice de selectividad .....	16
Dinámica molecular.....	17
Resultados.....	18
Estudio del acoplamiento molecular de los 40 fármacos .....	18
Desarrollo del acoplamiento reverso .....	18
Índice de selectividad rehaciendo el acoplamiento reverso.....	19
Interacciones entre fármaco y proteína viral .....	19
Interacción fármaco y proteína seleccionas del genoma humano. ....	21
Análisis .....	22
Conclusiones.....	26
Tablas .....	27
Figuras .....	28
Referencias bibliográficas .....	34
Anexos.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de energía de unión de 40 fármacos para Mpro, Plpro y RdRp. 27

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del IS de los fármacos y proteínas del genoma humano.....	28
Figura 2. Interacciones Darunavir-Mpro.....	29
Figura 3. Interacción Hidrolasa Leucotrieno A-4 y Mesilato de Nafamostat. ....	30
Figura 4. Dinámica molecular del fármaco Digoxin-Mpro y Azitromicina-Mpro.....	31
Figura 5. Acople y desacople de los fármacos Digoxin-Mpro y Azitromicina-Mpro....	32
Figura 6. Acople y desacople de los fármacos Favipiravir-Plpro y Terbinafina-Plpro..	33

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Interacciones Fármaco-Proteína, modelo 2D.....	37
Anexo 2. RMSD para los fármacos estudiados .....	38

## INTRODUCCIÓN

El SARS-CoV-2, pertenece a la familia de los *Coronaviridae*, se caracteriza por ser un virus de envoltura y de poseer ARN monocatenario; ha tenido un gran impacto desde su descubrimiento en el año 2019, los casos de este virus se han expandido rápidamente por todo el mundo, siendo de esta manera el causante de la pandemia (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). Según cifras recientes, se han detectado más de 211,730,035 casos confirmados, con 4,430,697 muertes asociadas en varios países de los cinco continentes que están directamente relacionadas al COVID-19 (WHO, 2021). Dado el gran número de casos y el intento por poder combatir dicha enfermedad, se han intentado desarrollar tratamientos, medicamentos y vacunas.

A pesar de dicha lucha interminable el recorrido del virus ha tenido un gran impacto, generando nuevas variantes que actualmente recorren todo el mundo como es la alfa, beta, delta, gama y ómicron (Radcliffe, 2021).

La lucha por encontrar una vacuna y un tratamiento para el COVID-19, ha sido ardua, de esta forma ya a la actualidad se han desarrollado vacunas con una elevada tasa de confiabilidad. A pesar de dicho esfuerzo existen casos que han superado la inmunidad otorgada por la vacuna, por este motivo el desarrollo de un tratamiento mediado por fármacos es indispensable, lo cual aún no ha sido desarrollado y probado con éxito (Elmaaty et al., 2021). Durante el tiempo de la pandemia se han realizado varios estudios de la interacción que tienen los fármacos preexistentes para tratar el virus y el causante de este, a esta modalidad se la conoce como el reutilizamiento de fármacos, para este caso en específico se han destinado varios recursos para poder combatir las principales proteínas del virus como la E (Envoltura), S (Pico), M (Membrana), N (Nucleocápside) y de igual forma aquellas involucradas en la interacción del virus dentro del huésped

como la proteasa principal (Mpro), Papaína (Plpro) y otras como la ARN dependiente de ARN polimerasa (RdRp) (Calligari et al., 2020).

Los procedimientos para poder encontrar un fármaco ideal desde *in silico* permiten economizar recursos y tener un punto a favor debido a que se tienen resultados desde el punto químico que permiten tener una probabilidad elevada de llegar a la certeza, se ha recurrido a técnicas como es el acoplamiento molecular, la cual se basa en la interacción de un receptor y un ligando, siendo en este caso el receptor las proteínas del virus y el ligando el fármaco de interés, como producto se obtiene la probabilidad de unión y un valor que asevera su afinidad, de esta forma se puede observar la afinidad al sitio activo de la proteína del SARS-CoV-2 (Ahmed et al., 2021; Abdellatiif et al., 2021 ).

Al tener esta preocupación en salud pública de poseer un medicamento eficaz para el tratamiento del COVID-19, se ha recurrido a la reutilización de fármacos, de la mano de investigaciones y pruebas clínicas, pero es clave considerar que tan afines son estos medicamentos hacia la proteína diana o al tratamiento en específico que se quiera proporcionar, debido a que existe la posibilidad que pueda llegarse a dar una interacción inespecífica con las proteínas presentes en el huésped, generando problemas colaterales (Peng et al., 2021). Como solución a este problema, se han destinado softwares relaciones al acoplamiento molecular, en donde básicamente se emplea el mismo concepto; Se lo conoce como acoplamiento reverso, básicamente este sistema permite encontrar las interacciones que tienen los fármacos con otras proteínas presentes en el huésped, otorgando de esta forma los valores que discriminaran si este fármaco tiene una mayor afinidad al virus o a una proteína correspondiente del proteoma humano (Wang et al., 2019).

En la literatura, se han investigado varias formas de poder combatir el COVID-19, de forma efectiva. Siendo los ensayos más conocidos aquellos mediados por modelaciones,

empleando varios fármacos ya existentes, tales como antivirales conocidos en otros tratamientos como Ribavirin, Favipiravir, Darunavir, entre otros, aprovechando las ventajas de estos, debido a que se conoce ya su dosificación, toxicidad, farmacodinámica, farmacocinética entre otras características, reduciendo el tiempo de investigación (Zeitlinger et al., 2020).

En años recientes, las estrategias para poder redireccionar fármacos ya existentes, han jugado un rol crucial para diseñar fármacos para las diferentes enfermedades, como el Ebola, Hepatitis C, Zika y la que se vive actualmente con el SARS-CoV-2. En busca de un inhibidor ideal, existen métodos como la Dinámica molecular que es un método que permite generar una simulación en la computadora para poder observar las interacciones entre moléculas durante un tiempo fijo, siendo ventajoso a un laboratorio, debido a la manipulación del virus, incluso llegando a obtener resultados que no se pueden tener mediante dicho método, por este motivo la DM (Dinámica molecular), se ha convertido en uno de los métodos más comunes para investigar las interacciones biomoleculares y conformacionales (Srivastava et al., 2021).

Se han realizado durante este tiempo ya varias simulaciones entre proteínas del SARS-Cov-2 y fármacos, en donde ya se han encontrado varias vías que pueden ser eficientes en tener actividad farmacológica, se han identificado candidatos antivirales dirigidos al receptor del ACE2, encontrando que la timoquenina, de igual forma al estudiar el neondrografólido (AGP3), sugiriendo una efectividad para la infección por COVID-19 (Padhi et al., 2021). Por otro lado, existen estudios donde se han llegado a maximizar la dinámica molecular, tomando en cuenta el fármaco Resmdesivir y la RdRp, al medir los valores de RMSD se llegó a obtener picos elevados de 0.76, siendo esta la mayor fluctuación en la dinámica, mostrando que tiene un potencial inhibitorio y una fuerte capacidad de unión, dentro de este estudio incluso se tomó un complejo llamado MAW-

22, el cual superó los valores del fármaco ya mencionados, formando varios puentes de hidrógeno en la polimerasa (Hassab et al., 2020).

La actualidad en la que vivimos, y durante toda la fase de la pandemia en su máximo punto, surgieron varias problemáticas con respecto al tratamiento del COVID-19, y el causante del SARS-CoV-2, varias personas llegando a tener desde síntomas leves y otros muy graves. Al ser un virus totalmente nuevo, los tratamientos a este son limitados, dado esto se recurrió a usar varios de los fármacos que se encontraban disponibles al momento, recurriendo incluso a tratamientos poco fiables y probando varios fármacos nuevos. El objetivo principal de esta investigación es observar la afinidad que tienen estos tratamientos, es decir cómo se comportan estas sustancias en el cuerpo humano y que interacción llevan, si estos pueden llegar a ser beneficiosos o, al contrario.

## MÉTODOS

### **Cribado Virtual**

Se recopilaron 40 fármacos provenientes de varias data bases que tienen evidencia científica o publicaciones referentes al tratamiento que se tiene para el COVID-19, SARS-CoV-2. Dichos fármacos fueron descargados en formato PDB de la plataforma Drug Bank (<https://go.drugbank.com/>) y de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se descargó la estructura 3D del fármaco la que posteriormente fue revisada para no perder partes de la misma, y poder realizarse con efectividad los estudios de acoplamiento y dinámica molecular.

### **Acoplamiento molecular**

Se procedió a realizar el acoplamiento molecular en el programa AutoDock Vina 1.2.0, con la intención de obtener la energía de unión que se calcula automáticamente en el programa. De los valores obtenidos se selecciona el mejor valor que corresponde al más negativo o la mejor pose del ligando. Se obtiene un grupo de proteínas que pertenecen a las mejores interacciones entre el receptor que es la proteína viral y el ligando que es el fármaco, dichas estructuras conformacionales indican el posible lugar de unión que tienen, esperando que se acoplen de mejor manera al sitio activo de la proteína viral.

Se seleccionaron tres proteínas virales o receptores, Mpro (PDB ID: 6Lu7), Plpro (PDB ID: 6WUU), RdRp (PDB ID: 7BV2). Se procedió a preparar la estructura, empleando el programa PyMol, eliminando las moléculas de agua, ligandos naturales, dímeros y otras moléculas acopladas a la proteína principal. Los experimentos se corrieron usando primeramente una caja que cubra en su totalidad la proteína viral para poder observar todas las interacciones entre la proteína-ligando y luego se fue acortando la caja

dirigiéndose al sitio activo de la proteína. El ligando y la proteína fueron convertidos a formato pdbqt usando AutoDock tools 1.5.6. Los parámetros empleados fueron los estándares que brinda el programa. Para poder visualizar la estructura final y sus interacciones se empleó el programa Discovery Studio Visualizer 21.0.1 y para confirmar dichas interacciones se empleó el programa PyMol.

### **Acoplamiento reverso**

Tras obtener los resultados del acoplamiento molecular, se procedió a ingresar los 40 fármacos a la plataforma ACID (<http://chemyang.ccnu.edu.cn/>), con la intención de realizar un acoplamiento reverso y obtener de esta forma a que proteínas del proteoma humano tienen afinidad los fármacos seleccionados. El repositorio que emplea el programa es Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Al finalizarse las corridas se obtuvo, las posibles interacciones, se tomó las cinco mejores, basándose en su afinidad por el valor la energía de unión y la mejor pose. Se procedió a realizar un acoplamiento molecular para poder validar los resultados obtenidos en la plataforma, en este caso se destinó una caja que abarque toda la proteína a la que se puede pegar el fármaco, para evidenciar de forma general sus interacciones.

### **Índice de selectividad**

Al culminar los cálculos del acoplamiento molecular, se procede a estimar el Índice de Selectividad (IS), por el cual se podrá filtrar de tal forma que, los fármacos más afines y los que no son afines a las proteínas virales, podrán ser diferenciados usando como modelo referencial el valor de la energía de unión correspondiente a la Mpro. Para poder observar las diferencias que se tiene dentro de la lista de fármacos, aquellos que se encuentren por arriba del índice de selectividad de la Mpro, serán considerados como

afines a las proteínas tratadas, por otro lado, aquellos valores de las proteínas humanas que sean mayores al IS, serán considerados como fármacos no ideales. Basado en el cálculo se podrá filtrar los fármacos de interés y aquellos que no son recomendables para proceder a emplearse para el COVID-19, basado en sus interacciones.

### **Dinámica molecular**

Para poder estudiar a fondo los resultados del acoplamiento molecular, se emplearon técnicas de dinámica molecular. Para el cálculo se usó la proteína viral limpia, y el ligando obtenido del acoplamiento molecular y del acoplamiento reverso, respectivamente para cada caso. Para proceder a las simulaciones se empleó el programa MobaXterm, programa mediante el cual se conectó al servidor en donde se realizaron las simulaciones computacionales, se construyó la topología de la proteína, y para poder generar los parámetros de la topología del ligando se empleó el programa ACPYPE server (<https://www.bio2byte.be/acpype/>). Para evaluar la calidad de las simulaciones se tomó en cuenta la representación gráfica del tamaño de la caja, la densidad, la temperatura, la presión, la energía potencial y el volumen de los sistemas en relación al tiempo de la simulación, el cual corresponde a 200 ns.

## RESULTADOS

### Estudio del acoplamiento molecular de los 40 fármacos

El conjunto de los 40 fármacos, y las proteínas virales escogidas, Mpro, Plpro y RdRp, fueron corridas en el programa AutoDockTools 1.5.6 y AutoDock Vina 1.2.0. Cada fármaco fue calculado, para cada proteína, los cuales se encuentran en la Tabla 1, organizados del más negativo al menos negativo, siendo el más negativo el de interés debido a las posibles interacciones presentes entre el ligando y el receptor. Adicionalmente, la energía de unión predice termodinámicamente el mejor acople basándose en la interacción entre ambas moléculas, basado en los resultados se procedió a estudiar sus interacciones, junto con el acoplamiento reverso, para observar las interacciones con el proteoma humano.

### Desarrollo del acoplamiento reverso

Al culminar el estudio del acoplamiento molecular, se procedió a cargar los 40 fármacos al software ACID. El acoplamiento reverso, permite observar la afinidad que puede tener el fármaco a otras proteínas del genoma humano, de forma específica como: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, proteínas de transporte, señalización, ligasas, proteínas de transcripción, proteínas inmunes, proteínas de membrana, proteínas de adición celular. Tomando en cuenta la energía de afinidad, se recopilieron las 5 mejores interacciones, basado en la energía de unión, siendo este el factor elemental para el presente estudio.

## **Índice de selectividad rehaciendo el acoplamiento reverso**

Al tener los resultados del acoplamiento reverso, se obtuvo 22 resultados de los 40 fármacos y por razones de tiempo no se pudieron incluir en la presente investigación los resultados de los 18 sistemas restantes, los cuales serán incluidos en futuros trabajos. Para validar los resultados obtenidos del acoplamiento molecular, se procedió a realizar los cálculos respectivos en AutoDock Vina 1.2.0, de esta forma se puede hacer una comparación y validación entre los sistemas obtenidos usando exactamente la misma metodología en ambos. Seguidamente en el presente trabajo nos hemos planteado el cálculo del índice de selectividad, el cual nos permite establecer una tendencia de los resultados y como estos varían entre el acoplamiento molecular entre las proteínas virales y aquellas obtenidas en el análisis del acoplamiento reverso obtenido de la plataforma.

La tendencia encontrada en función del índice de selectividad, se pueden evidenciar en la Figura 1, en su mayoría de los casos la molécula presenta una interacción favorable con la Mpro (proteína referencia). Los fármacos evaluados son Azitromicina, Digoxin, Darunavir, Anakinra, Bazedoxifene, Hidroxicloroquina, Ceritinib, Digitoxin, Nelfinavir, Isoosajin y Niclosamida, Ribavirin, Terbinafina, Osimertinib y Faviparivir. Por otro lado, se encontró que existen interacciones que están por arriba del índice de selectividad de la Mpro, estos valores van direccionados a interacciones con proteínas humanas, como es el caso de los fármacos Camostat, Mesilato de Nafamostat, Tetradrine y Nitazoxanida.

## **Interacciones entre fármaco y proteína viral**

En base a los valores definidos en el índice de selectividad se escogieron 9 fármacos debido a que son considerados como potenciales candidatos inhibidores de las proteínas virales escogidas. Esta selección tomo en consideración el valor de energía de unión y el

índice de selectividad calculado. Los cuales fueron destinados a realizarse dinámica molecular, para poder estudiar a fondo sus interacciones.

El producto del acoplamiento molecular, se visualizó, en Discovery Studio Visualizer y PyMol, Mediante los softwares empleados fue posible distinguir las interacciones que tienen, como son los Puentes de Hidrógeno (PH), entre otras, y con que aminoácido interactúan, mediante una gráfica 2D. El acople que tiene el ligando generado, a la proteína, se encuentra en el Anexo 1.

Dentro del estudio realizado, el fármaco Darunavir, al cual se le realizó un acoplamiento molecular con la Mpro. El ligando se encuentra en la Figura 2 (a) y (b) de color azul en relación con la proteína viral, los residuos de los aminoácidos que tienen interacción se encuentran en la misma Figura literal (c). El índice de selectividad de este fármaco corresponde a 1 con referencia a la Mpro, como se muestra en Figura 1 (a), siendo este un fármaco ideal para el COVID-19. Las interacciones más representativas de esta interacción corresponden a los puentes de hidrógeno, los aminoácidos involucrados son HIS 41, THR25, LEU 141 Y GLY 143, de igual forma se encuentran interacciones pi-alquilo con los aminoácidos MET 165, CYS 145 y LEU 27, finalmente se presentan varias interacciones de van de Waals.

Con respecto a las interacciones encontradas entre el fármaco Digoxin y la Mpro, las principales corresponden a tres puentes de hidrógeno con los residuos de los aminoácidos SER 46, ASN 142 y GLI 143, y se observan fuerzas de van der Waals (12) e interacciones Pi-Alquilo (4).

El resultado del acoplamiento molecular de la proteína viral Mpro y el fármaco Azitromicina, que tiene un índice de selectividad de 1, lleva interacciones de van der Waals, las más fuertes siendo los puentes de hidrógeno en los aminoácidos THR 24, ASN

142 y GLN 189, de igual manera se pueden observar varias interacciones Pi-alquilo con los residuos CYS 145, HIS 163 y 41, MET 49.

Las principales interacciones, entre el resultado del acoplamiento molecular entre Nelfinavir y Mpro, resulta en las fuerzas de van der Waals siendo 17, se formaron puentes de hidrógeno con los aminoácidos HIS 41, GLY 143 y MET 165, entre otras interacciones.

Los resultados muestran que la interacción del fármaco Favipiravir y Plpro, forman puentes de hidrógeno en los aminoácidos TYR 56, TYR 72, ALA 135 y ARG 138, se pudo observar fuerzas de van der Waals (6) y enlaces pi-alquilo en el residuo ALA 135.

Se caracterizaron varias interacciones entre el fármaco Osimertinib y Plpro como son los puentes de hidrógeno en los aminoácidos ASP 164 y TYR 264, existen fuerzas de van der Waals (11) y enlaces Pi-alquilo en los aminoácidos CYS 111, PRO 248 y TYR 273.

### **Interacción fármaco y proteína seleccionas del genoma humano.**

Tras culminar la revisión de las interacciones fármaco-proteína viral, se encontró, la proteína Leucotrieno A-4 Hidrolasa en relación con el fármaco Mesilato de Nafamostat, teniendo un índice de selectividad de 1,37, recayendo en la clasificación de fármaco alarmante para el tratamiento del COVID-19, debido a que se encuentra por encima de modelo referencial. La interacción prominente corresponde a, un puente de hidrógeno con el aminoácido ARG 568 y se evidencia interacciones de van der Waals (13), enlaces Pi-Anion y Pi-Cation en los aminoácidos GLU 325 y LYS 565 respectivamente. Para poder profundizar su interacción se procedió a realizar una dinámica molecular del resultado del acoplamiento molecular, tomando la mejor pose entre la proteína hidrolasa Leucotrieno A-4 y el fármaco Mesilato de Nafamostat. Es posible observar en la Figura 3 (a), como el fármaco ingresa a la proteína y las interacciones de igual manera, en donde se muestra el puente de hidrógeno formado en el aminoácido ARG 568 (b).

## ANÁLISIS

Como se describió en la metodología, los 9 fármacos tomados, fueron acoplados a la Mpro, Plpro y RdRp, tomando en cuenta la mejor pose que corresponde a energía de unión más negativa, el acople fue direccionado al sitio activo de la proteína viral y para el caso de la proteína humana la caja envolvió a toda la proteína. Los valores del acoplamiento para el caso de la Mpro, van de -4,9 a -13,5 kcal/mol, en la Plpro va desde -5,3 a -12,8 kcal/mol y finalmente para la RdRp -5 a -13,7 kcal/mol, esto demuestra que existe la posibilidad de que el conjunto de fármacos puede encajar en los sitios activos de las proteínas virales, e inhibiendo su actividad dentro del huésped. Los cálculos realizados, con respecto al acoplamiento molecular son similares a estudios pasados, en donde se emplearon dichos fármacos, validando las coordenadas para poder acoplar el fármaco al sitio activo de la proteína de forma experimental, usando varias de las poses del cálculo realizado (Cuestas et al., 2021).

Basado en el estudio del acoplamiento molecular, de los 9 fármacos estudiados, Digoxin y Nelfinavir presentan los valores más favorables siendo -11,4 y -8,8 kcal/mol para Mpro, -10,4 y -7,8 kcal/mol para Plro, -10,2 y -7,5 para RdRp, respectivamente. De igual manera, estos valores son comparables con el índice de selectividad calculado, delimitando que estos se dirigen hacia las proteínas virales ya mencionadas anteriormente. En relación a lo mencionado, se encontró que el fármaco que forma más puentes de hidrógeno (PH) corresponde a Darunavir, con 4 PH y 21 interacciones, seguido a este se encuentra Faviparivir con 4 PH y 7 interacciones, Nelfinavir con 3 PH y 24 interacciones, Digoxin con 2 PH y 22 interacciones, Osimertinib forma 2 PH y tiene 18 interacciones, Niclosamida con 1 PH y 9 interacciones, Nafamostat forma 1 PH y 19 interacciones, finalmente el fármaco Terbinafina no forma PH, pero tiene 15 interacciones.

Es crucial realizar un acoplamiento molecular para entender las diferentes interacciones que tienen las moléculas y como pueden o no encajar en el sitio activo, pero no es suficiente para poder determinar un candidato como tal, de esta forma se debe realizar un análisis más profundo, que corresponde a la dinámica molecular (DM) (Leach, 2007). Dentro del estudio, la DM se divide en dos, la primera corresponde para las proteínas viral Mpro y Ppro, y y la segunda para la DM del acoplamiento reverso, producto del genoma humano y el fármaco de interés.

El análisis profundo realizado, partió con las simulaciones, tomando en cuenta la primera parte, correspondientes a la DM para la Mpro, empleando los fármacos Digoxin, Azitromicina, Darunavir, Nelfinavir y Niclosamida, para el complejo RMSD en la mayoría de los casos no se mantuvo estable, presentando varias fluctuaciones a lo largo de la simulación, para el caso del Digoxin los valores fueron alrededor de 0,2 nm, se puede evidenciar en la Figura 4 (a), mientras que para Nelfinavir los valores oscilan en 0,3 nm, el número máximo de PH para estos dos corresponde a 8 y 6 respectivamente. Dentro de la simulación se llegan a formar 3 PH promedio, mientras que en el caso de Nelfinavir se generan 2 PH promedio. Los fármacos restantes llegan a formar 1 PH promedio, en el caso de Niclosamida el valor máximo de PH es 4, de igual forma en Azitromicina se forman 4 PH, en Darunavir se llega a formar hasta 7 PH en un punto de la DM. De esta manera mostrando que, en comparación de los 5 fármacos direccionados hacia la Mpro, el Digoxin sería una de las moléculas con las interacciones más fuertes, debido a que no tiene oscilaciones prominentes en su RMSD, a diferencia de los otros fármacos como es el caso de Azitromicina, el cual tiene ondulaciones prominentes lo que nos da a conocer que el fármaco se desacopló del sitio activo de la Mpro (Figura 5 b). Para validar el tiempo que el fármaco se mantuvo acoplado a la proteína viral, se evaluó la interacción que tiene durante los 200 ns de la DM, partiendo con el fármaco Digoxin y

Mpro, el cual durante los 200 ns se mantiene en el sitio activo de la Mpro, esto se puede evidenciar en la Figura 5 (a). Por otro lado, al tomar la DM entre la Mpro y la Azitromicina, es posible observar como el fármaco se desplaza totalmente del sitio activo de la proteína, al inicio de la DM, por este motivo se observa en su RMSD una fluctuación prominente (Figura 5 (b)).

Retomando las DM, los sistemas evaluados de la Ppro, corresponden a los fármacos Faviparivir, Terbinafine y Osimertinib en estos casos el RMSD no tiene oscilaciones fuertes, a diferencia de los fármacos discutidos anteriormente, teniendo valores de 0.015, 0.2, y 0.24 nm, el comportamiento de estos fármacos indica que tienen una fuerte interacción, tomando en cuenta que la cantidad de PH promedio que se forman para Faviparivir que en promedio llegan a 2 y el máximo que se forman durante la DM corresponde a 15, Osimertinib si forma PH, alrededor de 1, el candidato Terbinafina es considerado uno de los que tiene menor probabilidad de llegar a alterar la actividad de Ppro, debido a que el valor promedio de PH corresponde a 0, mientras que dentro de la simulación el valor de PH que llega a tener es de 1, vale mencionar que este fármaco desarrolla otras interacciones como fuerzas de van der Waals y Pi alquilo. Estos resultados son respaldados tras observar su trayectoria durante los 200 ns de la DM, en el caso del fármaco Terbinafina, este se desacopla del sitio activo, durante los primeros ns de la DM, al tener este inmediato no tiende a formar PH y sus interacciones son bajas (Figura 6 (b)), a pesar de que Osimertinib llega a formar PH, este se desacopla al inicio de la DM y al culminarse ronda cerca del sitio activo, pero no toca la proteína viral. Por otro lado, el fármaco Favipiravir, el cual, si llega a formar PH, se mantiene acoplado a la Ppro, pero no llega a tener mayor interacción, que la mencionada anteriormente, debido a que no se encuentre acoplado en el sitio activo de la proteína (Figura 6 (a)).

Para finalizar el estudio, el acoplamiento inverso, correspondiente al fármaco Nafamostat y la proteína humana Leucotrieno A4 Hidrolasa, la DM muestra que durante la simulación esta oscila por 0,2 nm, formando HB promedio alrededor de 2, y el número mayor que llegan a tener de HB durante la simulación es de 13. Es decir, que el acoplamiento molecular si justifica indagar acerca de la actividad que tiene este fármaco hacia esta proteína presente en el genoma humano, debido a que principalmente se la dirigía hacia el COVID-19. Se han destacado estudios, en donde este fármaco tienen una posible actividad en contra de la Plpro, incluso se relata que existe la posibilidad de neutralizar las proteínas de pico del SARS-CoV-2, con referencia a la Plpro el RMSD obtenido es relativamente estable, al tener esta desviación existe la posibilidad de que interactúe con otras proteínas el fármaco, debido a que al realizarse la simulación con 100 ns, existe la posibilidad de que el fármaco se desacople del sitio activo, en este caso se dirigiría a la proteína que se menciona en este estudio (Bhowmik et al., 2021).

Basándose en el presente estudio, durante los 200 ns de la DM, se puede observar que la proteína Leucotrieno A4 Hidrolasa, llega a interactuar con el fármaco en su sitio activo, en donde el fármaco Nafamostat tiene ligeras fluctuaciones y no se llega a desacoplar de la proteína. De esta forma indicando que el tratamiento dirigido con este fármaco debe ser revisado, para evitar un tratamiento fuera de rango, como es posible en este caso (Figura 3).

## CONCLUSIONES

Los fármacos empleados para el presente estudio, han demostrado tener actividad biológica en las proteínas escogidas, Mpro, Plpro y RdRp. Basándose en los cálculos de acoplamiento molecular, los valores de la energía de unión que van desde -5.3 a -13.7, lo cual puede interpretarse que todos los compuestos tomados para el estudio poseen actividad hacia las proteínas virales. Mediante la dinámica molecular realizada, se identificó si los fármacos, se mantienen dentro del sitio activo o se mueven durante la simulación. Los 9 fármacos, llegan a tener actividad en el sitio activo de la proteína viral, sin embargo, no es efectiva, como es en el caso de Azitromicina, Darunavir, Nelfinavir y Niclosamida, durante la DM, estos se desacoplan del sitio activo. Con referencia a los fármacos evaluados para la Plpro, Faviparivir, Terbinafine y Osimertinib, no son efectivos para mantener una interacción duradera durante la DM, a pesar de que los fármacos estudiados logran caber momentáneamente en el sitio activo y formar interacciones no es suficiente para llegar a inhibir a Mpro, Plpro y RdRp. Con respecto a Digoxin, el cual resulta ser desde el inicio un candidato potencial, basado en el acoplamiento molecular y la DM, muestran interacciones fuertes y este llega a mantenerse en el sitio activo de la proteína Mpro, la Digoxina si podría usarse para el tratamiento del COVID-19. En cuanto al fármaco Mesilato de Nafamostat, basado en su acoplamiento molecular e IS, se dirige a una proteína del genoma humano como es Leucotrieno A4 Hidrolasa, se identifica que el incorrecto uso de fármacos puede causar consecuencias al huésped. Finalmente, para estudios futuros, se recomienda emplear un diferente software para emplear el acoplamiento reverso, para poder obtener resultados en un corto tiempo y poder continuar con los complejos restantes, de esta forma poder analizar la actividad que tienen los fármacos hacia la RdRp, proteína que fue tomada en cuenta, dentro de este estudio.

## TABLAS

Tabla 1. Valores de energía de unión de 40 fármacos para Mpro, Plpro y RdRp.

Energía de unión de proteínas SARS-COV-2							
Fármacos	Mpro	Plpro	RdRp	Fármacos	Mpro	Plpro	RdRp
Ivermectina	-13,5	-12,8	-13,7	Nitazoxanide	-6,5	-6,2	-6,1
Azitromicina	-7	-6,1	-6,4	Tetrandrine	-7	-7,6	-8,6
Darunavir	-7,7	-7,4	-7,3	Talidomida	-7	-7,1	-6,7
Teicoplanina	-11,9	-11,2	-11,9	Ritonavir	-7	-6,8	-6,9
Digitoxin	-11,5	-10,5	-11	Losartan	-6,9	-7,7	-6,1
Digoxin	-11,4	-10,4	-10,2	Anakinra	-7,3	-6,5	-7,1
Remdesivir	-9,3	-9,5	-9	Cinacalcet	-6,9	-5,3	-5,3
Umifenovir	-9	-8,2	-8	Niclosamida	-7,4	-6,8	-6,5
Isoosajin	-8,6	-7,9	-7,8	Oxyclozanide	-6,6	-6,9	-6,4
Lapinivir	-8,2	-9,7	-9,7	Mesilato de Camostat	-6,6	-6,9	-6,3
Nelfinavir	-8,8	-7,8	-7,5	Famotidina	-6,5	-6,2	-6,2
Ceritinib	-8,4	-7,3	-8,1	Ribavirin	-6,2	-6,6	-6
Proscillaridina	-8	-8,2	-9,1	Dronedarona	-6,4	-5,7	-6,3
Mesilato de Nafamostat	-8	-7,7	-7,4	Hexaclorofeno	-6,1	-6,9	-6,2
Bazedoxifeno	-7,9	-7,4	-6,7	Terbinafine	-6	-6,7	-7,2
Emetina	-7,8	-6,6	-7,2	Hidroxiclороquina	-5,8	-5,6	-5
Praziquantel	-7,3	-6,7	-7,3	Favipiravir	-4,9	-5,4	-5,1
Thiordazine	-7,3	-6,4	-6,5	Oseltamivir	-5,9	-6,2	-6,2
Cobicistat	-7,3	-6,2	-6,4	Procainamida	-5,8	-5,5	-5,2
Osimertinib	-6,8	-7,1	-7,6	Petidina	-5,6	-5,3	-5,4

Descripción de la tabla: En la tabla se muestra los valores que corresponden a la energía de unión tomados de las corridas de AutoDock Vina y AutoDockTools. Por cada fármaco se muestra dicho valor, en relación a las corridas por cada proteína viral, se puede visualizar el más negativo en la tabla, siendo este el más favorable para el estudio.

## FIGURAS

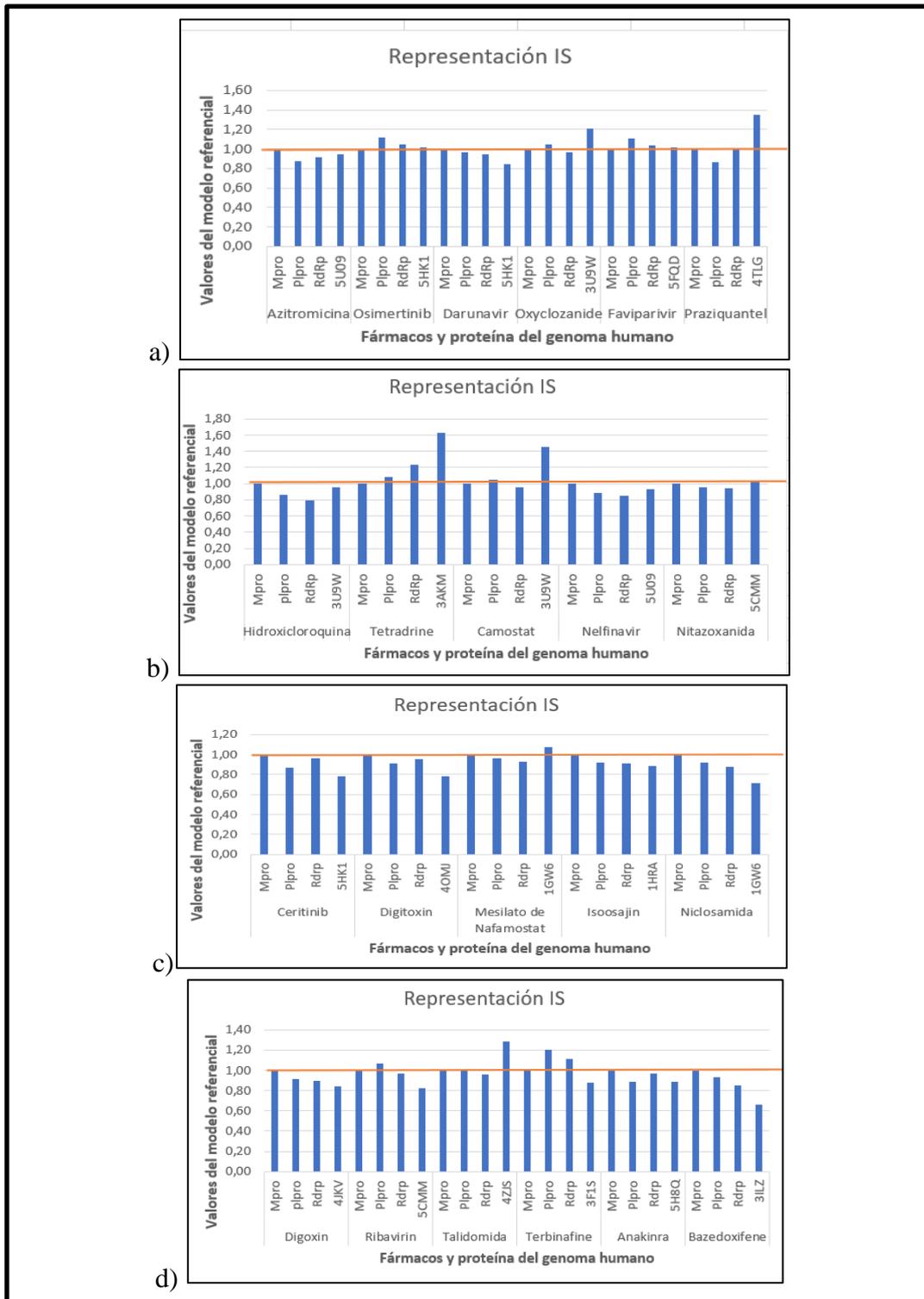


Figura 1. Representación gráfica del IS de los fármacos y proteínas del genoma humano.

Descripción de la Figura 1. En la figura se muestran 4 gráficas a,b,c y d, que corresponden al total de los 22 fármacos, que completaron las corridas del acoplamiento reverso. Por cada fármaco se observa las tres proteínas virales y la proteína humana, basado en el modelo referencial, ilustrado en la línea tomate.

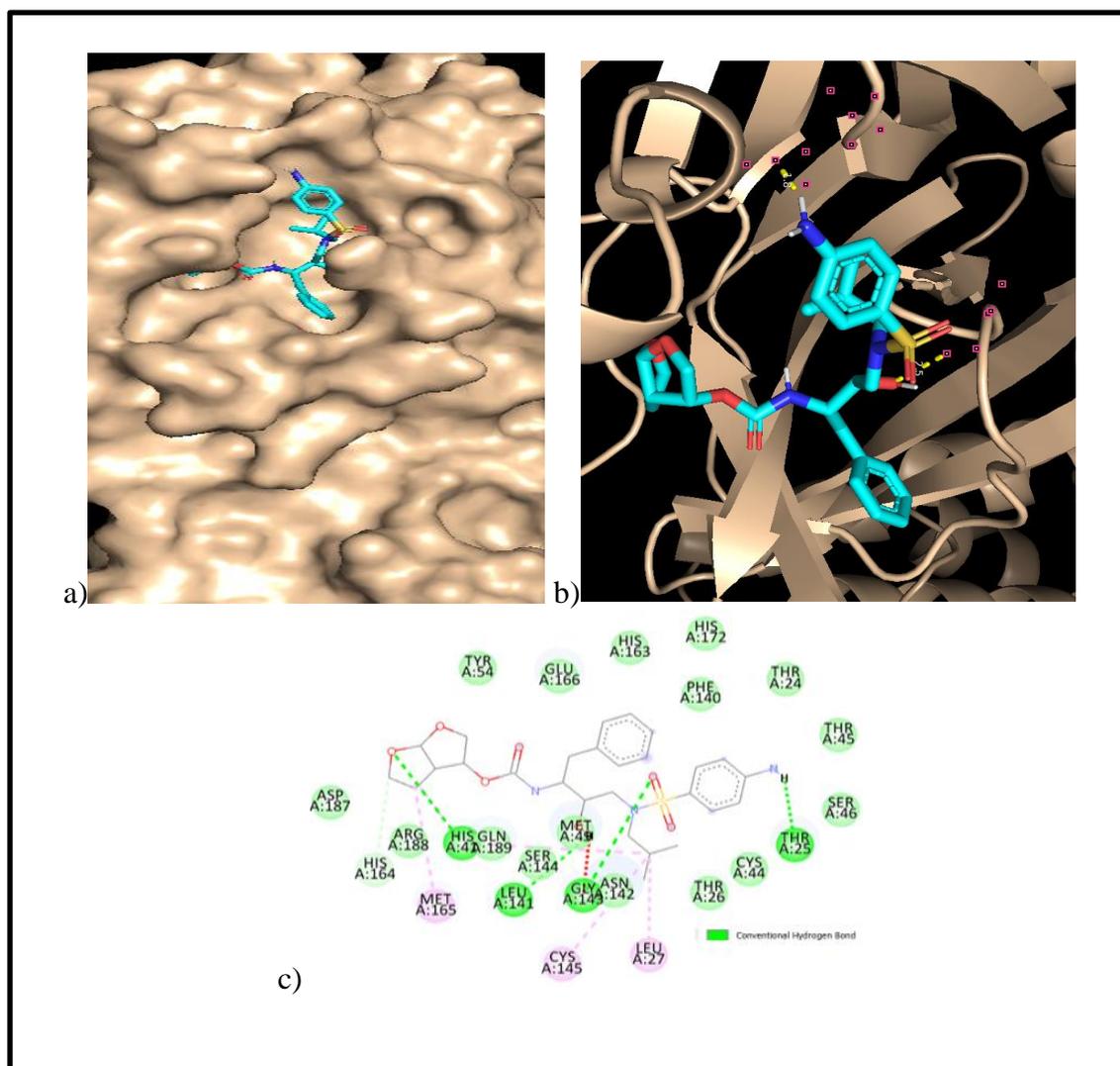


Figura 2. Interacciones Darunavir-Mpro.

Descripción de la Figura 2. Acoplamiento molecular del fármaco Darunavir, con la Mpro del COVID-19 (PDB ID: 6LU7) (a) Ilustración del mejor acople del ligando, se observa

en azul. (b) residuos de aminoácidos envueltos en la interacción del ligando (líneas amarillas entrecortadas) (c) interacciones del fármaco a la Mpro.

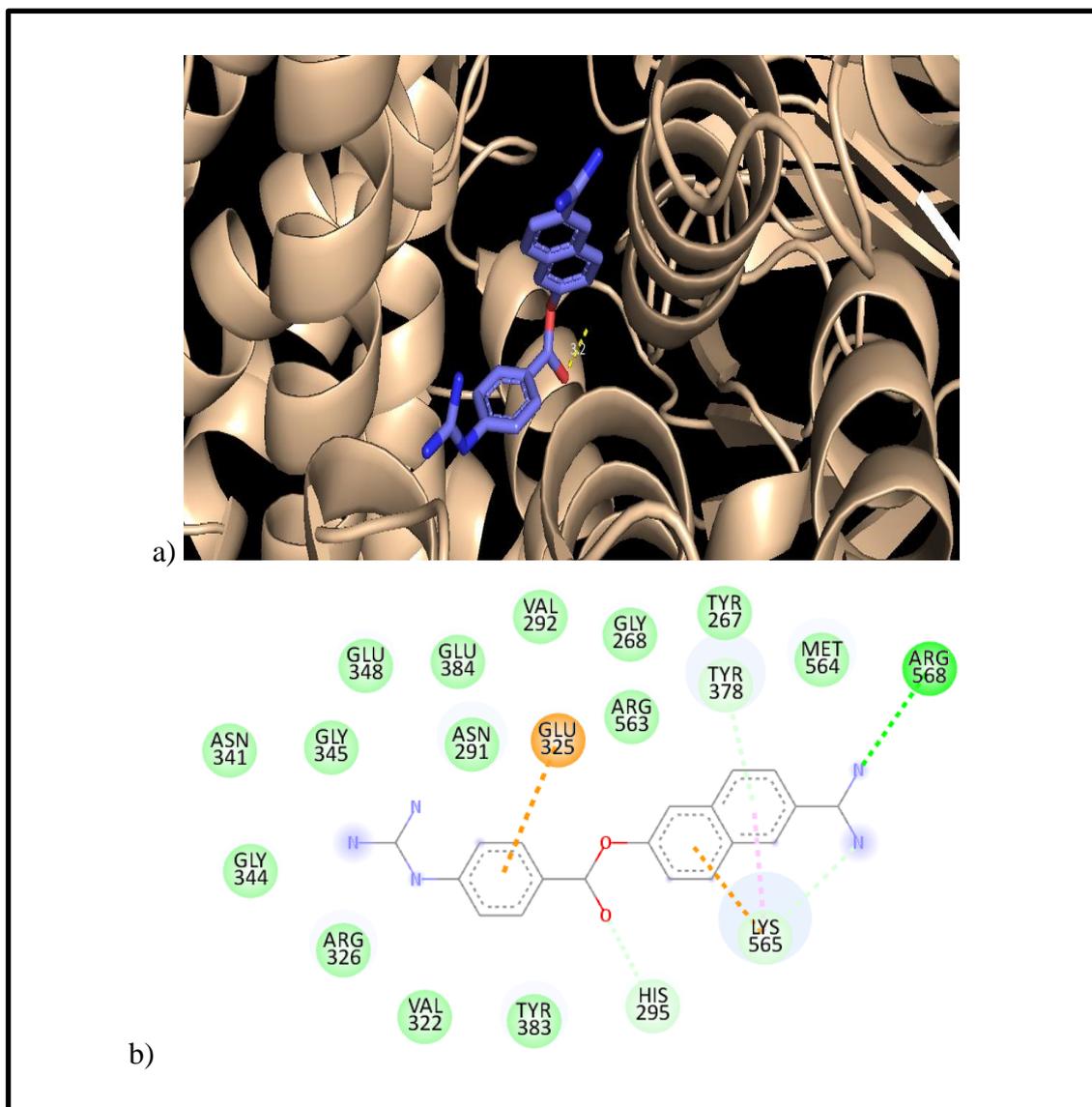


Figura 3. Interacción hidrolasa Leucotrieno A-4 y Mesilato de Nafamostat.

Descripción de la Figura 3. Acoplamiento reverso del fármaco Mesilato de Natamostat, con hidrolasa Leucotrieno A-4 del genoma humano (PDB ID: IGW6) (a) Ilustración del mejor acople del ligando, se observa en azul, los residuos de aminoácidos envueltos en la interacción del ligando (líneas amarillas entrecortadas) (b) interacciones del fármaco a la proteína humana, en verde oscuro el puente de hidrógeno.

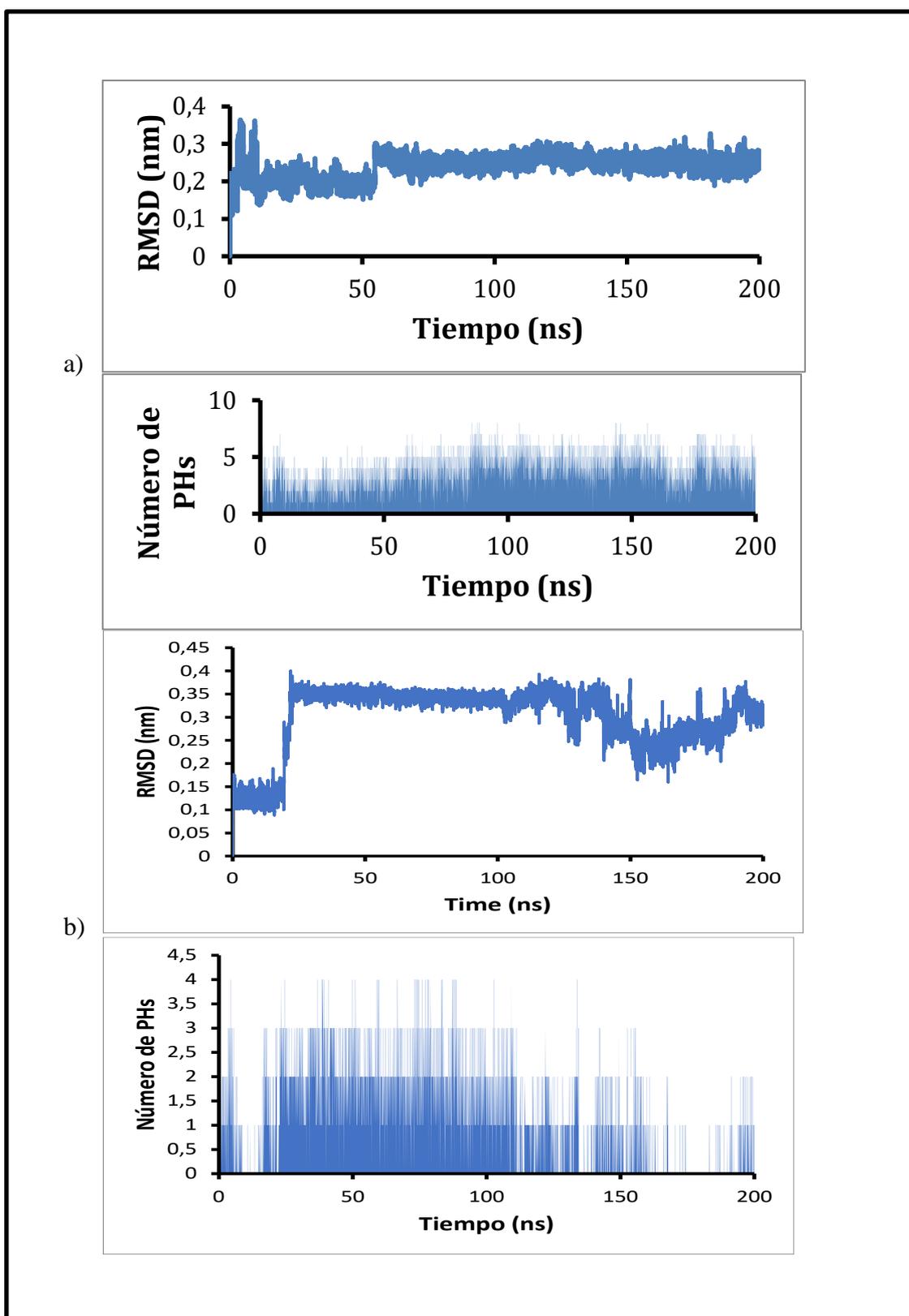


Figura 4. Dinámica molecular del fármaco Digoxin-Mpro y Azitromicina-Mpro.

Descripción de la Figura 4. En la figura se muestra cuatro gráficas, (a) RMSD entre el fármaco Digoxin y la proteína viral Mpro; Ilustración de la cantidad de HB que se

forman durante la dinámica molecular. (b) RMSD entre el fármaco Azitromicina y la proteína viral Mpro; Ilustración de la cantidad de HB que se forman durante la dinámica molecular. Ambas gráficas contemplan la dinámica molecular realizada durante los 200 ns.

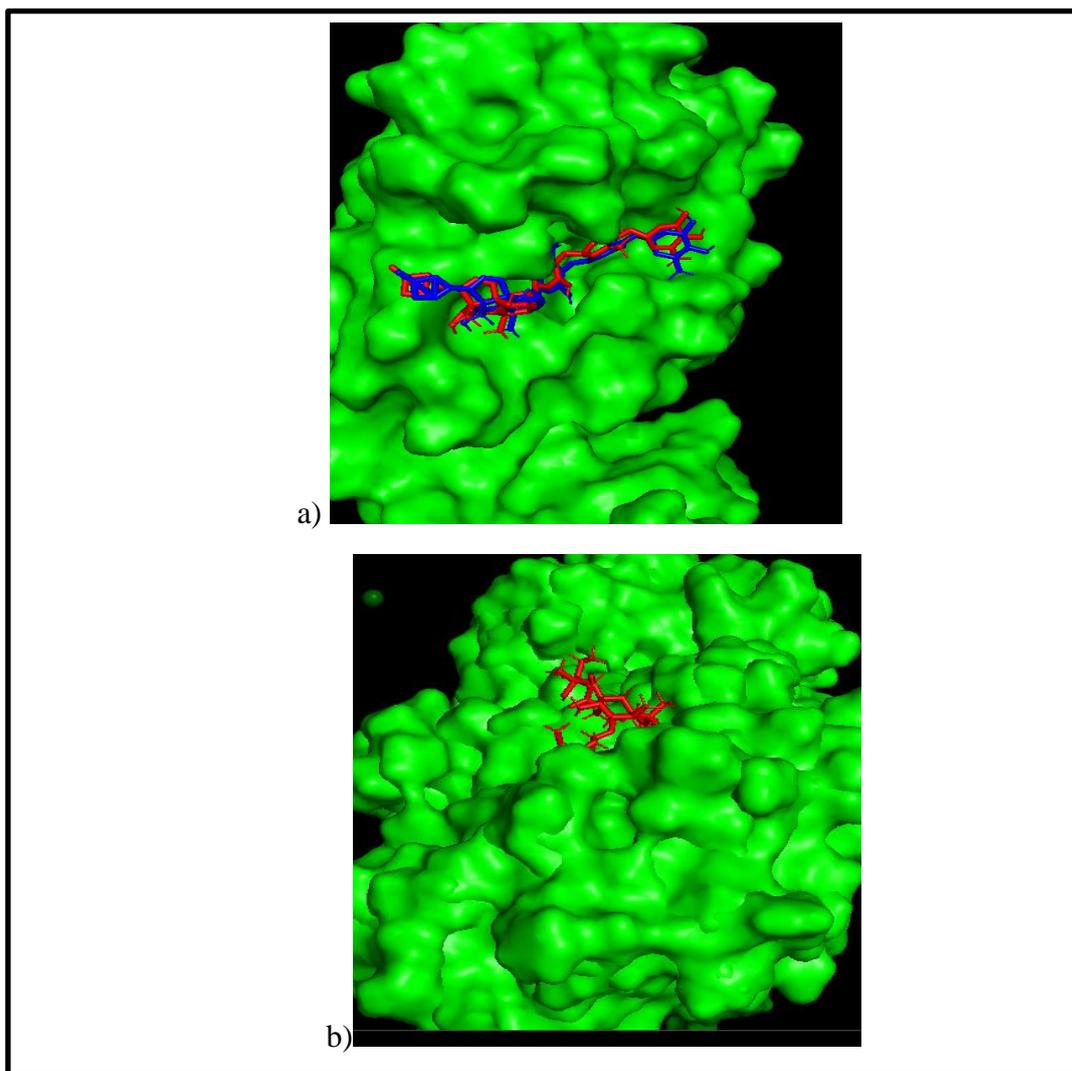


Figura 5. Acople y desacople de los fármacos Digoxin-Mpro y Azitromicina-Mpro.

Descripción de la Figura 5. (a) Se observa la proteína Mpro en verde, acoplado a el fármaco Digoxin, en azul al inicio de la DM y en rojo al final de la DM. (b) El fármaco Azitromicina, se encuentra en rojo a los 200 ns, mientras que al inicio de la DM se encuentra fuera de la proteína viral.

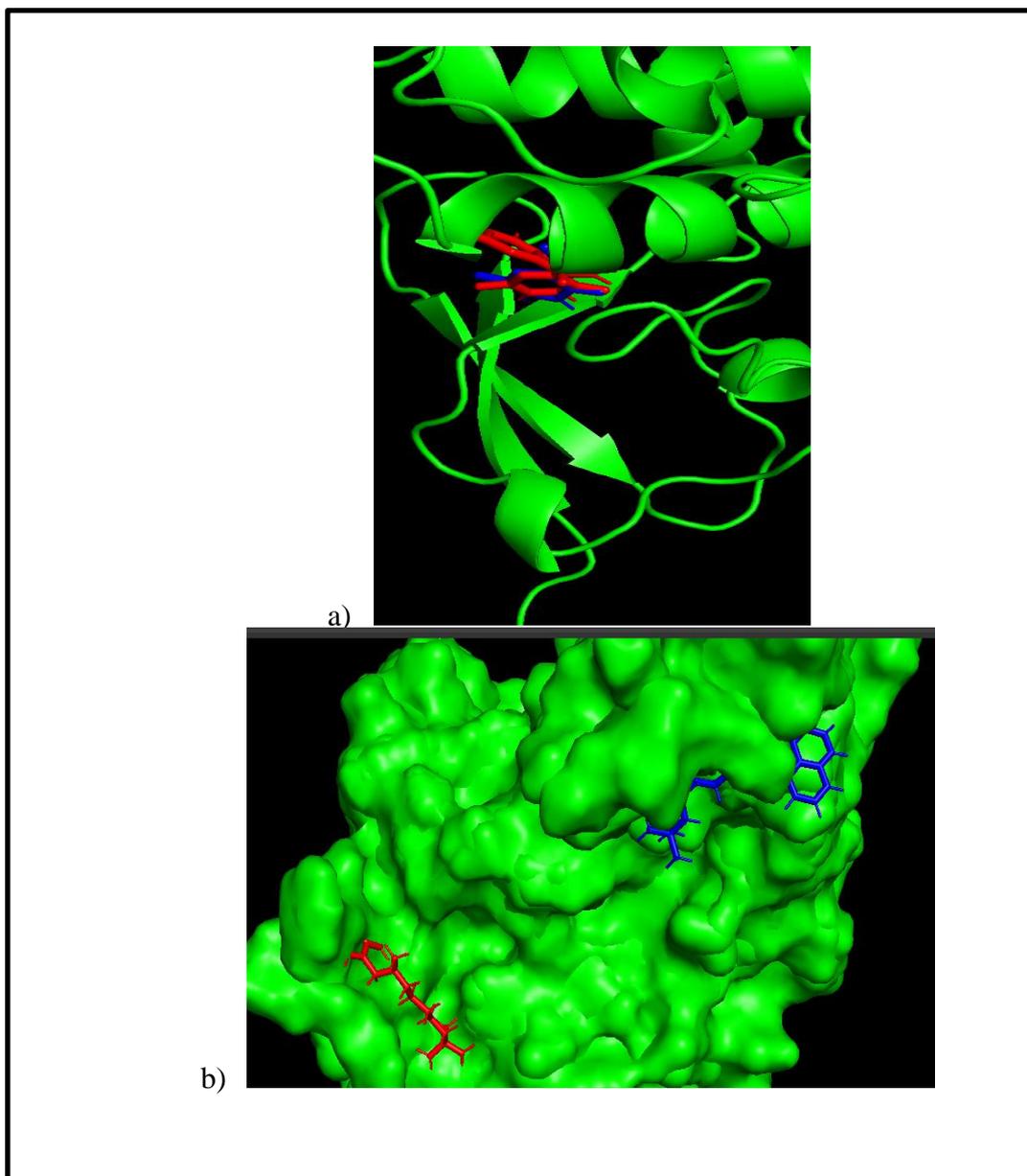


Figura 6. Acople y desacople de los fármacos Favipiravir-Plpro y Terbinafina-Plpro.

Descripción de la Figura 6. (a) En verde se observa la proteína viral Plpro, en azul el fármaco Favipiravir al inicio de la DM y al final. (b) En azul se observa el fármaco Terbinafina acoplado a la Plpro, en rojo se observa la trayectoria que tuvo a los 200 ns.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdellatif, M., Ali, A., Ali, A. & Hussien, M. (2021). Computational studies by molecular docking of some antiviral drugs with COVID-19 receptors are an approach to medication for COVID-19. *Open Chemistry*. 19(1), 245-264. <https://doi.org/10.1515/chem-2021-0024>
- Ahmed A., Dahab M., Metwaly M., Elhady M., Elkaeed E., Eissa I., & Darwish K. (2021). Molecular Docking and Dynamics Simulation Revealed the Potential Inhibitory Activity of ACEIs Against SARS-CoV-2 Targeting the hACE2 Receptor. *Frontiers in Chemistry*. 9, 2296-2646. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.661230>
- Bhowmik, D., Sharma, D., Prakash, A., & Kumar, D. (2021). Identification of Nafamostat and VR23 as COVID-19 drug candidates by targeting 3CLpro and PLpro. *Journal of molecular structure*. 1233, 0022-2860. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130094>
- Calligari, P., Bobone, S., Ricci, G., & Bocedi, A. (2020). Molecular Investigation of SARS-CoV-2 Proteins and Their Interactions with Antiviral Drugs. *Viruses*, 12(4), 445. <https://doi.org/10.3390/v12040445>
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5, 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z
- Cuestas S., Mora J., Márquez E. (2021). In Silico Screening of the DrugBank Database to Search for Possible Drugs against SARS-CoV-2. *Molecules*. 26(4), 1100. <https://doi.org/10.3390/molecules26041100>

- Elmaaty A., Alnajjar R., Hamed M., Khattab M., Khalifa M., & Al-Karmalawy, A. (2021). Revisiting activity of some glucocorticoids as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: theoretical study. *RSC Adv.* 11(17), 10027-10042. Doi: 10.1039/D0RA10674G
- Hassab, M., Shouen, A., Rashood, S., Al-Rashood S., Al-Warhi T., & Eldehna W. (2020). Identification of a New Potential SARS-COV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase Inhibitor via Combining Fragment-Based Drug Design, Docking, Molecular Dynamics, and MM-PBSA Calculations. *Front. Chem.* doi: 10.3389/fchem.2020.584894
- Leach A., (2007). Ligand-Based Approaches: Core Molecular Modeling, *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* 87-118., <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00246-7>.
- Padhi, A. K., Rath, S. L., & Tripathi, T. (2021). Accelerating COVID-19 Research Using Molecular Dynamics Simulation. *The journal of physical chemistry.* 125(32), 9078–9091. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c04556>
- Peng, L., Shen, L., Xu, J. Xiongfei T., & Zhou L. (2021). Prioritizing antiviral drugs against SARS-CoV-2 by integrating viral complete genome sequences and drug chemical structures. *Sci Rep.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83737-5>
- Radcliffe, S. (2021). Here's Exactly Where We Are with Vaccines and Treatments for COVID-19. *Healthline.* <https://www.healthline.com/health-news/heres-exactly-where-were-at-with-vaccines-and-treatments-for-covid-19>
- Srivastava, N., Garg, P., Srivastava, P., & Seth, P. K. (2021). A molecular dynamics simulation study of the ACE2 receptor with screened natural inhibitors to identify novel drug candidate against COVID-19. *PeerJ.* 9.. <https://doi.org/10.7717/peerj.11171>

Wang, F., Wu, FX., Li, CZ. (2019). ACID: a free tool for drug repurposing using consensus inverse docking strategy. *J Cheminform* <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0394-z>

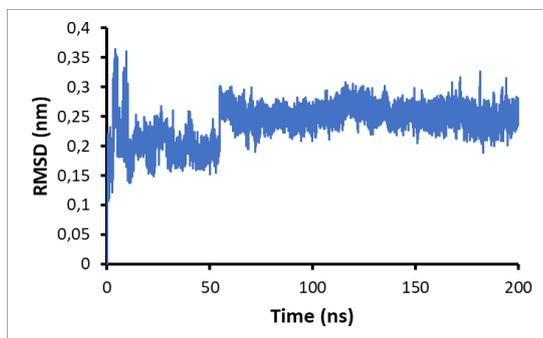
World Health Organization (2021). WHO coronavirus (COVID-19) Dashboard. World Health Organization. <https://covid19.who.int/>

Zeitlinger, M., Koch, B., Bruggemann, R., De Cock, P., Felton, T., Hites, M., Le, J., Luque, S., MacGowan, A. P., Marriott, D., Muller, A. E., Nadrah, K., Paterson, D. L., Standing, J. F., Telles, J. P., Wölfel-Duchek, M., Thy, M., Roberts, J. A., & PK/PD of Anti-Infectives Study Group (EPASG) of the European Society of Clinical Microbiology, Infectious Diseases (ESCMID) (2020). Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Antiviral Agents Used to Treat SARS-CoV-2 and Their Potential Interaction with Drugs and Other Supportive Measures: A Comprehensive Review by the PK/PD of Anti-Infectives Study Group of the European Society of Antimicrobial Agents. *Clinical pharmacokinetics*. 59(10), 1195–1216. <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00924-9>

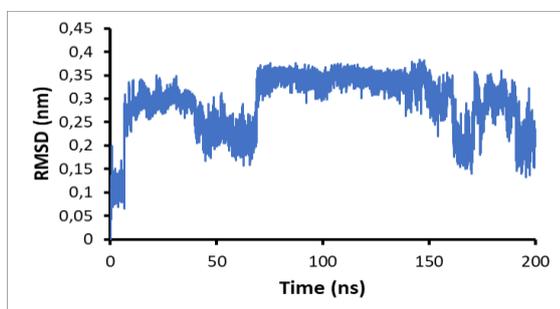


## Anexo 2. RMSD para los fármacos estudiados

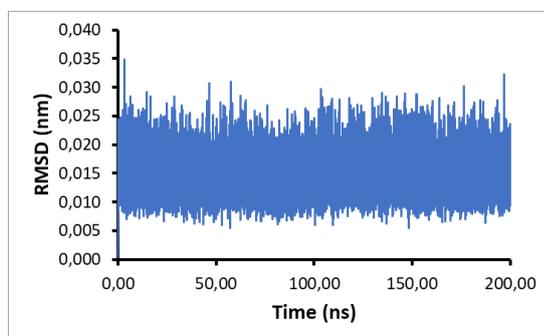
a) Digoxin-Mpro



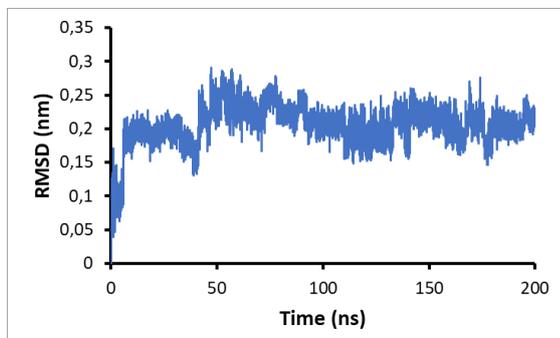
b) Darunavir-Mpro



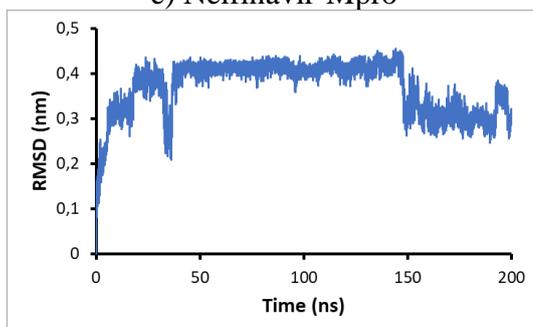
c) Favipiravir-Plpro



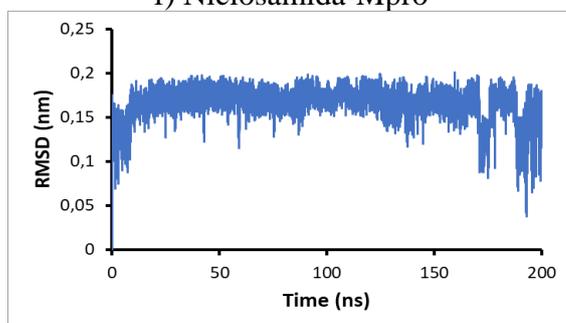
d) 1GW6-Nafamostat



e) Nelfinavir-Mpro



f) Niclosamida-Mpro



g) Terbinafine-Plpro

