

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

**“ESTUDIO *IN SILICO* Y DISEÑO DE COMPLEJOS
DE Ga CANDIDATOS A INHIBIDORES DE LA PROTEASA M^{pro} EN
SARS-CoV-2”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA**

ELABORADA POR:

KEVIN ENDER TAYPE HUANCA

 <https://orcid.org/0000-0002-1060-0320>

ASESORA:

Dra. ANA CECILIA VALDERRAMA NEGRÓN

 <https://orcid.org/0000-0001-7741-3207>

LIMA - PERÚ

2024

Citar/How to cite	Taype Huanca [1]
Referencia/Reference	[1] K. Taype Huanca, “ <i>Estudio in silico y diseño de complejos de Ga candidatos a inhibidores de la proteasa M^{pro} en SARS-CoV-2</i> ” [Tesis]. Lima (Perú): Universidad Nacional de Ingeniería, 2024.
Estilo/Style: IEEE (2020)	

Citar/How to cite	(Taype, 2024)
Referencia/Reference	Taype, K. (2024). <i>Estudio in silico y diseño de complejos de Ga candidatos a inhibidores de la proteasa M^{pro} en SARS-CoV-2</i> . [Tesis, Universidad Nacional de Ingeniería]. Repositorio institucional Cybertesis UNI.
Estilo/Style: APA (7ma ed.)	

Dedicatoria

*A mi abuelito Santiago que es un
angelito y me cuida desde el cielo.*

*Te admiro mucho viejo, te extraño
y te quiero mucho.*

Agradecimientos

Gracias a mi asesora, la Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón, por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto asesorado por ella. Por todos sus consejos y confianza depositada en mi persona.

A mi co-asesor el MSc. Jesús Alvarado Huayhuaz, por todo su apoyo, conocimientos compartidos, consejos y críticas constructivas proporcionadas. Sin su ayuda nunca hubiese sido posible culminar este trabajo.

A mis amigos de universidad con los cuales compartí momentos agradables y divertidos, a todas las amistades que he formado en estos años y que me acompañan actualmente.

A todos mis profesores de esta etapa de formación profesional, por todo su conocimiento compartido en cada clase y la paciencia que han tenido con mi persona.

A mi profesora de educación secundaria, María Mesías Antón, por confiar en mí hace muchos años y darme aquel consejo que nunca voy a olvidar. Hace poco me enteré de su sensible fallecimiento. Me hubiese encantado volver a conversar con usted, descanse en paz maestra.

A toda mi familia por el apoyo incondicional que he recibido por su parte, tíos, abuelos, primos, sobrinos. En especial a mi tío Alfredo que ya no está con nosotros. Gracias por toda esa alegría tuya.

Finalmente, a mi madre, la persona más importante en mi vida que me ha acompañado desde siempre, todos los consejos que me has dado desde muy niño, siempre los he escuchado, cada uno de ellos sin falta. Gracias mamá por todo, sin ti no sería nada, esa es la verdad. Gracias por darme la vida y por seguir conmigo.

Resumen

La pandemia producida a finales del 2019 (COVID-19) causada por el virus SARS-CoV-2 condujo a la búsqueda de potenciales inhibidores del SARS-CoV-2 para el tratamiento de la enfermedad. El objetivo principal de la presente tesis es el emplear técnicas *in silico* además de principios de Química Medicinal para diseñar complejos de Ga candidatos a inhibidores de la proteasa M^{pro} (blanco), proteína esencial en la replicación del virus. A partir de un inhibidor conocido (N3) de la proteasa M^{pro} (PDB ID 6LU7) se realizaron modificaciones estructurales empleando una lista de fragmentos bioisómeros, obteniéndose estructuras modificadas de N3 (ligandos), los que fueron preparados en Google Colaboratory. Por otro lado, se preparó M^{pro} (ID 6W63) utilizando Chimera 1.15 para seguidamente ejecutar el virtual screening en una supercomputadora (MANATÍ). Se consiguieron acoplamiento con mayor afinidad, superiores a $-9.0 \text{ kcal. mol}^{-1}$ frente al control ($-6,9 \text{ kcal. mol}^{-1}$ para N3), posteriormente se ejecutó un virtual screening empleando un docking covalente y no covalente frente a M^{pro} (ID 6LU7). Los resultados muestran que las modificaciones estructurales satisfacen los objetivos, obteniendo 17 moléculas con buena puntuación de acoplamiento en el sitio activo de M^{pro}. Se coordinó con galio la molécula que presentó una mejor afinidad de acoplamiento ($-11.592 \text{ kcal mol}^{-1}$, Molécula1). Para realizar el docking de los complejos, se empleó el Fe en lugar del Ga, ya que no se obtenían los resultados esperados, se evaluó la regla de Lipinski, se analizaron los complejos, y finalmente se efectuaron las simulaciones de dinámica molecular.

Abstract

The pandemic produced at the end of 2019 (COVID-19) caused by the SARS-CoV-2 virus led to the search for potential SARS-CoV-2 inhibitors for the treatment of the disease. The main objective of this thesis is to use *in silico* techniques in addition to principles of Medicinal Chemistry to design Ga complexes that are candidates for inhibitors of the M^{pro} protease (target), an essential protein in virus replication. Starting from a known inhibitor (N3) of the M^{pro} protease (PDB ID 6LU7), structural modifications were made using a list of characteristic bioisostere fragments, obtaining modified structures of N3 (ligands), which were prepared in the Google Colaboratory. On the other hand, M^{pro} (ID 6W63) was prepared using Chimera 1.15 to then execute the virtual screening on a supercomputer (MANATÍ). Couplings with higher affinity, higher than $-9.0 \text{ kcal. mol}^{-1}$, were achieved compared to the control ($-6.9 \text{ kcal. mol}^{-1}$ for N3), subsequently a virtual screening was performed using a covalent and non-covalent docking against M^{pro} (ID 6LU7). The results show that the structural modifications satisfy the objectives, obtaining 17 molecules with a good coupling score in the active site of M^{pro}. The molecule that presented the best coupling affinity ($-11.592 \text{ kcal mol}^{-1}$, Molécula1) was coordinated with gallium. To carry out the docking of the complexes, Fe was used instead of Ga, since the expected results were not obtained, Lipinski's rule was then evaluated, the complexes were analyzed and finally the molecular dynamics simulations were carried out.

Índice de Contenido

Agradecimientos	iv
Resumen	v
Abstract	vi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento y formulación del problema	2
1.2 Estado del arte	3
1.2.1 Ligandos orgánicos.....	5
1.2.2 Ligandos metalados.....	8
1.3 Justificación	13
1.3.1 Alcances del proyecto de Investigación	14
1.3.2 Limitaciones del Proyecto de Investigación	15
1.3.3 Restricciones Económicas	15
1.3.4 Restricciones Sociales.....	16
1.3.5 Restricciones Ambientales.....	16
1.4 Objetivos	16
1.4.1 Objetivo General.....	16
1.4.2 Objetivos Específicos	17
1.4.3 Objetivos Logrados.....	17
CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEÓRICO	19

2.1 COVID-19	19
2.2 Biología molecular del coronavirus SARS-CoV-2	20
2.2.1 SARS-CoV-2.....	20
2.2.2 M ^{pro} (3CL ^{pro} o nsp5).....	25
2.3 Metalofármacos	30
2.3.1 Metalofármacos antivirales.....	31
2.3.1.1 Metalofármacos de galio.....	35
2.4 Regla de Lipinski	36
2.5 Diseño de fármacos asistido por computadoras (DIFAC)	37
2.6 Técnicas <i>in silico</i> para el modelamiento de fármacos	39
2.6.1 Docking molecular.....	39
2.6.2 Virtual screening.....	41
2.6.3 Dinámica Molecular.....	42
2.6.4 Softwares computacionales y supercomputador MANATÍ.....	43
2.6.4.1 Schrödinger.....	43
2.6.4.2 UCSF Chimera.....	48
2.6.4.3 SmiLib v2.0.....	49
2.6.4.4 molSimplify.....	51
2.6.4.5 Supercomputador MANATÍ.....	52
2.6.5 Limitaciones e interferentes en los softwares computacionales.....	53
CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL	55

3.1 Propuesta metodológica	55
3.1.1 Etapa 1: Elaboración de la biblioteca virtual de estructuras.....	56
3.1.1.1 Generación de la lista de fragmentos bioisostéricos para la modificación de la molécula N3	56
3.1.1.2 Generación de estructuras modificadas del N3 a partir de la lista de bioisósteros obtenida	57
3.1.2 Etapa 2: Preparación de ligandos en Google Colaboratory, proteína en Chimera 1.15 y AutoDockTools y virtual screening en MANATÍ.....	58
3.1.2.1 Preparación de los ligandos	58
3.1.2.2 Preparación de proteína.....	59
3.1.3 Etapa 3: Preparación previa al virtual screening de la proteína y los ligandos en Schrödinger	61
3.1.3.1 Preparación de la proteína	61
3.1.3.2 Preparación de los ligandos	63
3.1.4 Etapa 4: Virtual screening en Schrödinger	64
3.1.4.1 Creación del grid (malla) para el posterior docking.....	64
3.1.4.2 Ejecución del virtual screening.....	65
3.1.5 Etapa 5: Metalado de los mejores ligandos obtenidos del virtual screening.....	65
3.1.6 Etapa 6: Docking molecular de las moléculas metaladas.....	66
3.1.7 Etapa 7: Dinámica Molecular	66
3.2 Riesgos del proyecto de investigación y plan de acción para mitigar sus efectos	68

3.3	Materiales y procedimiento experimental	69
3.31	Equipo	69
3.2.1.1	Archivos en diferentes formatos	69
3.2.1.2	Hardware y Softwares	69
3.3.2	Etapa 1: Elaboración de la biblioteca virtual de estructuras.....	70
3.3.3	Etapa 2: Preparación de ligandos en Google Colaboratory, proteína en Chimera y virtual screening en MANATÍ	77
3.3.4	Etapa 3: Preparación previa al virtual screening de la proteína y los ligandos en Schrödinger	82
3.3.5	Etapa 4: Virtual screening en Schrödinger	84
3.3.6	Etapa 5: Metalado de los mejores ligandos obtenidos del virtual screening.....	85
3.3.7	Etapa 6: Docking molecular de las moléculas metaladas.....	88
3.3.8	Etapa 7: Dinámica molecular	89
3.4	Manejo de residuos y normas de seguridad	90
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....		92
4.1	Virtual Screening en MANATÍ.....	92
4.2	Virtual screening covalente y no covalente en Schrödinger.....	101
4.3	Metalado de el mejor ligando obtenido del virtual screening	112
4.4	Docking molecular de moléculas metaladas.....	122
4.5	Dinámica Molecular.....	141
Conclusiones.....		144
Recomendaciones.....		146

Referencias Bibliográficas	148
Anexos.....	156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Investigaciones relacionadas con propuestas de fármacos para la inhibición de la proteasa M ^{pro} del SARS-CoV-2	11
Tabla 2 Funciones Principales de los Marcos de Lecturas Abiertos y las Proteínas del SARS-CoV-2	22
Tabla 3 Aminoácidos de la diada catalítica y del sitio de unión para el M ^{pro} del SARS-CoV-2	29
Tabla 4 Principales Softwares Bioinformáticos	37
Tabla 5 Condiciones a emplearse en el preprocesamiento	61
Tabla 6 Condiciones a emplearse en el refinamiento	62
Tabla 7 Condiciones a emplearse en el módulo	63
Tabla 8 Moléculas con docking score mayor o igual a -9.0 kcal mol ⁻¹ obtenidas del virtual screening en MANATÍ.....	93
Tabla 9 Clasificación de moléculas para realizar virtual screening covalente y no covalente.....	103
Tabla 10 Docking score e interacciones de las moléculas después del virtual screening covalente y no covalente.....	111
Tabla 11 Lista de complejos obtenidos con el programa molSimplify	112
Tabla 12. Lista de complejos con H interferentes y nuevos complejos adicionados retirando estos H.....	122
Tabla 13. Comparaciones entre el Fe (III) y Ga (III) para justificar la sonda inorgánica	124

Tabla 14. Lista de complejos después del Docking con sus respectivos Docking Score y SMILES	125
Tabla 15. Resumen de parámetros obtenidos al evaluar la Regla de Lipinski para los complejos.....	128
Tabla 16. Parámetros obtenidos al evaluar SiteMap	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura del SARS-CoV-2 y la interacción de la proteína S con el receptor ACE-2 que dará comienzo a la infección.....	21
Figura 2. Estructura del genoma de SARS-CoV-2.....	22
Figura 3. Estructura monomérica de la proteasa M ^{pro} del SARS-CoV-2 (PDB: 6M2N) con los tres dominios, el dedo N-terminal (NF), la hélice N-terminal (NH) y el bucle Inter dominio de dominio 2-dominio 3 (IDL)	26
Figura 4. Sitio activo de un péptido donde se muestran los residuos de la díada catalítica	26
Figura 5. Estructura del dímero M ^{pro} con la orientación de los dos monómeros	27
Figura 6. Escisión de un enlace amida mediante la proteasa enzima	28
Figura 7. Mecanismo de la diada catalítica	29
Figura 8. Estructura del cis-diclorodiaminoplatino (II).....	31
Figura 9. Estructura de la Auranofina	31
Figura 10. Estructura del bis (maltolato) oxovanadio (IV).....	31
Figura 11. Complejos [Co(acacen)L ₂] ⁺ estudiados como antivirales	33
Figura 12. Complejos de V (IV) basados en porfirina evaluados como compuestos anti-VIH	34
Figura 13. Complejos de Cu (II) con ligandos tripode	34
Figura 14. Estructura del tris(maltolato)galio(III).....	35
Figura 15. Estructura tris(8-quinolinato)galio(III), KP 46	35
Figura 16. Representación del concepto de docking molecular	40

Figura 17. Protocolo general de un docking molecular	41
Figura 18. Esquema general del proceso de un virtual screening	42
Figura 19. Interfaz gráfica de Maestro Schrödinger.....	45
Figura 20. Interfaz gráfica de Chimera	48
Figura 21. Esquema de un producto de una reacción virtual, BB denota un bloque de construcción (building block) y L denota un enlazador(linker)	50
Figura 22. Ejemplo de una reacción virtual junto con sus respectivos SMILES.....	50
Figura 23. Estructura del MANATÍ	53
Figura 24. Inhibidor N3 de M ^{pro}	56
Figura 25. Primer fragmento seleccionado que será reemplazado por la lista de bioisómeros generada en la base de datos SwissBioisostere	57
Figura 26. Parámetros de validación de la proteína cristalizada	60
Figura 27. Diagrama de metodología	67
Figura 28. Preparación de la proteína M ^{pro} para la ejecución del virtual screening.	68
Figura 29. Primer fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.....	70
Figura 30. Segundo fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos	70
Figura 31. Tercer fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.....	71
Figura 32. Cuarto fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.....	71
Figura 33. Quinto fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.....	71
Figura 34. Sexto fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos	72
Figura 35. Séptimo fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.....	72
Figura 36. Lista de fragmentos obtenida con el programa SwissBioisostere (427 entradas).....	73

Figura 37. Código fuente de la página de la lista de fragmentos	73
Figura 38. Visualización del archivo ejemplo1.txt donde se resaltan las zonas que no son necesarias y se eliminarán	74
Figura 39. Archivo ejemplo1editado.txt y búsqueda de las partes a eliminar	75
Figura 40. Inserción de SMILES en el programa SmiLib v2.0 para realizar las modificaciones del fragmento 5-metilisoxazol.....	76
Figura 41. Listado de las 427 moléculas en representación SMIEELS, obtenidas de la primera modificación del N3.....	76
Figura 42. Ejecución de Google Colaboratory desde un drive personal.....	77
Figura 43. Características de la GPU brindada por Google Colaboratory.....	78
Figura 44. Listado de las 427 moléculas en formato .pdbqt y en coordenadas 3D listar para el virtual screening	80
Figura 45. Proteína M ^{pro} sin preparar	81
Figura 46. Proteína M ^{pro} sin moléculas de agua y ligando	81
Figura 47. Interfase del supercomputador MANATÍ.....	82
Figura 48. Virtual screening en MANATÍ.....	82
Figura 49. Parámetros considerandos en Protein Preparation Wizard	83
Figura 50. Parámetros considerandos en el Refine.....	83
Figura 51. Parámetros en el módulo LigPrep	84
Figura 52. Condiciones ingresadas al módulo CovDock para el virtual screening de tipo covalente.....	85
Figura 53. Representación de la Molécula 1 y selección de 6 puntos de coordinación para la generación del primer complejo	86

Figura 54. Parámetros considerados en el docking de los complejos vista 1.....	88
Figura 55. Parámetros considerados en el docking de los complejos vista 2.....	89
Figura 56. Característica estructural del inhibidor covalente N3.....	102
Figura 57. Reacción química de Michael.....	102
Figura 58. Diagrama de interacción entre N3 y M ^{pro}	103
Figura 59. Interacción de la Molécula1 con M ^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.....	104
Figura 60. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula1 con M ^{pro}	105
Figura 61. Interacción de la Molécula 17 con M ^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.....	106
Figura 62. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula 17 con M ^{pro}	107
Figura 63. Enlace a escindir para separar N3 de M ^{pro} para posterior docking covalente.....	108
Figura 64. Interacción de la Molécula 27 con M ^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.....	109
Figura 65. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula 27 con M ^{pro}	109
Figura 66. Interacción de la Molécula 30 con M ^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.....	110
Figura 67. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula 30 con M ^{pro}	111

Figura 68. Complejo35-interferencia por parte de un H enlazado a un N justamente en la dirección de la coordinación con el centro metálico	123
Figura 69. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo30* con M ^{pro}	130
Figura 70. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo28* con M ^{pro}	130
Figura 71. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo7* con M ^{pro}	131
Figura 72. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo 1* con M ^{pro}	131
Figura 73. Visualización de descriptores moleculares de los complejos.....	132
Figura 74. Código QR para la adquisición de datos.....	133
Figura 75. Scatterplot del Cys145coul relacionada con el docking score	133
Figura 76. Scatterplot del Cys145dist relacionada con el docking score	134
Figura 77. Scatterplot del Cys145Eint relacionada con el docking score.....	134
Figura 78. Scatterplot del Cys145hbond relacionada con el docking score	134
Figura 79. Scatterplot del Cys145vdw relacionada con el docking score	134
Figura 80. Scatterplot del His41coul relacionada con el docking score.....	135
Figura 81. Scatterplot del His41dist relacionada con el docking score.....	135
Figura 82. Scatterplot del His41Eint relacionada con el docking score	135
Figura 83. Scatterplot del His41hbond relacionada con el docking score.....	135
Figura 84. Scatterplot del His41coul relacionada con el docking score.....	136

Figura 85. Sitios reconocidos por SiteMap en la superficie molecular de la proteína	
M ^{pro}	139
Figura 86. Complejo30* acoplado en el pocket Sitemap_1.....	140
Figura 87. Concepto de RMSD en dinámica molecular	141
Figura 88. RMSD del ligando y proteína.....	142

ABREVIATURAS

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2.

COVID-19: Enfermedad por virus Corona 2019.

PDB: Banco de Datos de Proteínas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos.

ORF: Marco de Lectura Abierto.

M^{pro}: Proteasa principal del SARS-CoV-2.

PL^{pro}: Proteasa similar a la Papaína.

HPTP1B: Proteína Tirosina Fosfatasa 1B Humana.

NPL: Productos Naturales.

RdRp: ARN Polimerasa dependiente del ARN.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

SARS-CoV: Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus.

MERS-CoV: Síndrome Respiratorio por Coronavirus del Medio Oriente.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

GRID: Malla de acoplamiento.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La pandemia ocasionada por la enfermedad del COVID-19, generó en todo el mundo una crisis económica, social y de salud nunca antes vista. La comunidad científica continuamente desarrolló y aún sigue desarrollando innumerables investigaciones con la finalidad de encontrar un fármaco que pueda inhibir a la proteasa principal del SARS-CoV-2 (M^{pro})(blanco) y de este modo encontrar una solución a esta pandemia mundial, sin embargo, esto es un proceso que necesariamente toma tiempo y mucha inversión de dinero.

El reposicionamiento de fármacos apoyado del empleo de herramientas computacionales (docking molecular, virtual screening, simulaciones de dinámica molecular, etc.) ha surgido como un método el cual es muy empleado en la actualidad. Este enfoque *in silico* permite encontrar posibles hits computacionales que puedan inhibir la M^{pro} a partir de modificaciones estructurales de inhibidores ya conocidos. De esta manera se requerirá menos dinero, ahorrando tiempo y recursos los cuales se invierten durante las fases preclínicas y clínicas (Ebhoimen, Edemhanria, Awojide, Onyijen, & Anywar, 2019).

El presente trabajo de investigación aborda el tratamiento *in silico* para tratar la enfermedad del COVID-19, a partir de las modificaciones estructurales de un inhibidor ya conocido (N3) de la proteasa principal M^{pro} , a los cuales se les realizó un virtual screening (cribado virtual), seleccionando los compuestos mejor acoplados al blanco (M^{pro}), seguidamente se efectuó un virtual screening covalente y no covalente consiguiendo hits computacionales con buen docking score, a los que se pretende metalar con galio (ligandos metalados). Para la última etapa se evaluó el cumplimiento de la regla de Lipinski y efectuó el docking molecular de los complejos de Fe (se realizó una sonda inorgánica con el átomo de Fe en lugar de Ga, porque este no se encontraba parametrizado en Schrödinger y no era

reconocido por el software), finalmente se realizó un análisis de aquellos complejos que mejor acoplamiento molecular obtuvieron frente a M^{pro}.

1.1 Planteamiento y formulación del problema

La reciente pandemia debida a la propagación de la “Enfermedad por virus Corona 2019”(COVID-19) causada por un nuevo coronavirus-2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) ha sido una gran preocupación a nivel mundial. Esto ha causado a que se estén llevando a cabo ensayos clínicos para varios medicamentos potenciales para tratar COVID-19. Hasta la fecha del 16 de octubre del 2023 hay 16,623 estudios relacionados con la COVID-19 que figuran en la Plataforma de Registro Internacional de Ensayos Clínicos de la Organización Mundial de la Salud (WHO ICTRP) (“International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP),” n.d.), por lo que la identificación de moléculas como posibles inhibidores del SARS-CoV-2 sigue siendo un foco de investigación dentro de la comunidad científica (Ibrahim, Abdeljawaad, Abdelrahman, & Hegazy, 2020).

La estrategia de reutilización de fármacos inhibidores de enzimas hidrolasas se aplica actualmente en estudios para la inhibición de la proteasa principal (M^{pro}) del SARS-CoV-2 viral, a la que vamos a llamar blanco y que participa en la transcripción y replicación de dicho virus (Serafin et al., 2020). Este enfoque promete identificar nuevos fármacos potenciales en base a los hasta ahora ya conocidos por su capacidad de unirse al blanco. Este proceso se ayuda de herramientas computacionales, como el docking molecular y la dinámica molecular. El docking molecular es un método bioinformático que ayuda a predecir y calcular la posición más favorable de interacción entre un blanco generalmente proteico y un ligando (posible fármaco). Mientras más favorable y efectiva sea la unión, mayor será la efectividad del fármaco. La dinámica molecular es un método basado en los principios de mecánica clásica,

para la simulación de macromoléculas biológicas empleado para analizar la estabilidad de interacción entre un fármaco y la proteína blanco (Ballón & Grados, 2019).

A pesar de estos avances, el diseño de complejos metálicos como inhibidores potenciales de SARS-CoV 3CL M^{pro} aún es una área que no se ha investigado lo suficiente y promete ser una nueva área de desarrollo de fármacos metalados como los complejos de galio, posibles candidatos para la farmacoterapia y el diagnóstico del SARS-CoV-2 (Bernstein & Zhang, 2020; Scior, Abdallah, Mustafa, Guevara-García, & Rehder, 2021). Por lo tanto, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Será posible que las propuestas de complejos metálicos de galio basados en estudios computacionales de docking molecular, dinámica molecular y principios de Química Medicinal, presenten una buena interacción frente a la proteasa principal de SARS-CoV-2 y generen una posible inhibición?

1.2 Estado del arte

Actualmente debido a la propagación del virus conocido como SARS-CoV-2 que genera la enfermedad “COVID-19” o “Coronavirus”, se han reportado múltiples efectos, sobre todo en la economía a nivel mundial.

En el Perú, se confirmó la primera persona infectada el 6 de marzo del 2020 en la ciudad de Lima, incrementándose de manera alarmante los números de casos registrados. Hasta la fecha del 16 de octubre del 2023 en el Perú hay 4,519,976 personas contagiadas y 222,161 fallecidos (“Covid 19 en el Perú - Ministerio del Salud,” n.d.). Los principales modos de transmisión son a través de gotas respiratorias, durante el contacto cercano sin protección entre personas infectadas y susceptibles. Estudios más recientes demuestran que incluso los pacientes asintomáticos son capaces de contagiar la enfermedad, se ha hallado el periodo de

transmisibilidad en un rango de 1 a 14 días y el tiempo de incubación entre 5 y 6 días después de la infección hasta los 14 días (Guan et al., 2020). El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de Coronaviridae y el género Betacoronavirus. Es un virus de ARN, con envoltura y que presenta el genoma de virus ARN más grande conocido ya que varían aproximadamente de 26 a 32 kb, y que contiene 14 marcos de lectura abiertos (ORFs), siendo estas la secuencia de ARN comprendida entre un codón de inicio de la traducción y un codón de terminación, descontando las secuencias que corresponden a los intrones. El marco de lectura principal ORF 1ab codifica dos poliproteínas superpuestas (pp1a, pp1ab), que se dividen en 16 proteínas no estructurales (nsp1-16) a través de la escisión de la poliproteína pp1ab por acción de la proteasa M^{pro} en 11 sitios (desde nsp4 hasta nsp16) y la proteasa similar a la papaína (PL^{pro}), en 3 sitios (desde nsp1 hasta nsp3) (Ullrich & Nitsche, 2020).

La proteasa dimérica principal M^{pro} es necesaria para la escisión proteolítica de las proteínas precursoras virales, lo cual coloca a M^{pro} como un blanco tentativo para el desarrollo de fármacos, debido a que esta no sufre mutaciones y a la ausencia de un homólogo humano (Amamuddy, Verkhivker, & Bishop, 2020).

El reposicionamiento de fármacos es el proceso de desarrollo de un compuesto para su empleo en una enfermedad totalmente diferente, este resulta ser una opción que ofrece muchas ventajas, y posee varios éxitos que han confirmado tanto sus beneficios para la sociedad, como también su valor comercial. Este consiste en volver a utilizar un compuesto farmacéutico activo que ya está en el mercado para una nueva indicación. Aunque esta estrategia tiene una serie de inconvenientes y ofrece ciertos desafíos, también posee muchas ventajas, incluida la ayuda a superar el desgaste que se experimenta actualmente en el campo del descubrimiento de nuevos fármacos.

Actualmente se emplean técnicas *in silico*, basados en grandes bases de datos (bibliotecas) para identificar nuevos candidatos para el reposicionamiento de fármacos. Este

enfoque se viene desarrollando para la búsqueda de fármacos contra el COVID-19, con lo que se busca economizar tiempo y dinero.

El empleo de técnicas *in silico*, el cual implica el empleo de softwares de modelamiento molecular, análisis de grandes bases de datos, y el empleo de unidades de alta velocidad, ha llevado al descubrimiento de fármacos y a una mejor interpretación de procesos biológicos complejos que implican estas enfermedades (Macalino et al., 2018). Entre los enfoques computacionales más empleados figuran el docking molecular y el virtual screening.

El docking molecular se emplea ampliamente para el descubrimiento de fármacos basado en interacciones proteína-ligando, el cual tiene como objetivo producir estructuras ligadas con energías de interacción favorables, utilizando funciones de puntuación.

A diferencia del docking molecular, el virtual screening emplea una mayor cantidad de datos (generalmente bases de datos con grandes cantidades de moléculas) para poder seleccionar potenciales candidatos a fármacos biológicamente activos a partir de ellas.

1.2.1 Ligandos orgánicos

Diversos estudios se han realizado empleando ligandos orgánicos (productos naturales, condimentos domésticos, entre otros) y continúan en proceso. En estas se emplean técnicas *in silico* (simulaciones computacionales, programas de modelamiento molecular, algoritmos avanzados), además del reposicionamiento de fármacos, con la finalidad de encontrar un fármaco para el COVID-19.

Por ejemplo, se ha empleado la base de datos MolPort (<https://www.molport.com>) la cual contiene más de 100,000 NPL (productos naturales) para identificar posibles inhibidores de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 (PDB ID 6LU7), de donde empleando el virtual screening (software Autodock 4.2) se seleccionaron 5,000 para realizar simulaciones de dinámica

molecular (software AMBER, 50ns), seleccionando nueve PLN con mejores afinidades de unión (códigos MolPort: MolPort-000-708-794, MolPort-044-179-844, MolPort-000-702-646, MolPort-002-513-915, MolPort-005-948-349, MolPort-039-056-062, MolPort-004-849-765, MolPort-046-158-375 y MolPort-001-751-850), de los cuales cuatro mostraron enlaces de hidrógeno con los aminoácidos His163, Gly143 (MolPort-004849-765, MolPort-000-708-794, MolPort-002-513-915 y MolPort000-702-646) demostrando una alta afinidad por M^{pro} (Ibrahim et al., 2020). La rejilla de acoplamiento para abarcar el sitio activo empleada fue de 60Åx60Åx60Å con un valor de espaciado de 0.375°, donde el centro de la cuadrícula se ubicó en -13.069, 9.74 y 68.49 (coordenadas XYZ). De esta manera estos NPL son candidatos a inhibir el SARS-CoV-2 M^{pro} CoV-2 (Ibrahim et al., 2020).

Otro estudio revela que se han estudiado 32 compuestos aislados de 14 condimentos de cocina como inhibidores de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 (PDB ID 6LU7). Los cálculos empleando el docking molecular (software AutoDock 4.2.6) revelaron que había una alta afinidad por el ácido salvianólico A y la curcumina con docking score de -9.7 y -9.2 kcal.mol⁻¹, respectivamente. El ácido salvianólico A interactuó con los residuos Glu166, Phe140, Gln189, Tyr54 y Thr190, mientras que la curcumina con los residuos His163, Cys145, Gly143, Ser144 y Leu14. La estabilidad de estas dos especies se calculó empleando simulaciones de dinámica molecular (software AMBER16, 40ns). Los resultados de este estudio actual revelaron estos dos productos naturales como inhibidores potenciales de M^{pro} (Ibrahim et al., 2020).

También se han realizado estudios de virtual screening (suite Schrödinger) basado en farmacóforos, empleando bases de datos de productos naturales (SNP, MNP y Zinc). El virtual screening identificó 124 resultados para el modelo de farmacóforo empleando como blanco la proteasa del SARS-CoV-2 (PDB ID-6Y2F), con un ligando covalente O6K y un total de 313 resultados utilizando como blanco una segunda proteasa del SARS-CoV-2 (PDB ID-6W63), con un inhibidor unido no covalentemente X77. En estos estudios se da a conocer que las

moléculas SN00293542 y SN00382835 consiguieron los docking score más altos siendo estos $-14.57 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $-12.42 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectivamente, donde SN00293542 formó puentes de hidrógeno con los siguientes residuos: Asn142 (2.62), Gly-143 (1.75), Ser144 (2.21), Hie163 (2.09), Hie164 (2.66), Glu166 (2.32), Thr45 (2.77), Ser46 (2.40), Gln-189 (2.03) y H₂O (2.77, 2.43, 2.05). Para el caso del SN00382835 este formó puentes de hidrógeno con Glu-166 (2.56), Asn-142 (2.06), Gly143 (1.83) y H₂O (1.79, 2.25) (Kumar et al., 2020).

Se han realizado estudios del extracto metanólico de los frutos de la Lufa egipcia secados al aire lo que conllevó a la identificación de una nueva δ -valerolactona (compuesto 1), junto con dieciséis compuestos ya conocidos. Estos compuestos fueron estudiados empleando el docking molecular para examinar el potencial de unión de los compuestos aislados frente a la M^{pro} (PDB ID 6LU7). Las saponinas identificadas (N°14 al N°17) se unieron al sitio catalítico de la M^{pro} y obtuvieron los mejores docking score de -7.13 , -7.29 , -7.47 y $-7.54 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectivamente junto con el inhibidor de la proteasa N3 ya conocido ($-7.51 \text{ kcal mol}^{-1}$), donde el compuesto N°14 interaccionó con los aminoácidos Thr199 (2.6 Å), Asr289 (2.2 Å), Arg131 (2.2 Å), Asr197 (2.1 Å), Lys 137 (2.3 Å), el compuesto N°15 interaccionó con Thr199 (1.9 Å), Asn238 (2.6 Å), Lys137 (2.5 Å), el compuesto N°16 con Leu272 (1.8 Å), Thr199 (2.5 Å), Asr289 (2.7 Å) y finalmente el compuesto N°17 interaccionó con Lys137 (2.3 Å), Leu 287 (1.8 Å), Ala 285 (2.3 Å), Met276 (1.9 Å) y Asn277 (2.0 Å). Para el caso del inhibidor N3, este interaccionó con los aminoácidos Arg105 (2.7 Å) y Gln110 (2.2 Å). La preparación de la proteína y ejecución del docking molecular se empleó el software PyRx 0.94 (Cao, Kim, Woo, & Min, 2021).

Otro estudio ha empleado el reposicionamiento de fármacos, para tratar al COVID-19 apoyándose en herramientas computacionales. Se utilizaron dieciocho candidatos a fármacos contra la proteasa principal del SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB ID 6LU7). Los medicamentos incluyeron medicamentos contra la influenza, medicamentos contra la malaria, medicamentos

contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), medicamentos antiinflamatorios, medicamentos contra la Hepatitis C (VHC), medicamentos contra el Ébola y medicamentos contra las infecciones genitourinarias.

Los cálculos de acoplamiento molecular revelaron las altas afinidades de unión para el TMC-310911 y el ritonavir hacia M^{pro} con docking score de -8,3 y -7,7 kcal mol⁻¹, respectivamente. El TMC-310911 interactuó con los aminoácidos Cys145 (2.34 Å), Ser144 (3.02 Å) y Glu166 (1.89 Å), mientras que Ritonavir interactuó con Gln189 (2.63 Å), His163 (2.01 Å), Glu166 (2.38 Å), y Gly143 (1.83 Å). La ejecución del docking molecular se realizó empleando el software Autodock Vina, donde el tamaño de la malla de acoplamiento fue de 25 Åx25Åx25Å y un valor de espaciado de 1.00 Å. Para los estudios de dinámica molecular se empleó el software AMBER 16, empleando 50ns, esto confirmó las prometedoras afinidades de unión y estabilidades de estos ligandos contra la M^{pro} (Ibrahim et al., 2021).

1.2.2 Ligandos metalados

Además de estos estudios empleando ligandos orgánicos, actualmente se están realizando propuestas empleando ligandos metalados, o se están metalando fármacos ya aprobados anteriormente para otra enfermedad y se está analizando la afinidad de unión con la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2, estos estudios son relativamente recientes por lo que la información aún es reducida.

Por ejemplo, se ha trabajado con tres derivados de cumarina previamente sintetizados y sus complejos de Pd (II) para analizar su afinidad de unión hacia la M^{pro} (PDB ID 6LU7) del SARS-CoV-2 mediante el docking molecular y se comparó con dos fármacos provenientes de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), cinanserina y cloroquina. Los complejos de cumarina-Pd (II) (C1, C2 y C3) mostraron mayores afinidades de unión en

comparación con los fármacos aprobados. Las energías de enlace para estos tres complejos de cumarina-Pd (II) fueron de -45.13, -50.49 y -47.03 kJ mol⁻¹ para C1, C2 y C3 respectivamente. El software empleado para los estudios de docking molecular fue AutoDock 4.2 el cual pudo predecir las posiciones de los compuestos dentro del blanco proteico, donde el tamaño de la malla de acoplamiento fue de 64 Åx60Åx54Å, mientras que para los estudios de dinámica molecular se empleó el software GROMACS. Este estudio mostró que las moléculas que tienen similitud estructural con los fármacos aprobados y sus complejos tienen el potencial de inhibir la actividad funcional de la proteasa del SARS-CoV-2 por lo que se recomendó realizar estudios experimentales (Milenković, Dimić, Avdović, & Marković, 2020).

Se han empleado técnicas *in silico* para estudiar las capacidades de unión de la proteasa M^{pro} (PDB ID 6LU7) con veinte complejos de vanadio de pequeño tamaño, además de diseñar un inhibidor con vanadio basado en el N3. Para este estudio se comparó la proteína tirosina fosfatasa 1B humana (HPTP1B), el cual posee una diada catalítica Cys-His al igual que la M^{pro}, tomándose en cuenta que el vanadio forma vanadatos, análogos del fosfato. Con estas consideraciones se aplicó el docking molecular empleando el software Autodock4. El docking score del complejo de vanadio propuesto dio un valor de -9 kcal mol⁻¹. Con este enfoque se pretende marcar el comienzo de un área en el desarrollo de fármacos que contienen metales y que pueden ser usados en el futuro contra el COVID-19 (Scior et al., 2021). Otro estudio examinó la coordinación de algunos compuestos de zinc con Cloroquina (CQ)/Hidroxiclороquina(HCQ) para potenciar la actividad del uso de cloroquina/hidroxiclороquina en el tratamiento del COVID-19. Los cálculos mostraron que los complejos que tuvieron mejor docking score fueron Zn(QC)Cl₂(H₂O) y Zn(HQC)Cl(H₂O) siendo estos -7.70 kcal mol⁻¹ y -7.54 kcal mol⁻¹ respectivamente. La interacción de Zn(QC)Cl₂(H₂O) con la proteasa de COVID-19 dio como resultado tres enlaces de hidrógeno al interactuar con Glu (1.76Å/1.95Å) y Arg (2.06Å), mientras que el Zn(HQC)Cl₂(H₂O) exhibió una fuerte unión al

blanco formando ocho enlaces de hidrógeno con la Gln (2.32Å/2.35Å), His (2.19Å/2.27Å), Cys (2.70Å), Glu (1.77Å), Met (2.92Å) y Arg (2.26Å). Los estudios de docking molecular se realizaron empleando AutoDock 4.2, mientras que para las ejecuciones de dinámica molecular se utilizó el software NAnoscale Molecular Dynamics (NAMD) (Hussein & Elkhair, 2021).

También se ha investigado nuevos compuestos de metisazona (modificados con calcio, hierro, magnesio, manganeso y zinc) los cuales se han diseñado para inhibir las principales proteínas involucradas en la replicación del SARS-CoV-2 ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp), proteína Spike, PL^{pro} y M^{pro} (PDB ID 6Y2E). Se encontró que la metisazona modificada con metal tenía una mayor afinidad por PL^{pro} y M^{pro}, observándose los docking score para el caso de la M^{pro} con metisazona unida a Zn (Zn-MSZ) a -6.7 kcal mol⁻¹, seguida de Fe (Fe-MSZ) a -6.6 kcal mol⁻¹, Ca (Ca-MSZ) y Mg (Mg-MSZ) a -6.4 kcal mol⁻¹ y finalmente unida a Mn (Mn-MSZ) a -6.3 kcal mol⁻¹. El software empleado para el docking molecular fue AutoDock v4.2. Con estas observaciones se recomendó realizarse más estudios *in vitro* como *in vivo* (Abdelaal Ahmed Mahmoud M. Alkhatip et al., 2021).

Otro estudio sobre la estabilidad estructural de la proteasa principal M^{pro} del SARS-CoV-2 (PDB ID 6LU7) empleó quelatos de Cu (II) los cuales fueron acoplados a la His 41 y Cys 145 en la región del sitio activo M^{pro}. Estas resultaron ser estables y mostraron que el Cu (II) logró unirse fácilmente al tiolato de Cys 145, lo cual sería letal para el blanco. El [(meta-amidinosaliciliden-1-alaninato) de cobre (II)], abreviado como Cu (II)Lm se acopló cerca de la His41, donde esta estructura resultó obtener un docking score de -6.8 kcal mol⁻¹. Mientras que para el caso del Cu (II) Lm-metilo y el Cu (II) Lm-mini se obtuvo un valor de -7.2 kcal mol⁻¹ y -6.2 kcal mol⁻¹. El software empleado para preparar el ligando y el receptor fue AutoDock Vina, mientras que para el docking molecular se empleó Chimera. Este trabajo remarca de relevancia de prestar atención a los complejos inorgánicos, ya que existe aún un vacío en esta

rama, debido a que la búsqueda de inhibidores se ha centrado casi por completo en moléculas orgánicas (Garza-Lopez, Kozak, & Gray, 2020).

La Tabla 1 se presenta un resumen sobre las investigaciones antes mencionadas, donde se muestran los programas empleados, intervalos de docking scores, tamaño de la malla de acoplamiento (grid) y fármacos tentativos empleados.

Tabla 1

Investigaciones relacionadas con propuestas de fármacos para la inhibición de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2

PDB ID	Programas empleados	Malla de acoplamiento (GRID) / Sitios de unión	Intervalo-Docking Score (kcal.mol ⁻¹)	Fármacos tentativos a inhibir la M ^{pro}	Referencia
6LU7 2,16 Å	Omega2, AutoDock4.2.6, AMBER16	Medida: 60x60x60Å en (XYZ) Coordenadas: (X, Y, Z) = (- 13.069, 9.740, 68.49)	-10.4 a -9.8	MolPort-000-708-794, MolPort-044-179-844, MolPort-000-702-646, MolPort-002-513-915, MolPort-005-948-349, MolPort-039-056-062, MolPort-004-849-765, MolPort-046-158-375, y MolPort-001-751-850	(Ibrahim, Abdeljawaad, Abdelrahman, & Hegazy, 2020)
6LU7 2,16 Å	Omega2, AutoDock4.2.6, AMBER16, Gaussian09, Molinspiration cheminformatics	Medida: 60x60x60Å en (XYZ) Coordenadas: (X, Y, Z) = (- 13.069, 9.740, 68.49)	-9.7 a -3.5	Ácido salvianólico A, Curcumina, Crocetina, Ácido salvianólico B, Quercetina, Piperina, Picrocrocina, Mahanine, Capsantina, Capsaicina, Carnosol, Tanshinone I, Kaempferol, Baicalin, Cryptotanshinone, Girinimbina, Shogaols, Carnosic acid, Gingerols, Tanshinone IIA, Marliolide, Zingerone, Acetyeugenol, Timoquinona, Safranal, Eugenol, S-Allyl cysteine, Trisulfuro de dialilo, Disulfuro de dipropilo,	(Ibrahim et al., 2020)

6Y2F (1.95Å°) 6W63 (2.10Å°)	Schrödinger 2019	6Y2F: Medida: 10x10x10Å en (ZYZ) Coordenadas: (X, Y, Z) = (11.0, - 0.61,20.38) 6W63: Medida: 10x10x10Å en (X, Y, Z) Coordenadas: (X, Y, Z) = (- 20.46, 18.17, - 26.28)	6Y2F: -14.57 a -9.18 6W63: -12.425 a - 9.007	Disulfuro de dialilo, Sulfuro de dipropilo, y Di- allyl sulfide. Tres mejores compuestos: 6Y2F: SN00293542, SN00334894 y SN00213037 6W63:SN00382835, SN00403420 y 20633-84-5	(Kumar et al., 2020)
6LU7 2,16 Å	PyRx 0.9.4, Discovery Studio Client, ChemBioOffice 12.0	-	-7.54 a - 4.68	Compuestos: 1-17(enumerados), N3	(Cao et al., 2021)
6LU7 2,16 Å	Omega, SZYBKI, Autodock Vina, AMBER16, Gaussian09, Discovery studio.	Medida: 25x25x25Å en (XYZ) Coordenadas: (X, Y, Z) = (- 13.069, 9.740, 68.49)	-8.3 a -5.3	Umifenovir, Favipiravir, Triazavirina, Oseltamivir, Baloxavir marboxil, Hidroxicloroquina, Cloroquina, TMC- 310911, Ritonavir, Lopinavir, Darunavir, Alafenamida de tenofovir, Emtricitabine, Metilprednisolona, Ribavirina, Remdesivir, Galidesivir y Azitromicina	(Ibrahim et al., 2021)
6LU7 2,16 Å	AutoDock4.2, Gaussian09, AGFR, Discovery Studio, GROMACS	Medida: 52x60x52Å en (XYZ) Coordenadas: -	-50.49 a 36.40	Ligandos: L1, L2, L3, C1, C2 y C3	(Milenković et al., 2020)
6LU7 2,16 Å	Gaussian 16, AutoDock4, Discovery Studio	Medida: 60x60x60Å en (XYZ) Coordenadas: -	-10 a -5	N3, VO(H ₂ O)-N3modif (COO ⁻) ₂ , trans-BMOV, cis-VO(H ₂ O)(acac) ₂ , cis- BMOV, VO(EDT) ₂ , TSAG0101, VO(EBIP), cis-VO(H ₂ O)(ox) ₂ , trans- VO(acac) ₂ , VO(H ₂ O) ₂ DPC y trans- VO(ox) ₂	(Scior et al., 2021)

6LU7 2,16 Å	Autodock Discovery Studio Visualizer, Avogadro, NAnoscale Molecular Dynamics (NAMD), Visual Molecular Dynamics program (VMD 1.9.3)	4.2,	Medida: - Coordenadas: (X, Y, Z) = (- 11.824, 14.735, 74.152)	-7.7 a - 6.87	CQ, HCQ, Zn(CQ)Cl, Zn(HCQ)Cl, Zn(QC)Cl ₂ (H ₂ O) y Zn(HQC)Cl ₂ (H ₂ O)	(Hussein & Elkhair, 2021)
6Y2E 2.44Å°	UCSF Chimera, AutoDock, HyperChem 8.0,	-	-	-6.7 a -6.2	MSZ, Ca-MSZ, Fe-MSZ, Mg-MSZ, Mn-MSZ y Zn- MSZ	(Abdelaal Ahmed Mahmoud M. Alkhatip et al., 2021)
6LU7 2,16 Å	UCSF Chimera,, AutoDock Vina,	-	-	-7.2 a -6.2	[Co(acacen)(NH ₃) ₂] ⁺ , Cu (II)Lm, Cu (II)Lm-metilo y Cu (II) Lm-mini	(Garza-Lopez et al., 2020)

1.3 Justificación

A fines de 2019, la propagación mundial de un nuevo virus perteneciente a la familia de los coronavirus, el “SARS-CoV-2”, tuvo su origen en Wuhan, China, que rápidamente se convirtió en una pandemia. En la primavera del 2020, la Organización Mundial de la Salud nombró a la enfermedad epidémica causada por este virus “Enfermedad por virus Corona 2019 ”, o COVID-19 (Kumar et al., 2020). Según WHO hasta la fecha del 6 de diciembre del 2023 se han reportado 772,138,818 casos confirmados y 6,985,964 muertes a nivel mundial (“WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard,” n.d.) Esta situación ha hecho que el COVID-19 se haya convertido en una pandemia de proporciones extraordinarias, provocando disturbios en todo el mundo, rupturas en los viajes, en la actividad económica y la vida social también se ha visto afectada con el aislamiento obligatorio.

Actualmente el reposicionamiento de fármacos ya aprobados para su uso en humanos es una herramienta útil para buscar nuevas opciones terapéuticas. El reposicionamiento se

define como el nuevo uso que se le da a un fármaco, además de su (s) indicación (es) original (es), y es una opción para la identificación rápida de nuevos agentes terapéuticos. El empleo de métodos computacionales en la búsqueda de nuevos fármacos contribuye al análisis y filtrado de compuestos, de esta manera se seleccionan moléculas para una posterior evaluación experimental, además de haber generado aportes en el diseño de nuevas estructuras que a la fecha se encuentran en uso clínico (Jourdan, Bureau, Rochais, & Dallemagne, 2020).

Las vacunas de mayor efectividad, como por ejemplo la de Pfizer, no consideran a la proteasa M^{pro}, y están basadas en un mecanismo de entrega de microARN para el reconocimiento a posteriori de la proteína Spike del SARS-CoV-2 (Corum Jonathan & Zimmer Carl, 2021). Por ello se destaca la relevancia de proponer inhibidores de M^{pro} como posibles candidatos a fármacos, ya que esta proteasa escinde secuencias de polipéptidos esenciales para la replicación viral, lo cual coloca a M^{pro} como una enzima clave en el ciclo de replicación del virus. En consecuencia, su inhibición podría detener la generación de partículas virales infecciosas y ayudar a mejorar los síntomas de la enfermedad (Ullrich & Nitsche, 2020).

Para ello es necesario basarnos en principios de Química Medicinal y herramientas computacionales, lo que conllevará a disminuir grandes montos de dinero que se utilizan con el objetivo de identificar fármacos potenciales.

1.3.1 Alcances del proyecto de Investigación

- Se pretende contribuir a la investigación relacionada con la elaboración de moléculas más efectivas, ya que eventualmente podrían surgir nuevas mutaciones del SARS-CoV-2, tanto en Perú como en el extranjero.

- Alcanzar experiencia en el manejo de programas computacionales que permitan hacer la réplica con estudiantes de la UNI, tanto a nivel de pregrado como de posgrado.
- Reactivar el Convenio UNI-IIAP de tal manera que se pueda apoyar a la sostenibilidad del MANATÍ (supercomputador) la cual se fundamenta justamente con la realización de actividades científicas y académicas en conjunto con esta entidad (publicaciones, talleres, etc).
- Producir 01 artículo científico
- Producir 01 tesis de Licenciatura.
- Participación en Congreso Nacional o Internacional

1.3.2 Limitaciones del Proyecto de Investigación

En el presente trabajo de investigación de tesis se emplean técnicas in silico para la propuesta de un fármaco metalado con galio contra el SARS-CoV-2, empleando algunos softwares con licencia y otros de acceso libre en la web. Sin embargo, se queda en esta etapa de investigación, que se encuentra dentro de las competencias solicitadas en una tesis de pregrado. Sin embargo, la etapa de síntesis, caracterización y su análisis biológico y farmacológico se dejará de lado debido a la gran complejidad a la que conllevaría el trabajo en conjunto.

1.3.3 Restricciones Económicas

El presente proyecto emplea softwares de paga como el Schrödinger, del cual se dispone la licencia correspondiente, sin embargo, también emplea programas de código abierto muy empleados en la actualidad, y que, siendo gratuitos, son muy empleados y citados en publicaciones de alto impacto en el desarrollo y modelado de fármacos. Solo se trabaja

computacionalmente y no se necesitarán solicitar algún reactivo específico para la síntesis o caracterización.

1.3.4 Restricciones Sociales

En la situación actual en la que vivimos, ocasionada por esta pandemia (COVID-19) es importante cuidarse y evitar en lo posible la salida a espacios concurridos. Este proyecto al tratarse de un trabajo *in silico*, se puede trabajar desde una computadora, sin la necesidad de ir al laboratorio de la universidad, de esta se evita cualquier tipo de posible contagio.

1.3.5 Restricciones Ambientales

Este proyecto no contempla el uso de algún reactivo en específico, por ello no causa algún tipo de contaminación. Adicionalmente se resalta las ventajas de este tipo de trabajo al ser amable y respetuoso con el medio ambiente y no generar residuos químicos que puedan contaminar.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Emplear técnicas computacionales (*in silico*) y principios de Química Medicinal para diseñar un complejo de galio candidato a inhibidor de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Elaborar una biblioteca virtual de estructuras partiendo de modificaciones estructurales del inhibidor N3 de la proteasa M^{pro} empleando fragmentos bioisostéricos de la base de datos SwissBioisostere (ligandos).
- Ejecutar el virtual screening (criado virtual) del blanco M^{pro} con la biblioteca virtual de ligandos creada empleando el supercomputador MANATÍ.
- Realizar el virtual screening de docking covalente y no covalente de los ligandos con mejor docking score.
- Metalar con galio los hits computacionales con mejor docking score.
- Evaluar el cumplimiento de la regla de Lipinski de los compuestos metalados y ejecutar el docking molecular utilizando el software Schrödinger.
- Análisis de mejores complejos mediante la dinámica molecular.

1.4.3 Objetivos Logrados

- Elaborar una biblioteca virtual de estructuras a partir de modificaciones estructurales del inhibidor N3 de la proteasa M^{pro} empleando fragmentos bioisostéricos de la base de datos SwissBioisostere (ligandos).
- Ejecutar el virtual screening (criado virtual) del blanco M^{pro} con la biblioteca virtual de ligandos creada empleando el supercomputador MANATÍ.
- Realizar el virtual screening de docking covalente y no covalente de los ligandos con mejor docking score.
- Metalar con galio los hits computacionales con mejor docking score.

- Evaluar el cumplimiento de la regla de Lipinski de los compuestos metalados y ejecutar el docking molecular utilizando el software Schrödinger.
- Análisis de mejores complejos mediante la dinámica molecular.

CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 COVID-19

La grave enfermedad producida por el coronavirus 2019 (COVID-19) ocasionada por el virus SARS-CoV-2 se registró en diciembre del 2019, cuando surgió un caso de neumonía grave producido en Wuhan, provincia de Hubei en China (Díaz-Castrillón & Toro-Montoya, 2020). Los casos iniciales afectaron a personas que laboraban en el *Huanan Seafood Wholesale Market*, siendo este un lugar de comida marina donde se distribuía comida de animales silvestres (Khan et al., 2020; Shereen, Khan, Kazmi, Bashir, & Siddique, 2020).

Este brote se extendió hasta confirmarse gran cantidad de sucesos semejantes en diferentes regiones de China. La propagación continuó hasta otros países y el 11 de marzo del 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró como una pandemia mundial, comunicando a todos los países de tomar las precauciones necesarias para controlar la pandemia (Shereen et al., 2020; “WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020,” n.d.; Wu & McGoogan, 2020).

Algunos síntomas más comunes de esta enfermedad son la tos y fiebre, además de presentar dificultad para respirar, cansancio, pérdida del olfato o el gusto, dolor de cabeza, dolor de garganta, congestión nasal y náuseas, los cuales se encuentran presente en la mayoría de pacientes registrados (“Síntomas del COVID-19 | CDC,” 2021).

Para disminuir la propagación del virus SARS-CoV-2 se recomienda el distanciamiento social, recomendando mantener un espacio de dos metros, debido a que esta es la principal vía de contagio del virus, mediante de las gotas de saliva que se generan cuando se habla (Van Cuong et al., 2020; WHO, 2020).

2.2 Biología molecular del coronavirus SARS-CoV-2

2.2.1 SARS-CoV-2

Los virus se pueden definir como parásitos muy pequeños que se encuentran generalmente en el rango de 0.02 a 0.3 micrómetros de tamaño, aunque actualmente se han llegado a encontrar virus de mayor tamaño que llegan hasta 1 micrómetro de longitud. Si se adopta la postura más simple de la vida como lo hace la NASA: “un sistema químico autosuficiente capaz de tener una evolución darwiniana” los virus no serían denominados seres vivos, ya que estos pese a tener sus propios genomas de ADN o de ARN, no pueden replicarse, tampoco autosustentarse ni mucho menos evolucionar de forma independiente, ya que requerirían de todo el sistema enzimático que posee la célula para replicar su genoma (Campillo-Balderas, 2020).

Estos virus pueden poseer genomas de ADN o ARN, los cuales se encuentran protegidos por una estructura denominada cápside, la cual posee diferentes formas (icosaédrica, helicoidal o compleja) dándose la posibilidad de que en algunos casos esta cápside se encuentre cubierta por una membrana lipídica, que contiene proteínas de membrana importantes para el mecanismo del virus, su correcto funcionamiento y estabilidad de las partículas virales (glicoproteína de la envoltura, glicoproteína de membrana y la glicoproteína S, también denominada espícula, que es una proteína que sobresale desde la membrana) (Menor, 2018).

El SARS-CoV-2 es un virus que proviene de la familia coronavirus (coronavirus) y es el último de los 7 coronavirus identificados hasta la actualidad, el cual posee su cápside envuelta en una membrana lipídica, Posee genoma ARN, siendo este una cadena lineal de ARN, con sentido positivo que codifica cuatro proteínas estructurales (S, N, M, y E) y de tres a seis proteínas no estructurales que incluye además a una polimerasa de ARN dependiente de ARN (Campillo-Balderas, 2020).

Este coronavirus interactúa con la proteína (receptor) ACE-2 mediante la espícula (S) el cual da inicio a la infección de este virus en nuestro organismo, ello se puede apreciar en la Figura 1 que representa la estructura del SARS-CoV-2 y la unión de la espícula al receptor (proteína ACE2) de las células humanas.

Estructura del coronavirus: unión de la espícula al receptor de las células humanas

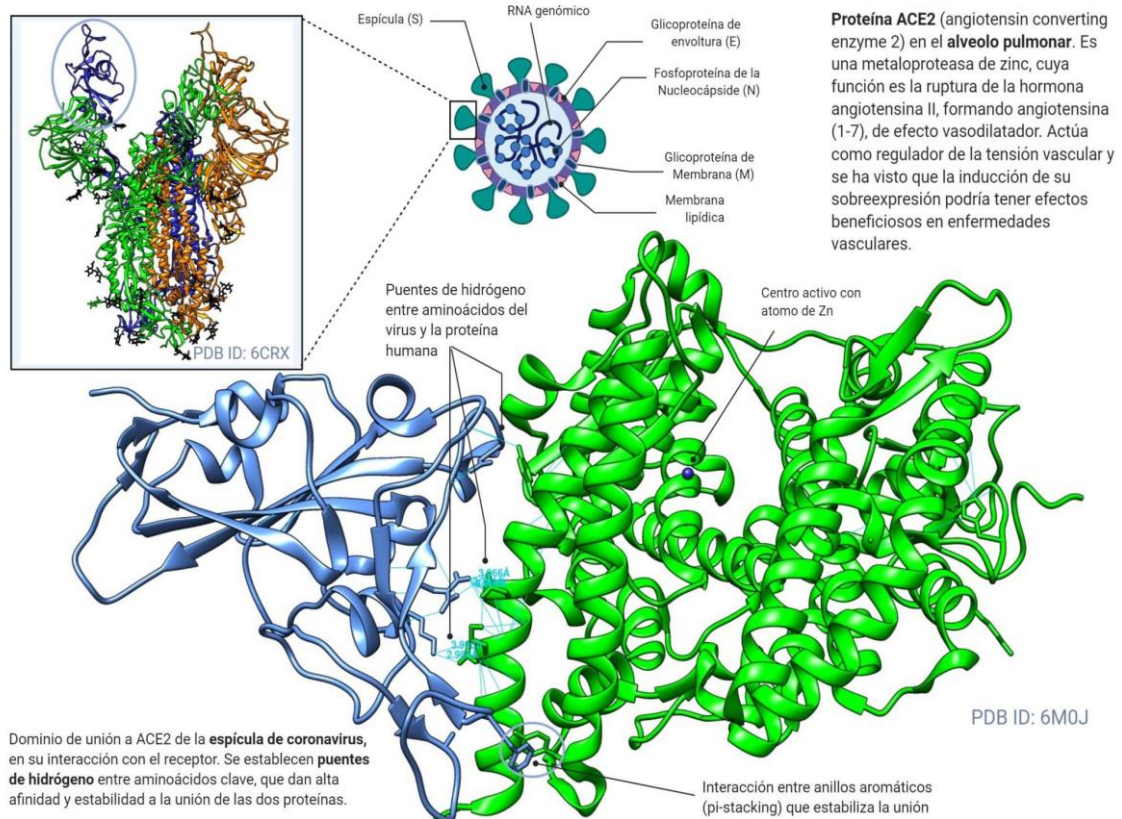


Figura 1. Esquema de la estructura del SARS-CoV-2 y la interacción de la proteína S con el receptor ACE-2 que dará comienzo a la infección. Tomado de (Menor, 2018).

Un marco de lectura abierto (ORF) se define como cualquier región que pertenezca al ADN o ARN y se encuentre ubicada entre un codón de inicio de la traducción (normalmente es AUG) y un codón de parada (TAA, TAG o TGA). El SARS-CoV-2 presenta catorce marcos de lecturas abiertos (ORF) los cuales se expresan en proteínas o poliproteínas.

Las proteínas estructurales principales son la glicoproteína de superficie (espícula o "Spike"), la proteína de envoltura (E), la proteína de membrana (M) y la proteína de la nucleocápside (N). El marco de lectura principal ORF 1ab que representa el 67% del genoma codifica dos poliproteínas superpuestas (pp1a, pp1ab), que se escinden posteriormente en 16 proteínas no estructurales (nsp1-16) por acción de la proteasa M^{pro} (también conocida como

3CL^{pro}) y la PL^{pro} (Figura 2), los restantes ORF codifican a ocho proteínas de accesorio y cuatro proteínas estructurales (Ciotti et al., 2020)

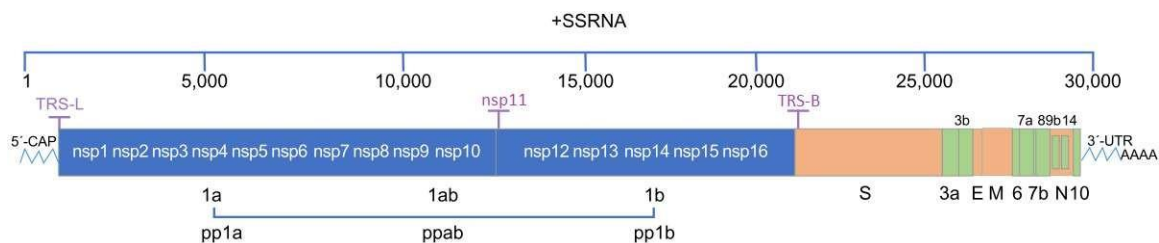


Figura 2. Estructura del genoma de SARS-CoV-2. Modificado de (Ciotti et al, 2020).

La Tabla 2 resume las principales características y funciones de los marcos de lectura abiertos y las proteínas del SARS-CoV-2.

Tabla 2

Funciones Principales de los Marcos de Lecturas Abiertos y las Proteínas del SARS-CoV-2

ORF	Proteína	Residuos	Función
1a	nsp1	181	Participa en la restricción del rango de huéspedes para contrarrestar la respuesta antiviral innata del huésped y suprimir la apoptosis los inicios de la infección, promueve el crecimiento viral.
	nsp2	819	Involucrado en la interrupción de la señalización del huésped intracelular durante las infecciones por SARS-CoV.
	nsp3	2764	Conocida como proteína semejante a la papaína (PL ^{pro}). Libera nsp1, nsp2 y nsp3 de la región N-terminal de pp1a y 1ab.

	nsp4	3264	Complejo con función principal de replicación-transcripción viral que ayuda a modificar las membranas del retículo endoplásmico (ER).
	nsp5	3570	Conocida como 3CL ^{PRO} o M ^{PRO} . Se escinde en 11 sitios distintos en la poliproteína ORF1ab, tiene una díada catalítica (Cys145-His41)
	nsp6	3860	Induce la formación de autofagosomas derivados de ER.
	nsp7	3943	Forma un complejo junto a nsp8 y nsp12 para producir la actividad ARN polimerasa.
	nsp8	4141	Formación de heterodímero con nsp8 y nsp12.
	nsp9	4254	Forma un complejo con nsp8, con función en la replicación del ARN del virus.
	nsp10	4392	Forma heterodímeros con nsp14 y nsp16.
1b	nsp11	13	Esencial para la replicación.
	nsp12	5325	Llamada también ARN polimerasa dependiente de ARN. Encargada de copiar el ARN viral.
	nsp13	5926	Tiene múltiples actividades enzimáticas: actividades helicasa, ARN 5'-trifosfatasa y NTPasa.

	nsp14	6453	Presenta dos actividades: actividad guanosina N7-metiltransferasa y actividad exoribonucleasa.
	nsp15	6799	Endoribonucleasa, evasión de sensores de dsRNA (Virus ARN bicatenario).
	nsp16	7096	Evasión del reconocimiento MDA5, regulación negativa de la inmunidad innata.
S	S	1273	Forma homotrímeros en la superficie viral, además se une a la proteína ACE2.
3a	3a	275	Modula la liberación del virus.
3b	3b	22	Activación de AP-1. Inducción de apoptosis.
E	E	75	Facilita el acople y la liberación de los virus.
M	M	222	Ensamble del virión. Interactúa con las proteínas N y E.
6	6	61	Inhibe de la síntesis de IFN y la traslocación de STAT1.
7a	7a	121	Proteína involucrada en el ensamble viral.
7b	7b	43	Proteína integral de membrana.
8	8	121	Modulación de la replicación viral, activación de caspasa-3.

N	N	419	Interactúa con la proteína M. Participa en la transcripción de RNA viral y en la replicación viral.
14	14	73	Función desconocida.
10	10	38	Función desconocida.

Nota: Modificado de (Raj, 2021; Yadav et al., 2021; Yoshimoto, 2021)

2.2.2 M^{pro} (3CL^{pro} o nsp5)

La proteasa de coronavirus nsp5 (M^{pro}, 3CL^{pro}) es una cisteína proteasa que presenta una masa molar de aproximadamente 33.8 kDa. Actualmente es un objetivo principal para el tratamiento del coronavirus debido a su papel indispensable en el procesamiento proteolítico de las poliproteínas de la replicasa viral (pp1a y pp1ab) (Jin et al., 2020).

Su otro nombre “proteasa similar a 3C” es atribuido a las semejanzas que tiene con las proteasas 3C, como sus especificidades de sustratos simples y homología estructural del núcleo (Roe, Junod, Young, Beachboard, & Stobart, 2021).

Entre los 7 coronavirus humanos conocidos hasta la actualidad, se presentan el SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-229E y HCoV-NL63, donde la proteasa M^{pro} exhibe una identidad de secuencia superior al 80%, como es el caso del análisis de la secuencia de SARS-CoV y SARS-CoV-2, en las cuales se presenta tan solo 12 diferencias en residuos, mostrando un 96% de identidad aproximadamente. Mientras que para otras proteínas no relacionada se exhibe una identidad de secuencia cercana al 50%.

Los dominios N-terminales (1 y 2) de nsp5 se encuentran conservados estructuralmente, formando un pliegue semejante a quimotripsina (una enzima que realiza proteólisis y que posee una cadena polipeptídica de 245 residuos, con cinco enlaces

disulfuro) (Figura 3) (Stobart et al., 2013). La diada catalítica de la proteasa se encuentra conformado por el par His-Cys, con el residuo Cys que actúa como nucleófilo en la reacción

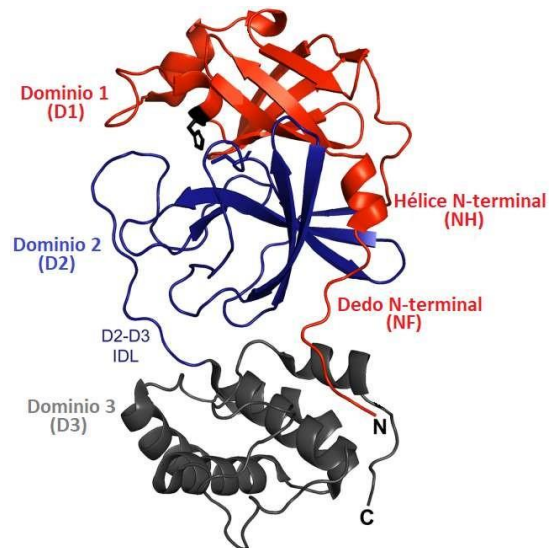


Figura 3. Estructura monomérica de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 (PDB: 6M2N) con los tres dominios, el dedo N-terminal (NF), la hélice N-terminal (NH) y el bucle Inter dominio de dominio 2-dominio 3 (IDL). Tomada de (Roe et al., 2021).

proteolítica catalizada por enzimas (Figura 4) (Jin et al., 2020).

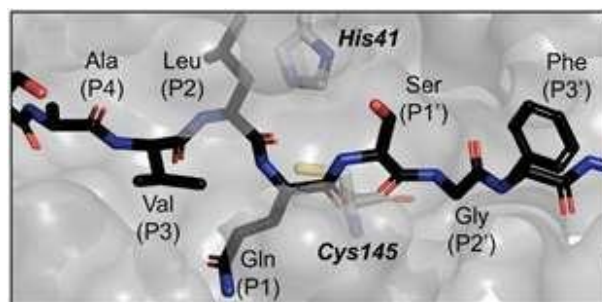


Figura 4. Sitio activo de un péptido donde se muestran los residuos de la diada catalítica. Tomada de (Roe et al., 2021).

Cada monómero de este virus se compone de tres dominios. El dominio I (que incluye los residuos desde el 8 hasta el 101) y el dominio II (residuos que van desde el 102 hasta el 184) tienen una estructura de barril β antiparalela. El dominio III (residuos que van desde el 201 al 303) contiene cinco hélices tipo α y se encuentra conectado al dominio II. Pese a que se han caracterizado bien los dominios 1 y 2 del M^{pro} , se conoce muy poco acerca del tercer dominio de hélice alfa, sin embargo, se ha logrado demostrar que su principal función es dirigir la dimerización de M^{pro} y de esta manera ayudar a estabilizar el pliegue, esto es de suma importancia ya que la forma monomérica de M^{pro} prácticamente es inactiva, pero al producirse la dimerización la M^{pro} cumple sus funciones con normalidad (Jin et al., 2020; Roe et al., 2021).

La Figura 5 muestra la estructura dimérica de la proteína, donde se aprecian las orientaciones de los 2 monómeros. Los asteriscos de verde indican el sitio catalítico con una representación de tubos negros para la diada His41-Cys145.

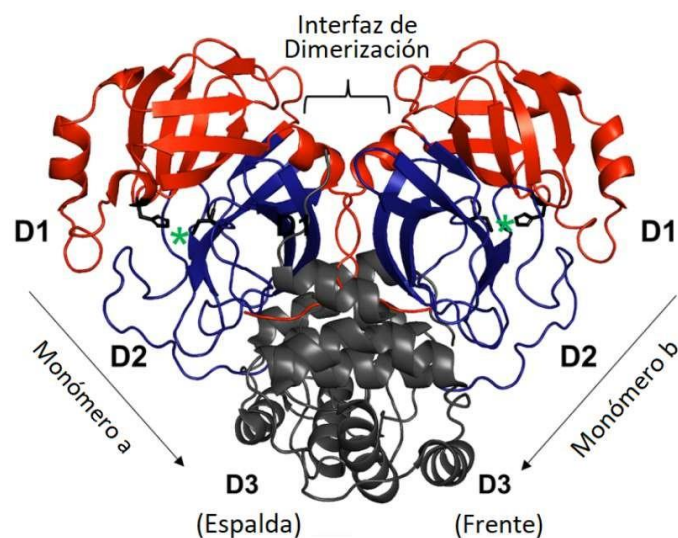


Figura 5. Estructura del dímero M^{pro} con la orientación de los dos monómeros. Tomado de (Roe et al., 2021).

Es bien conocido que las proteasas como la M^{pro} puede escindir cadenas polipeptídicas, a partir de la hidrólisis de la cadena polipeptídica. Esto sucede cuando el polipéptido se acopla al sitio activo, una vez el enlace tipo amida se hidroliza, se escindirá y generará un ácido carboxílico y la amina correspondiente. Estas proteasas M^{pro} contienen la diada catalítica His41-Cys145 la cual va a escindir cadenas de polipéptidos que comienza cuando la histidina desprotona al azufre de la cisteína, para producir un grupo tiolato que actuará como nucleófilo atacando al carbono del grupo carbonilo del péptido y formando un intermedio tetraédrico mediante el siguiente mecanismo de reacción presentado el cuál se descompondrá en un grupo éster de tiol y una amina.

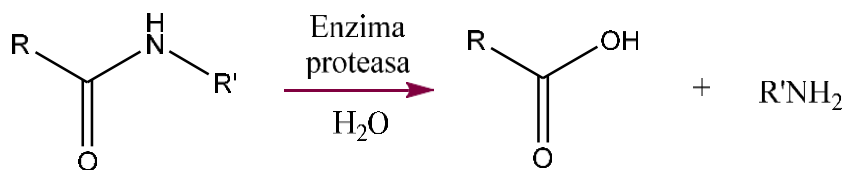


Figura 6. Escisión de un enlace amida mediante la proteasa enzima. Tomado de (S. Zhang et al., 2021).

Posteriormente ocurrirá una hidrólisis con agua del grupo éster de tiol para producir un ácido carboxílico, de esta manera se completa la escisión del polipéptido, además de la regeneración de la enzima inicial, lo mencionado se presenta gráficamente en las Figuras 6 y 7 (S. Zhang et al., 2021).

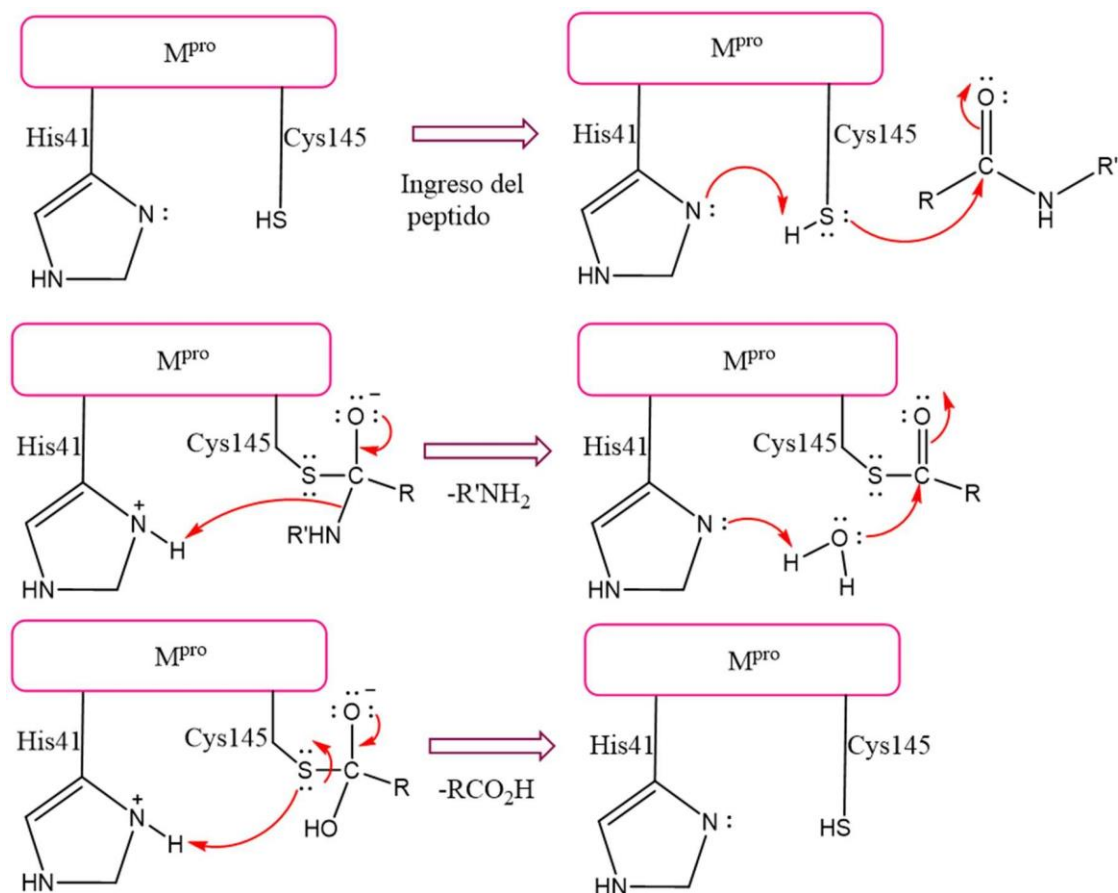


Figura 7. Mecanismo de la diada catalítica. Adaptado de (S. Zhang et al., 2021).

La Tabla 3 resume los aminoácidos más representativos en la unión de un sustrato a la proteína M^{pro}.

Tabla 3

Aminoácidos de la diada catalítica y del sitio de unión para el Mpro del SARS-CoV-2

Función	Aminoácidos involucrados
Diada Catalítica	His41, Cys145
Sitio de unión catalítica	Gln189, His164, Gly143, Asn142, Ser144, Phe140, Glu166, Pro168, Phe140, His163, Ala191, Met165, Asn142, Phe185, Gln192, Asp187, His172, Leu141, Leu167, Thr190, Pro168, Met49

Nota: Modificado de (Jin et al., 2020; L. Zhang et al., 2020).

2.3 Metalofármacos

Tradicionalmente la industria farmacéutica estaba dominada por el área de la Química Orgánica, sin embargo, con el hallazgo de desconocidos fármacos metalados se produjo un creciente desarrollo en la llamada Química Inorgánica Medicinal. Esto fue inicialmente estimulado por el descubrimiento del cis-platino ($\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$), un fármaco anticancerígeno muy conocido actualmente, este compuesto tiene la capacidad de detener la división celular, mas no el crecimiento celular (Rodriguez, 2017).

Junto con este compuesto descubierto han surgido otros complejos de platino de diferentes elementos, tales como el Ru, Rh, Ti, Ga, Sn, etc. Además de estos fármacos antitumorales, se han adicionado otros con actividad antiartrítica, antiulcerosa o antiviral. Actualmente se resalta la importancia del empleo de los elementos metálicos en los fármacos, ya que estos son indispensables para el correcto funcionamiento de los organismos y para la normal actividad de los procesos metabólicos y fisiológicos (Baran, 2014).

Los metalofármacos pueden tener diferentes finalidades, desde su uso con actividad antitumoral, donde el descubrimiento más importante encontrar la actividad antitumoral del complejo cis-diclorodiamino-platino (II) (Figura 8) por Barnett Rosenberg en el año 1969. Este demostró efectividad en el tratamiento de cánceres de testículo y ovario.

Además de ellos también se encuentran los metalofármacos con actividad antiartrítica, donde la Auranofina (Figura 9) resulta particularmente activo por su administración oral y citotoxicidad frente a diversas células tumorales (Baran, 2014).

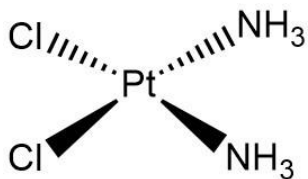


Figura 8. Estructura del *cis*-diclorodiaminoplatino (II).

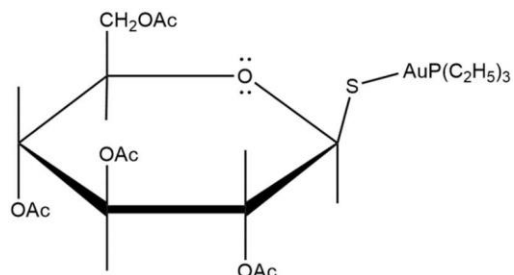


Figura 9. Estructura de la Auranoquina.

Los metalofármacos con actividad insulino-mimética también se encuentran presentes, donde a insulina se administra perenteralmente y no vía oral, por ello ha habido un interés en los compuestos insulino-miméticos de vanadio, los cuales se administran vía oral. Destaca el bis(maltolato)oxovanadio (IV) (Figura 10), el cual es efectivo, además de presentar baja toxicidad pudiéndose administrar oralmente con agua (Baran, 2014).

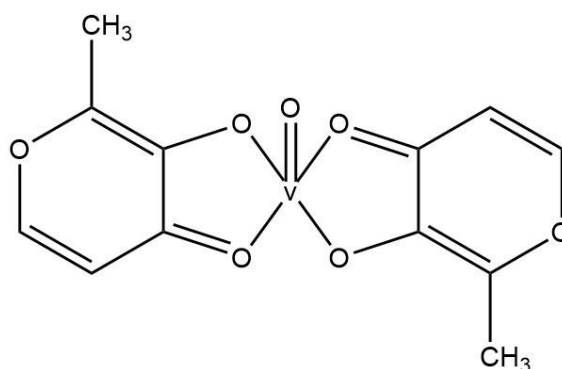


Figura 10. Estructura del bis (maltolato) oxovanadio (IV).

2.3.1 Metalofármacos antivirales

El rango de actividad antiviral de los metalofármacos *in vitro* resulta semejante a los fármacos orgánicos, estos deben seguir el paradigma de selectividad, es decir, actuar contra el virus y no contra las células humanas. Los iones metálicos son más versátiles que los orgánicos, esto hace que los investigadores realicen ajustes finitos durante el desarrollo de fármacos. Según Bergamini “estos iones reciben carga fácilmente y favorece el intercambio

de ligandos con el medio, esta es una de las razones por las que en la naturaleza incluye iones metálicos en nuestros sistemas biológicos con alrededor del 30-40% de nuestras proteínas contiene iones metálicos para desarrollar nuestras funciones” explica la científica (De Paiva et al., 2020).

El campo de la Química Inorgánica Medicinal ha contribuido al diseño de complejos metálicos que abarcan un amplio rango de iones, los cuales, al combinarse con ligandos específicos, son capaces de abordar diversas enfermedades.

Actualmente, los complejos metálicos se evaluaron *in vitro* contra cepas virales de SARS-CoV-2, SARS-CoV, VIH, virus de inmunodeficiencia de simios, adenovirus humano, virus Sinbdis, virus de la arteritis equina, virus de la estomatitis vesicular, virus respiratorio sincitial, virus para-influenza-3, influenza A y B, Reovirus-1, virus Punta Toro, Citomegalovirus, Poliovirus, CHKV y virus de la Encefalitis Equina Venezolana. Entre los principales complejos metálicos antivirales estudiados destacan los complejos de cobalto, los cuales fueron descritos por Louie y Meade en la década de 1990, describieron la síntesis de complejos de Co (III) con derivados de bases de Schiff de bis(acetona)etilendiamina, acacen, es decir Co-1 a Co-4 (Figura 11) los cuales pudieron inhibir el virus del herpes simple (HVS-1) (De Paiva et al., 2020).

El grupo de Che estudió una serie de porfirinas de vanadilo como agentes anti-VIH (V-1 a V-5) (Figura 12). A $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, el compuesto V-1 fue el más activo, inhibiendo 97% de la replicación del VIH-1 en células Hut / CCR5. Para determinar si los compuestos probados estaban dotados de actividad antiviral selectiva frente a actividad antiproliferativa hacia las células Hut / CCR5 huésped, se siguió el efecto de los compuestos de porfirinas de oxovanadio (IV) en células Hut / CCR5 mediante ensayo MTT empleado para probar la citotoxicidad.

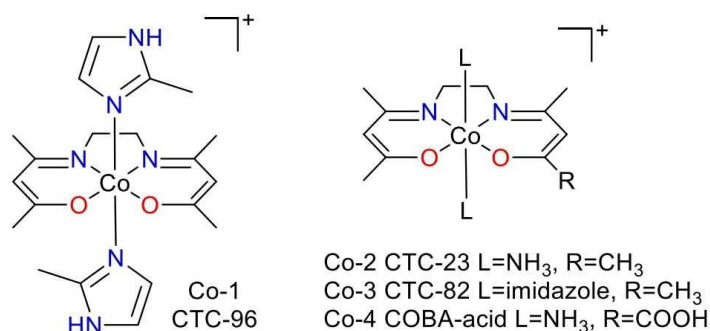


Figura 11. Complejos $[Co(acacac)L_2]^+$ estudiados como antivirales.

Fuente: Tomado de (De Paiva et al., 2020).

Además de ello complejos de Cu (II) del tipo $[Cu(L)_2]_2(CH_3COO)$ (donde L = 1,10-fenantrolina y una serie de sus derivados mono y disustituídos) describieron sus actividades virostáticas contra el virus de la influenza (cepa Mel) (De Paiva et al., 2020).

Los medicamentos antivirales como la amantadina (ATD) y la rimantadina (RTD) poseen un grupo adamantilo que es responsable de bloquear los canales M2 (proteína transmembrana tetramérica que se abre de manera dependiente del pH.) de los virus de la influenza. Tal bloqueo impide la liberación viral y genómica en las células huésped.

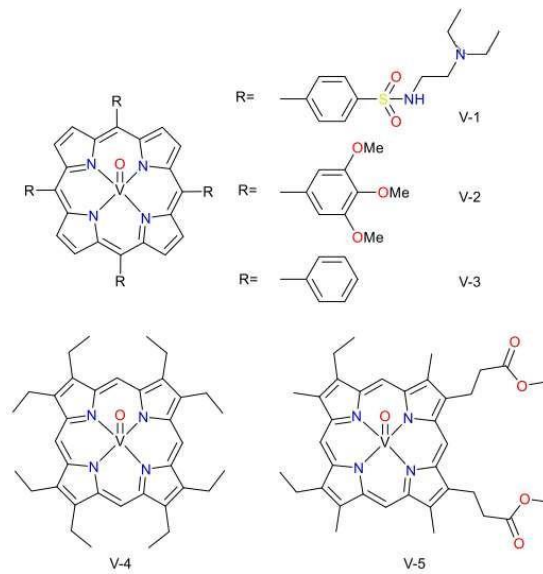


Figura 12. Complejos de V (IV) basados en porfirina evaluados como compuestos anti-VIH. Tomado de (De Paiva et al., 2020).

Debido a las mutaciones M2, ATD y RTD ya no forman parte de la terapéutica de primera línea y se requiere nuevos fármacos que superen esta resistencia particular. Por ello una serie de complejos de Cu (II) que llevan ligandos trípede (Figura 13) han sido evaluados como potenciales antivirales contra la influenza (De Paiva et al., 2020).

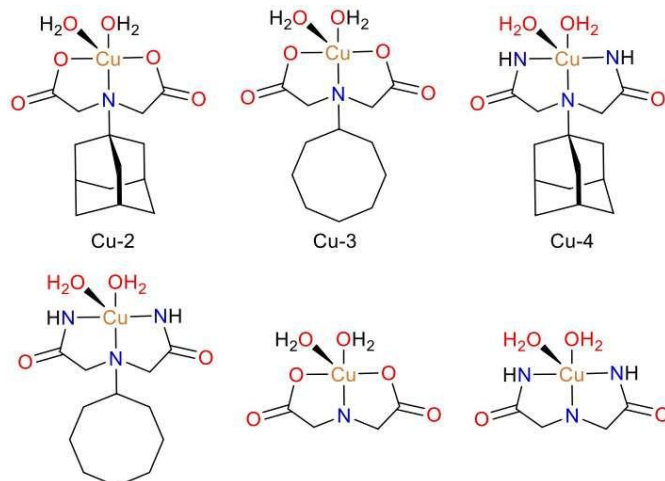


Figura 13. Complejos de Cu (II) con ligandos trípede. Tomado de (De Paiva et al., 2020).

2.3.1.1 Metalofármacos de galio

El galio pertenece al grupo 13 de la tabla periódica, el radio iónico de este es de 0.76Å, además de ello se comportan los cationes como ácidos duros, y muestran fuerte afinidad por ligandos duros o intermedios, principalmente por donadores de oxígeno o nitrógeno. El galio es capaz de unirse a otras proteínas que necesitan Fe (III), modificando procesos celulares (Baran, 2008).

Entre los elementos representativos de la tabla periódica, aquellos derivados del Ga (III) han resultado tentativos para desarrollar complejos. Algunas sales simples de galio, como el nitrato o el cloruro se han estudiado durante bastante tiempo, los cuales han mostrado actividad frente a tumores localizados en tejidos blandos. Actualmente nitrato de galio tiene la aprobación para tratar hipercalcemias derivadas de cuadros tumorales.

Se han desarrollado diferentes complejos de coordinación de galio, debido a que el galio tiene una desventaja y es que no se produce una buena absorción intestinal debido a su tendencia a la hidrólisis. Al buscar acomplejantes se busca la estabilización del catión, y de esta manera mejorar el grado de permeación en las membranas.

El tris(8-hidroxiquinolinato)galio(III) comúnmente llamado KP 46 (Figura 15) y el tris(maltolato)galio(III) (Figura 14) han mostrado un elevado éxito en modelos animales al

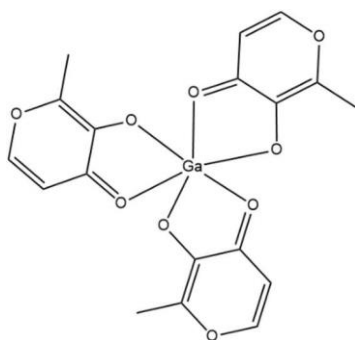


Figura 14. Estructura del tris(maltolato)galio(III).

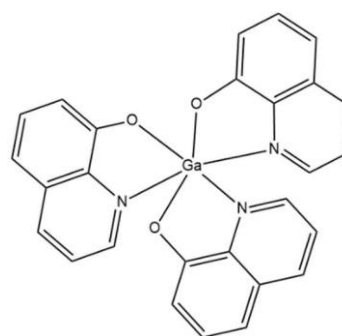


Figura 15. Estructura tris(8-quinolinato)galio(III), KP 46.

administrarlos oralmente, además de presentar actividad antitumoral superior a las sales de Ga (III) (Baran, 2014). Adicionalmente a los compuestos mencionados se han estudiado otros complejos de Ga (III) entre ellos podemos mencionar el tetraclorogalato (III) de bis(2-acetilpiridina-4,4-dimetil-3tiosemicarbonato-N,N,S)galio (III) el cual tiene una actividad citotóxica frente a diferentes líneas tumorales.

2.4 Regla de Lipinski

Para evaluar la capacidad farmacológica de las moléculas el Sr. Lipinski que trabajaba para la empresa Alemana Pfizer diseñó una regla, denominada la regla de Lipinski o regla de 5. Los criterios que se evalúan son los siguientes:

- Peso molecular menor que 500 g mol^{-1} .
- Coeficiente de partición logP menor que 5.
- Número de átomos donadores de hidrógeno (NH, OH) grupos aminos e hidroxilos menor que 5.
- Número de átomos aceptores de hidrógeno (N, O) menor que 5.

Estos criterios se realizan con la finalidad de encontrar un fármaco tenga una buena disponibilidad, además de poder atravesar membranas biológicas. Por ello el fármaco debe cumplir criterios de liposolubilidad, polaridad, carga eléctrica, tamaño molecular, etc.

Esta regla es muy empleada en Química Medicinal para poder detectar y también predecir el comportamiento de los posibles candidatos a fármacos para que a futuro engloben una fase de prueba (Azcárate, 2018).

En caso un compuesto no cumpla con estos criterios, o incumpla 2 o más tendrá problemas para clasificarse como un buen fármaco.

2.5 Diseño de fármacos asistido por computadoras (DIFAC)

El principal objetivo del DIFAC es la selección de compuestos que posean una actividad biológica para tratar alguna enfermedad en particular. El DIFAC se encuentra conformado por diferentes disciplinas las cuales abarcan el modelado molecular, bioinformática, biología, química teórica y química computacional, donde a través de modelos computacionales y el empleo de computadoras potentes se consigue generar metodologías y simulaciones de fármacos tentativos a ensayos biológicos. La Tabla 4 resume algunos programas especializados para realizar cálculos teóricos mediante el DIFAC.

Tabla 4

Principales Softwares Bioinformáticos

Software	Funcionalidad	Comercial/Académico	URL(Página)
Autodock	Docking molecular.	Académico	http://autodock.scripps.edu/
USCF Chimera	Visualizador, modelado de proteínas y moléculas	Académico	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
Datawarrior	Visualizador, cálculo de propiedades y otros descriptores	Académico	https://openmolecules.org/
Gaussian	Cálculo de propiedades cuánticas y cargas	Comercial	http://gaussian.com/

Maestro Schrödinger	Docking de proteínas y dinámica molecular	Comercial/ Académico	https://www.schrodinger.com/products/maestro
Mayachemtools	Cálculo de propiedades y otros descriptores	Académico	http://www.mayachemtools.org/
Modeller	Modelado de proteínas y modelos por homología	Comercial/ Académico	https://salilab.org/modeller/
MOPAC	Cálculo de propiedades cuánticas y cargas	Académico	http://www.openmopac.net/
NAMD	Dinámica molecular	Académico	http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/
Open Babel	Cambio de formatos, cálculo de cargas, torsiones y fragmentos moleculares	Académico	http://openbabel.org/wiki/Main_Page
Vega ZZ	Virtual screening	Académico	www.vegazz.net
Vina	Docking molecular	Académico	http://vina.scripps.edu/
VMD	Virtual screening	Académico	http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/

Nota: Tomado de (Prieto-Martínez & Medina-Franco, 2018)

2.6 Técnicas *in silico* para el modelamiento de fármacos

Los modelos experimentales se clasifican en tres categorías: experimentos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. Al referirse a experimentos *in vivo* hace referencia a que se está trabajando con especies. Experimentos *in vitro* se refieren cuando son realizados en dispositivos del laboratorio empleando células, tejidos que provienen de animales. Finalmente, experimentos *in silico* se refieren a simulaciones realizadas con softwares computacionales y modelos matemáticos para simular experimentos *in vivo* o *in vitro* (Velázquez, 2017). Entre las ventajas que tienen los modelos *in silico* es permite anticipar respuestas del sistema que se está estudiando, ya que la velocidad con la que se realizan supera a los modelos *in vivo*, además del menor gasto para su empleo, todas estas características justifican su abundante uso actualmente en el modelamiento de fármacos (Fina, Lombarte, & Rigalli, 2013).

Estos métodos empleando computadoras (*in silico*) permiten generar modelos teóricos además procesar grandes cantidades de información de forma muy rápida. (Saldívar-González, Prieto-Martínez, & Medina-Franco, 2017).

2.6.1 Docking molecular

Es un método bioinformático el cual se basa en predecir las posiciones más favorables de interacción entre un ligando (inhibidor) y un blanco (generalmente una proteína), a partir de una puntuación asignada (docking score). Los ligandos son moléculas pequeñas (alcaloides, ligandos orgánicos, inorgánicos, compuestos metalados, etc.), mientras que el blanco son generalmente moléculas de gran tamaño como proteínas, ácidos nucleicos (ADN/ARN), etc (Figura 16) (Vega Hidalgo, 2018). De esta manera que lo que se busca es obtener una actividad biológica favorable de ese fármaco en estudio, para obtener un efecto biológico beneficioso cuando se consuman.

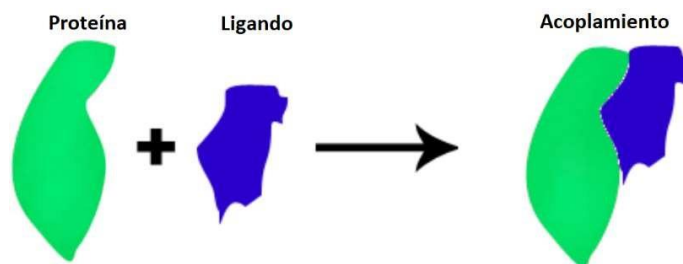


Figura 16. Representación del concepto de docking molecular.
Tomado de (Vega Hidalgo, 2018).

Para ejecutar un protocolo típico de un docking molecular, primero se deben seleccionar la estructura 3D para la macromolécula (blanco) y para el ligando de trabajo (molécula pequeña). Posteriormente se deberá preparar tanto a la proteína como al ligando de acuerdo con los requisitos del método del docking que se esté empleando. Posteriormente se ejecuta el docking molecular, y finalmente se analizan los resultados obtenidos mediante las puntuaciones obtenidas (docking score) (Morris & Lim-Wilby, 2008). Este protocolo general se representa en la Figura 17.

En el docking molecular es muy importante la preparación del blanco, esto se hace con la finalidad de realizar algunos ajustes indispensables que proporcionarán un menor error en la ejecución del docking molecular. Los procedimientos generalmente incluyen la adición de hidrógenos además de cargas y la asignación de un orden de enlace. Esto es esencial para realzar las condiciones biológicas del sistema, para así obtener con una mayor seguridad compuestos realmente bioactivos.

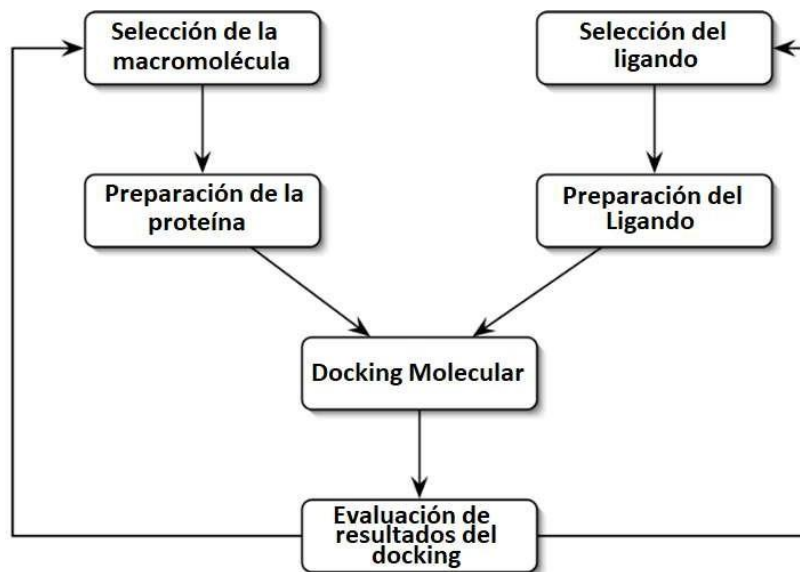


Figura 17. Protocolo general de un docking molecular. Modificado de (Morris & Lim-Wilby, 2008).

2.6.2 Virtual screening

El virtual screening (VS) basado en el docking molecular es un método eficaz que se utiliza para recuperar nuevos compuestos exitosos en el descubrimiento de fármacos. Esta técnica computacional ha ganado una gran atención y se ha convertido en una de las tecnologías centrales en el modelado y desarrollo de fármacos en la última década (Ye et al., 2020). Este consiste en realizar un filtro a partir de una gran cantidad de moléculas para poder seleccionar hits computacionales, los cuales serán llevados a una posterior evaluación experimental (Saldívar-González et al., 2017). Con esto se consigue reducir en gran medida el número de ensayos que se tendrían que hacer en caso no hubiese una selección apropiada. Los pasos del virtual screening se pueden apreciar en la Figura 18. El virtual screening emplea diferentes filtros que pueden variar dependiendo la base de datos a utilizar. Al conocer la estructura 3D del blanco lo que se sugiere es realizar un virtual screening basado en el docking

molecular. El virtual screening permite emplear filtros, de esta manera se facilita la búsqueda. Entre los diversos programas destaca el software Schrödinger.

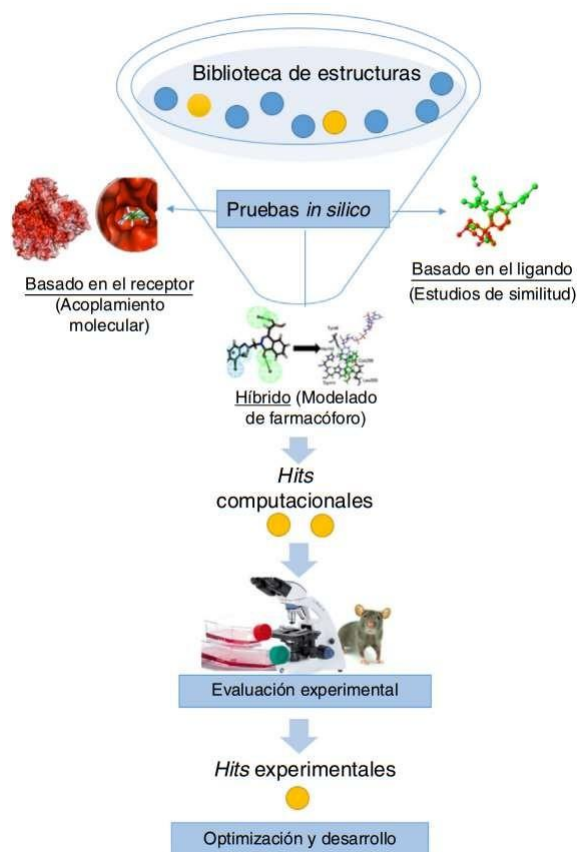


Figura 18. Esquema general del proceso de un virtual screening. Tomado de (Saldívar-González, Prieto-Martínez, & Medina-Franco, 2017).

2.6.3 Dinámica Molecular

La dinámica molecular es una herramienta computacional basada en la Mecánica Molecular o Clásica (MM) y es uno de los métodos más empleados cuando se requiere el analizar simulaciones de macromoléculas biológicas, esta emplea las ecuaciones de Newton y simula el movimiento atómico de manera que logra obtener información relevante del

sistema, cabe mencionar que este método ignora los movimientos de los electrones y se basa en calcular la energía de una molécula o macromolécula en función de las posiciones de los núcleos atómicos, es una aproximación ya que el analizar los movimientos de los electrones haría que se hagan los cálculos muy tediosos, viéndose restringidos a la cantidad máxima de átomos que se logren analizar, lo que involucra a la Mecánica Cuántica (QM).(Filipe & Loura, 2022)

2.6.4 Softwares computacionales y supercomputador MANATÍ

El empleo de softwares computacionales es indispensable a la hora de diseñar fármacos usando técnicas *in silico*. Existen una gran cantidad de estos que se logran acomodar a las necesidades de la persona, así como softwares comerciales y académicos, en esta sección se describirán los empleados en este trabajo, así como las características principales y ventajas de su uso.

2.6.4.1 Schrödinger

Schrödinger es un software de simulación química de última generación para el uso en la investigación farmacéutica y científica de los materiales (Figura 19). Maestro es el portal a toda la tecnología computacional de Schrödinger;, Maestro Schrödinger también ayuda a los investigadores a organizar y analizar datos (“Maestro | Schrödinger,” n.d.).

Entre las características que destaca Schrödinger tenemos:

- Presenta una interfaz renovada, al trabajar con un diseño el cual anticipa las acciones del usuario, así como organiza datos de forma intuitiva

- El software admite muchos formatos para ser leídos en la entrada de datos, además ofrece una herramienta para construir cualquier tipo de modelo molecular de manera intuitiva.
- Visualización flexible, al lograr adaptarse a las diferentes necesidades del usuario, desde sistemas biomoleculares hasta complejos metálicos.
- Schrödinger permite la visualización de objetos tridimensionales con un realismo muy superior para las interpretaciones de interacciones entre sistemas biomoleculares.
- Presenta herramientas para realizar un análisis estructural cuantitativo, brindando las capacidades de cuantificar características estructurales de una molécula para poder realizar comparaciones entre estructuras.
- Ofrece la capacidad de personalizar tareas y automatizarlas mediante secuencia de comandos, los scripts de Maestro están realizados en lenguaje Python.
- Las propiedades calculadas como los orbitales moleculares, densidad electrónica o modos de vibración se pueden visualizar en Schrödinger, este software tiene una función única llamada SiteMap la cual localiza áreas en una proteína las cuales corresponden a regiones hidrofóbicas o hidrofílicas para identificar donde se encuentra el sitio de unión catalítico que favorecerá el acoplamiento molecular ligando-blanco.
- Genera imágenes de alta resolución para incorporar con facilidad en documento o para publicaciones.

- Posee un soporte multiplataforma al ejecutarse en Linux, Windows y Mac.

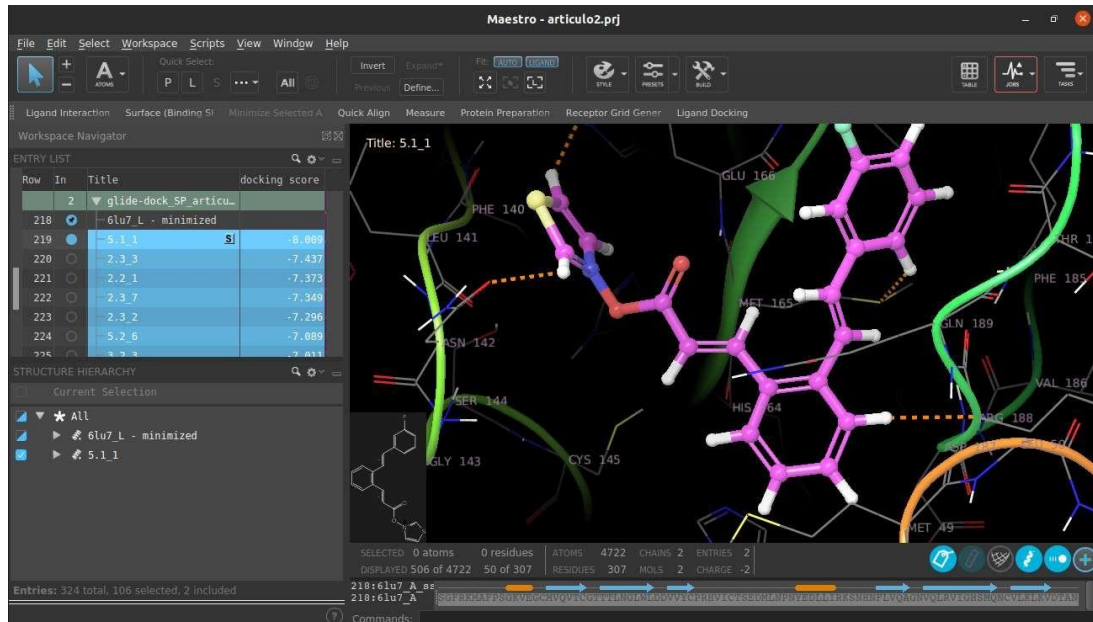


Figura 19. Interfaz gráfica de Maestro Schrödinger.

Para la óptima ejecución de sus funciones Maestro Schrödinger emplea diferentes módulos, entre los principales empleados para el modelamiento de fármacos destacan los siguientes:

a. Glide

La función de Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) es localizar interacciones a favor entre ligandos generalmente pequeños y una molécula receptora más grande, generalmente una proteína (blanco). Cada ligando debe ser una sola molécula, sin embargo, el blanco puede incluir más de una molécula, por ejemplo, una proteína y un cofactor (Friesner et al., 2006).

Glide se puede ejecutar en modos de docking rígido o flexible; este último genera automáticamente conformaciones para cada ligando de entrada. La combinación de una conformación de ligando (para docking rígido, la conformación de entrada; para docking flexible, una conformación generada) con su posición y orientación se denomina pose de ligando.

Las poses del ligando que genera Glide pasan a través de una serie de filtros que evalúan la interacción del ligando con el blanco. Los filtros iniciales prueban el ajuste del ligando al sitio activo y examinan las interacciones ligando-receptor utilizando un método basado en cuadrículas basándose en una función empírica ChemScore. Las poses que pasan estos filtros iniciales ingresan a la etapa final del algoritmo, que implica la evaluación y minimización de una aproximación de cuadrícula a la energía de interacción ligando-receptor no enlazada de OPLS-AA (Glide, version 6.7, Schrödinger, LLC, New York, 2015).

La puntuación final, que utiliza la función de puntuación multiligando GlideScore patentada de Schrödinger, se lleva a cabo en las poses de energía minimizada. Por último, se clasifica las poses del ligando y selecciona qué pose (o poses) para un ligando determinado se informará al usuario. La tarea que Glide realiza con más frecuencia es el docking de ligandos, los primeros pasos de un proyecto que comienza con una estructura de complejo de proteína-ligando no preparada pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) Preparar la proteína usando el Asistente de preparación de proteínas (Protein Preparation Wizard). Se debe verificar las cargas formales y los órdenes de enlace en el ligando, cofactores y residuos no estándar.
- 2) Con el complejo receptor-ligando preparado en el Workspace utilizar el panel de (Receptor Grid Generation Panel) para especificar la configuración, definir opcionalmente las restricciones e iniciar el trabajo de generación de la cuadrícula del receptor.

- 3) Preparar los ligandos usando LigPrep, para asegurarse de que las estructuras sean estructuras tridimensionales minimizadas en cuanto energía y orientación.
- 4) Utilizar las otras configuraciones y opciones en el panel para configurar e iniciar un trabajo del docking de ligandos.

b. Desmond

Desmond es un programa de dinámica molecular de solventes explícitos desarrollado por D. E. Shaw Research. (Bowers et al., 2006; Desmond Molecular Dynamics System, version 4.2, D. E. Shaw Research, New York, 2015). Es compatible con muchas de las características más buscadas en un programa moderno de dinámica molecular, además este incluye:

- Ejecución altamente escalable en CPU y GPU
- Simulaciones explícitas de solventes con condiciones de contorno periódicas empleando cajas de simulación cúbicas, ortorrómbicas y triclinicas.
- El octaedro truncado y el dodecaedro rómbico se apoyan a través de sus análogos triclinicos.
- Soporte para acoplamiento de presión isotrópico, semi-isotrópico y anisotrópico
- Eliminación de fuentes de error numérico, lo que permite cálculos precisos y rápidos.
- Realiza restricciones para eliminar movimientos de alta frecuencia y así permitir pasos de tiempo más largos
- Cálculo eficiente de la presión

La resolución de problemas implica el uso de gran variedad de técnicas de modelamiento molecular, por lo que la integración de Desmond en la principal suite de modelado molecular de Schrödinger para el desarrollo de fármacos.

2.6.4.2 UCSF Chimera

UCSF Chimera ha sido desarrollado por UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI) en la Universidad de California, San Francisco. Es un programa para la visualización interactiva y el análisis de estructuras moleculares pequeñas y grandes (Figura 20). Está disponible de forma gratuita para uso no comercial. Usuarios comerciales, consulte Licencias comerciales de Chimera (“UCSF Chimera Home Page,” n.d.).

Chimera fue diseñado con la extensibilidad como objetivo principal. También posee una amplia variedad de plataformas e incluye una calidad gráfica de vanguardia además de representaciones interactivas de bola y palo (ball-and-stick), relleno de espacio, cinta y superficies sólidas. Chimera es accesible para los usuarios de todos los niveles ya que ofrece una interfaz gráfica de menú / ventana y una interfaz de línea de comandos (Pettersen et al., 2004). Este programa ha sido desarrollado con lenguaje de programación Python, el cual es un lenguaje de programación fácil de aprender y muy legible. Python es interpretado, es bueno para un rápido desarrollo y depuración.

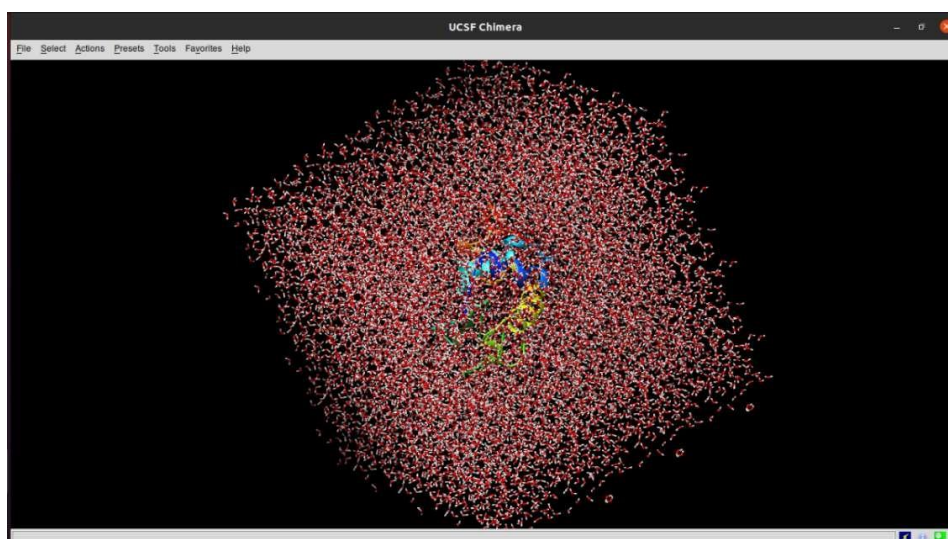


Figura 20. Interfaz gráfica de Chimera.

2.6.4.3 SmiLib v2.0

SmiLib v2.0 es una herramienta que posee una interfaz gráfica de usuario que ha sido diseñada para crear rápidamente bibliotecas combinatorias en formato SMILES. Una biblioteca combinatoria es un conjunto de moléculas creadas por reacciones virtuales de los nombrados bloques de construcción (building blocks) con moléculas de andamio (scaffold).

Los andamios están representados por moléculas que contienen grupos R, sitios de variabilidad. Esos scaffold reaccionarán de manera virtual con building blocks, pequeñas moléculas.

SmiLib v2.0 emplea SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) la cual es una nomenclatura simple que posee una notación de línea para representar moléculas desarrolladas. Los SMILES usan caracteres y números colocados en cadena, una línea de texto, para describir moléculas. El formato SMILES es muy útil de manejar con fines bioinformáticos e intercambio de datos informáticos (Schüller & Haehnke, 2006).

Es muy importante señalar que SmiLib no realiza reacciones químicas reales. No toma en cuenta las características químicas de las reacciones, sino que simplemente concatena moléculas scaffold y building blocks mediante enlaces simples, independiente de que esto se pueda realizar o no en un laboratorio.

Las ventajas de SmiLib son su simplicidad, alta flexibilidad en la construcción de bibliotecas combinatorias y su alta velocidad de construcción de bibliotecas. La biblioteca combinatoria se crea concatenando cadenas de SMILES (Schüller, Hähnke, & Schneider, 2007).

SmiLib v2.0 emplea 3 tipos de entradas de moléculas: andamios (scaffolds), enlazadores (linkers) y bloques de construcción (building blocks), donde los linkers funcionan

como uniones entre los scaffolds y los building blocks, tal como lo esquematiza la Figura 21.

La molécula resultante es producto de la fusión de los 3 tipos de entradas.

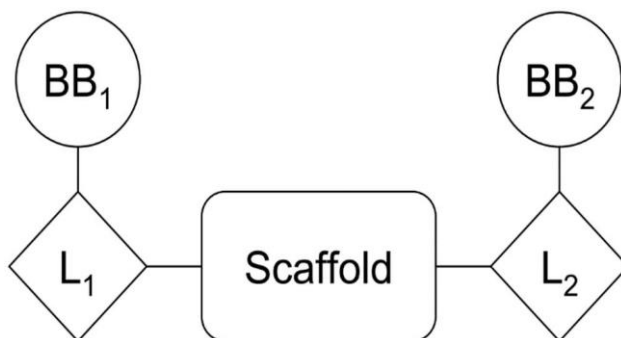


Figura 21. Esquema de un producto de una reacción virtual, BB denota un bloque de construcción (building block) y L denota un enlazador(linker). Fuente: Tomado de (Schüller et al., 2007).

SmiLib enumera bibliotecas combinatorias por medio de scaffolds, linkers (L1 y L2) y bloques de construcción (BB1 y BB2). SmiLib v2.0 además de emplear SMILES normales, ([R1], [R2], [R3], etc.) como etiquetas para los sitios de variabilidad, usa [A] como etiqueta para los sitios donde se va a producir la unión (la Figura 22 muestra un ejemplo representativo). Un sitio de unión es parte de la molécula, que se unirá a un andamio o enlazador (Schüller et al., 2007).

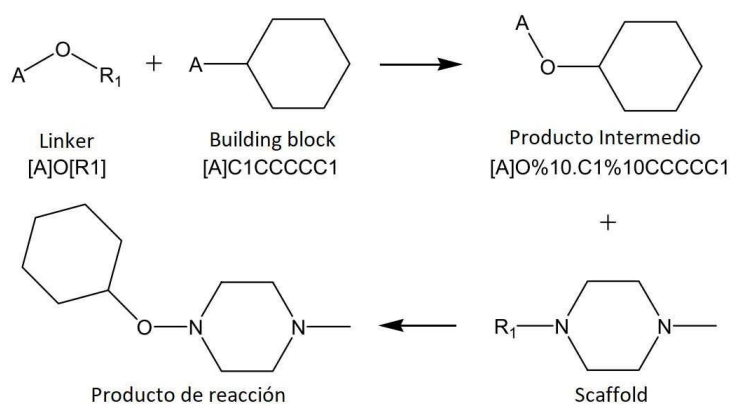


Figura 22. Ejemplo de una reacción virtual junto con sus respectivos SMILES. Fuente: Tomado de (Schüller et al., 2007).

Los building blocks son unidos a los linkers concatenando el sitio de unión [A] del building block con el sitio de variabilidad [R1] del linker. Los linkers se unen con los scaffolds a través de la concatenación del sitio de unión [A] del linker con un sitio de variabilidad ([R1], [R2], etc.) del scaffold.

2.6.4.4 molSimplify

Software elaborado por el laboratorio de Kulik, además de ser miembros del programa Centro de Ciencias e Ingeniería Computacional y Biología de Sistemas Computacionales (CSBi) (hjkgrp.mit.edu | Kulik group at MIT, n.d.); molSimplify es un software de código gratis para el público basado en Python y creada para facilitar el cribado de complejos de metales de transición (TMC). Entre la línea de comando, la GUI y la interacción más avanzada con Python, algunas de las características que incluye molSimplify son las siguientes:

a) Generación / manipulación avanzada de estructuras:

- Cualquier geometría de coordinación + centro de metal mononuclear
- Centros personalizados
- Colocación de estructuras sobre losas
- Más de 150 ligandos incorporados + capacidad para agregar ligandos personalizados
- Funcionalización de ligando
- Optimizaciones del campo de fuerza
- Manipulación + conversión de tipo de archivo de estructuras existentes

b) Predicciones de redes neuronales artificiales a partir de gráficos de conectividad:

- Estructuras dependientes del estado de giro
- Energías desintegradoras

- Energías HOMO / LUMO
- Potenciales redox
- Energías de formación oxo

Este software viene por defecto con aproximadamente 160 ligandos incorporados y un administrador para modificarlos. Además de ellos apoya el suministro de ligandos que uno proporcione como SMILES o en algún formato de moléculas 3D (“molSimplify Tutorial 10: Adding ligands to molSimplify | hjkgrp.mit.edu,” n.d.).

2.6.4.5 Supercomputador MANATÍ

Es un sistema computacional de alto rendimiento empleado para apoyar a la investigación científica en el Perú, las cuales necesiten trabajar con grandes volúmenes de información y de esta forma aminorar el tiempo computacional de cálculo que tardaría si se trabajase con una laptop habitual de escritorio. Esta se encuentra conformada por 10 nodos principales distribuidos en un nodo principal o coordinador y 9 nodos de procesamientos (6 gráficos y 3 numéricos) además de un sistema de almacenamiento (STORAGE).

La configuración de este tipo de equipos se suma al momento de hacer un procesamiento distribuido, que consiste en procesar una tarea en 2 o más nodos o servidores, y el procesamiento paralelo se podría hacer en cada nodo internamente, porque cada nodo dispone de 28 núcleos de CPU tanto como tarjetas gráficas (IIAP, 2021). La Figura 23 muestra de forma general la estructura del supercomputador MANATÍ.

Y el storage (almacenamiento) actualmente tiene la capacidad de 144 TB que es empleado para almacenar los procesos de los datos que se procesan en el momento, posteriormente se eliminan para liberar espacio a medida que se congestiona (IiAP, Y, & C, 2018).

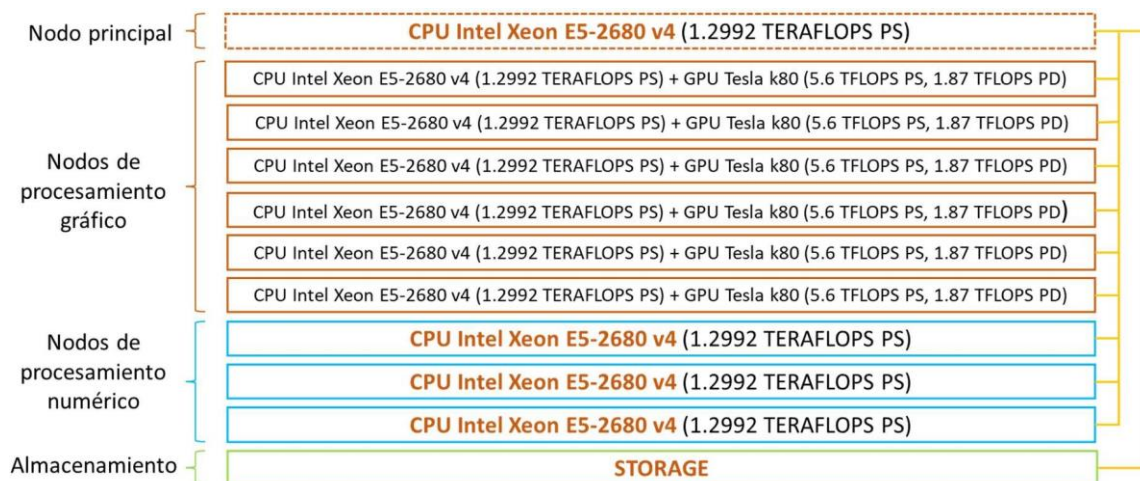


Figura 23. Estructura del MANATÍ. Tomado de (IiAP, 2021).

Para solicitar el acceso al cluster HPC MANATÍ es necesario tener ciertos requisitos mínimos en cuanto a conocimiento básico de Linux, pues este trabaja en un sistema operativo Linux distribución Centos 7. Además de completar un formulario de solicitud completando su información solicitada además los motivos por los cuales necesita trabajar con este cluster HPC. El link del formulario es el siguiente: <https://goo.gl/v83Yiy>

2.6.5 Limitaciones e interferentes en los softwares computacionales

En este punto es muy importante tener presente que los estudios de docking no son estudios definitivos en los cuales se pueda afirmar que una molécula, al obtener un docking score bueno y presentar una energética termodinámica favorable y espontánea, se muestre como una propuesta a fármaco idónea. Por esta razón en muchas ocasiones las revistas de

mediano-alto impacto piden estudios complementarios, por ejemplo, estudios de dinámica molecular, donde se considera la fluctuación temporal donde incluso se podrían ver qué candidatos a fármacos al interactuar con el blanco proteico presentan interacciones que se debilitan con el tiempo, hasta el punto de considerarse que esa molécula va a ser rechazada y la reacción de disociación va a ser mayor a comparación de la asociación. Muchas veces incluso no se conforma con estos estudios, sino que se pretende estudiar si este acoplamiento molecular ha inducido un desplegamiento en la proteína o una desnaturalización estructural, e incluso en ocasiones se induce una compactación estructural de la proteína con respecto a su estado nativo.

Hay que recordar que las proteínas no son objetos estáticos y tienen un comportamiento altamente dinámico y justamente esa dinámica está asociada con la flexibilidad o rigidez estructural muy ligada con su función biológica.

Otro punto a tener presente es la presencia de moléculas de agua en el sitio activo, existen diferentes estudios que afirman que se obtendría una mayor precisión en cuanto al modo de unión de las moléculas, cuando se incorporan moléculas de agua en un rango de 5Å, sin embargo, también es importante considerar que el incorporar moléculas de agua posiblemente ocasionaría que disminuyan las conformaciones del ligando que se va a acoplar y por eso no las incorporan, además de mencionar que su incorporación se realizará post docking en la dinámica molecular lo cual tiene una razonable justificación (Ballón & Grados, 2019). Por esta razón muy pocos grupos de investigación en el mundo realizan un análisis tan minucioso en los estudios de docking molecular.

CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Propuesta metodológica

Se propone construir una biblioteca virtual de estructuras a partir de una lista de fragmentos bioisómeros que se emplearán para modificar la molécula N3 (Figura 24). Así mismo, se pretende encontrar posibles candidatos a fármacos para el SARS-CoV-2 empleando herramientas computacionales y principios de Química Medicinal. Se realizará un virtual screening de toda la biblioteca virtual generada, de esta manera se conseguirán moléculas con mejor interacción en el sitio activo del blanco proteico (proteasa M^{pro}).

Posteriormente se procederán a metalar con galio las mejores estructuras que posean mejor docking score. A estos complejos generados se les realizará un docking molecular, donde a los complejos con mejor grado de acoplamiento les evaluará el cumplimiento de la regla de Lipinski y aquel complejo con mayor grado de probabilidad de inhibición frente a la M^{pro} se le realizará un análisis más a fondo, es decir, se ejecutará una dinámica molecular para ver su comportamiento en el tiempo.

La metodología experimental que se desarrollará en este trabajo de investigación se basará en siete etapas:

- Elaboración de la biblioteca virtual de estructuras.
- Preparación de ligandos en Google Colaboratory, proteína en Chimera 1.15 y AutoDockTools y virtual screening en MANATÍ.
- Preparación previa al virtual screening de la proteína y los ligandos en Schrödinger.
- Virtual screening en Schrödinger.
- Metalado de los mejores ligandos obtenidos del virtual screening.
- Docking molecular de las moléculas metaladas.

En la Figura 25 se presenta el primer fragmento que será sustituido por una familia de bioisósteros utilizando la base de datos SwissBioisostere.

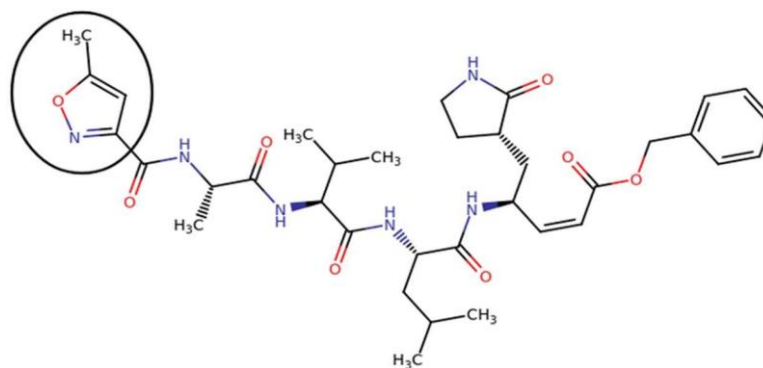


Figura 25. Primer fragmento seleccionado que será reemplazado por la lista de bioisósteros generada en la base de datos SwissBioisostere.

3.1.1.2 Generación de estructuras modificadas del N3 a partir de la lista de bioisósteros obtenida.

Se utilizará el programa SmiLib v2.0, el cual es un software libre e independiente, por lo tanto, no se requiere pagar una licencia por su uso.

SmiLib nos permitirá enumerar nuestra biblioteca virtual mediante la notación SMILES la cual es flexible y manipulable. Este proceso de combinación tardará apenas 1-3 segundos debido a que SmiLib enumera bibliotecas combinatorias a velocidades de aproximadamente 9.00.00 moléculas por minuto en computadoras rápidas.

Este proceso consta de las siguientes etapas:

- I. Graficar el inhibidor N3 empleando un programa para representación su representación gráfica. En este caso se emplearon los programas MarvinSketch y ChemDraw para las representaciones y obtención es del código SMILE.

- II. El programa SmiLib v2.0 cuenta con 3 entradas: Scaffolds, Linkers, y Building Blocks. En la entrada Scaffolds se introducirá el SMILES del N3 sin considerar el fragmento que será reemplazado (esto se consigue empleando el MarvinSketch o el ChemDraw). En la entrada Linkers se seleccionará la casilla “use empty LinKer” para enlazar el N3 con los fragmentos bioisostéricos. Finalmente, en la última entrada Building Blocks, se introducirán todos los SMILES obtenidos de SwissBioisostere.
- III. Se seleccionarán las variables de control: enumerate complete library, show Library, save as File.
- IV. Se seleccionará la opción para guardar el en formato SMILES, y finalmente la opción “enumerate” que hará que comience el proceso de generación de SMILES. Este procedimiento se debe realizar para cada una de las seis restantes modificaciones. Con esto se conseguirá una biblioteca virtual aún más grande que posteriormente servirá para realizar un virtual screening (análisis computacional de nuestra biblioteca virtual, con el objetivo de seleccionar un número limitado de candidatos que posean un buen acoplamiento molecular, y una adecuada actividad biológica sobre el M^{pro}).

3.1.2 Etapa 2: Preparación de ligandos en Google Colaboratory, proteína en Chimera 1.15 y AutoDockTools y virtual screening en MANATÍ

3.1.2.1 Preparación de los ligandos

Se realizará en el entorno de Google Colaboratory por ser una plataforma de acceso gratuito y que en estos últimos años está tomando gran importancia, ya que actualmente se vienen implementando programas complejos a esta plataforma, como lo son la dinámica molecular, programas de visualización de docking molecular, incluso se ha creado una versión del programa AlphaFold2 (Mirdita, Ovchinnikov, & Steinegger, 2021).

Para ello se piensa emplear las máquinas virtuales gratis que proporciona este entorno, los pasos a seguir que se emplearán serán los siguientes:

- Se activará el empleo de GPU por parte de este entorno
- Se instalarán librerías como pandas para la visualización y Open Babel para el cambio de coordenadas de las moléculas creadas en mi biblioteca virtual
- Las moléculas se subirán a esta plataforma en formato .smi y se convertirán a formato .sdf en coordenadas 3D y cualquier WARNING será eliminado
- Posteriormente se convertirán a formato .mol2 y protonadas
- Serán optimizada empleando el campo de fuerza MMFF94 con 20000 pasos y se convertirán a formato .xyz empleando un pH=7.4
- Estas moléculas en formato .xyz optimizadas serán separadas y convertidas en formato .pdbqt, listas para MANATÍ.

3.1.2.2 Preparación de proteína

Como blanco se utilizará la proteasa M^{pro}, esta será descargada del PDB (protein data bank: <https://www.rcsb.org/>). Esta estructura presenta el código PDB ID 6W63, una resolución de 2.10 Å, Rfree de 0.221, Clashscore igual a 4, Ramachandran outliers de 0.3%, Sidechain outliers de 3.8 % y RSRZ outliers de 0.3 % (Mesecar, 2020). Esta información se aprecia en la Figura 26.

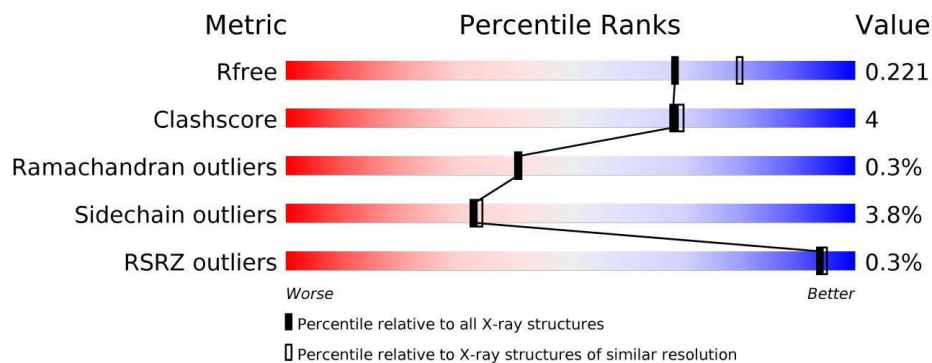


Figura 26. Parámetros de validación de la proteína cristalizada. Fuente: Tomado de (Mesecar, 2020).

La Figura 26 presenta un rango de color que va del rojo al azul. Conforme estos parámetros se encuentren en el lado azul podemos identificar que se trata de un cristal bueno, en caso contrario, si se encuentra más orientado al lado rojo se afirmará que es un cristal no tan bueno.

Esta proteína cristalizada (6W63) se ha seleccionado ya que no presenta ningún inhibidor unido mediante un enlace covalente, situación que dificultaría el trabajo. Además, por los parámetros antes mencionados y su resolución de 2.10 Å que se considera buena. La preparación de la proteína se realizará empleando los programas UCSF Chimera 1.15 y AutoDockTools. Como primer paso, las moléculas de agua serán removidas del blanco, así como los ligandos presentes usando UCSF Chimera 1.15, posteriormente se guardará en formato .PDB que será exportado a AutoDockTools, donde se adicionarán los hidrógenos polares que nos permitirán determinar cargas, se retirarán los hidrógenos no polares y adicionarán las cargas de tipo Kollman según el protocolo seguido en (El-hachem, Haibekains, Khalil, Kobeissy, & Nemer, 2017)

3.1.3 Etapa 3: Preparación previa al virtual screening de la proteína y los ligandos en Schrödinger

3.1.3.1 Preparación de la proteína

Con el programa Schrödinger 2020-3 se importará la proteína (ID 6W63 .PDB) donde se empleará el módulo de Schrödinger llamado “Protein Preparation Wizard”. Para acceder a este módulo se seleccionarán los siguientes comandos seguidos uno a continuación del otro: Task→Browse →Protein Preparation and Refinement→ Protein Preparation Wizard. Posteriormente se procederá a realizar el preprocesado de la estructura del espacio de trabajo asignando las condiciones apropiadas al blanco, las mismas que se aprecian en la Tabla 5:

Tabla 5

Condiciones a emplearse en el preprocesamiento

Condiciones para el preprocesado del blanco
Asignar ordenes de enlace
Usar base de datos CCD
Adicionar hidrógenos
Crear orden de enlace a el metal cero
Convertir selenometioninas a metioninas
Completar las cadenas laterales faltantes con Prime
Completar los bucles que faltan con Prime
Generar diferentes estados para los heteroátomos a pH 4.7

Seguidamente procederá a correr el programa mediante la opción Preprocess. Una vez el procesado haya terminado, en el job monitor, aparecerá que el proceso terminó

satisfactoriamente y se procederá a refinar, asignándole otras condiciones al blanco (proteína), como el campo de fuerza y uso de PROPKA (vere Tabla 6):

Tabla 6

Condiciones a emplearse en el refinamiento

Condiciones para la refinación del blanco

Use PROPKA ajustado a pH 7.4

Seleccionar el campo de fuerza OPLS3e

Finalmente se seleccionará “Optimizar” y “Minimizar respectivamente”, de esta manera el blanco estará completamente preparado conteniendo todos los átomos de hidrógenos asignados apropiadamente, sin ninguna cadena perdida y sin bucles faltantes (missing loops).

Adicionalmente también se trabajará con la proteína ID 6LU7 .PDB (que es la proteína de donde se encuentra el inhibidor N3 unido covalentemente a M^{pro}), esto se hace porque existe la posibilidad de que después del virtual screening en MANATÍ, haya moléculas que presenten un comportamiento semejante a N3 y se enlacen covalente a M^{pro} en su sitio activo, es por eso la necesidad de pensar en un docking no solo de carácter no covalente, sino que también covalente.

En este último caso se escindirá el enlace covalente entre N3-M^{pro} según el procedimiento general de un docking covalente mostrado en (Zhu et al., 2014), para posteriormente realizar el docking, además se emplearán las condiciones ya reportadas en trabajos actuales, como las coordenadas de la malla de acoplamiento (GRID), (X, Y, Z) = (-10.4, 12.23, 68.7), adicionalmente se considerará un mecanismo de adición de Michael (Teli, Shah, & Chhabria, 2021).

3.1.3.2 Preparación de los ligandos

Para la preparación de los ligandos se empleará el software Schrödinger 2020-3. Se empleará el módulo de Maestro llamado “LigPrep”. El principal objetivo de LigPrep es tomar estructuras 2D o 3D y producir las correspondientes estructuras 3D de baja energía para su uso en estudios computacionales posteriores. Los archivos de entrada y salida para trabajarse pueden estar en formato SD o Maestro. Para acceder a este módulo, se seleccionarán los siguientes comandos seguidos uno a continuación del otro: Task→Browse →Ligand Preparation and Library Desing→ LigPrep.

Posteriormente, se procederá a seleccionar todos ligandos desde el Workspace Navigator hacia el Workspace empleando el comando “Use structures from: Workspace (included entries)”. Una vez realizado este paso se les dará a los ligandos todas las condiciones apropiadas, de la Tabla 7:

Tabla 7

Condiciones a emplearse en el módulo

Condiciones para el módulo LigPrep
Seleccionar el campo de fuerza OPLS3e
Generar posibles estados en el blanco a pH: 7.4 utilizando Epick
Desalar
No generar tautómeros
Formato de salida “Maestro”

Seguidamente se procederá a correr el programa mediante la opción Run. Esto hará que todas las moléculas se encuentren en una adecuada energía para posterior paso que sería el virtual screening.

3.1.4 Etapa 4: Virtual screening en Schrödinger

3.1.4.1 Creación del grid (malla) para el posterior docking

Una vez terminado de preparar los ligandos y el blanco proteico se procederá a ejecutar el virtual screening. Se utilizará el módulo Glide, el cual en primer lugar nos permitirá construir el grid (malla donde se van a posicionar las partículas/átomos). Para acceder a este módulo se seleccionarán los siguientes comandos seguidos uno a continuación del otro: Task→Browse →Glide→ Receptor Grid Generation. Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) busca interacciones favorables entre una o más moléculas de ligando típicamente pequeñas y una molécula receptora típicamente más grande, un blanco proteína. La forma y las propiedades del receptor se representan en una cuadrícula por varios conjuntos diferentes de campos que proporcionan una puntuación de las poses del ligando. Mediante el empleo de las opciones que te permite usar Glide se logra determinar la posición y el tamaño del sitio activo tal como estará representado por cuadrículas de receptores y configurar restricciones de Glide. Se seleccionará en ajustes avanzados el campo de fuerza OPLS3e, además de deseleccionar la opción "Pick to identify the ligand", esto se hace porque no seleccionaremos un ligando que se encuentre en el Workspace junto al blanco para ayudarnos a ubicar la posición del sitio de unión catalítico, porque nuestro blanco está completamente limpio (sin ninguna molécula de agua, sin ningún cofactor, grupos prostéticos o ligandos). Posteriormente Glide nos ofrece la opción de insertar las coordenadas para crear la caja cerrada donde los ligandos dockeados se encontrarán confinados, sin embargo, este no es el caso. Se insertarán los

residuos cercanos a el sitio de unión catalítico, utilizando la opción “centroide de residuos seleccionados” donde se especificarán los residuos(aminoácidos) siguientes: His41, Cys145, Gln189, Thr26, Asn142, Leu27, Met165, Arg188 y Glu166. Después de haber insertado los aminoácidos anteriores, se definirá la longitud del cubo interno y externo que maneja Schrödinger 2020-3, siendo estas de 10 Å y 30 Å respectivamente. Finalmente se seleccionará la opción “run” que hará que se logre conseguir el grid. Esto hará que se genere un archivo .zip.

3.1.4.2 Ejecución del virtual screening

En esta etapa se realizará el docking molecular, empleando el módulo Glide, al cual se accederá utilizando las siguientes direcciones: Task→Browse →Glide→ Ligand Docking. En donde se importará el archivo generado en la etapa anterior en formato .zip

Seguidamente, se seleccionará la opción de SP (standard precision). En opciones avanzadas se seleccionará el campo de fuerza OPLSe3, además de ello se utilizará 1 pose por ligando. Finalmente se seleccionará la opción “run” para ejecutar el virtual screening y se conseguirá obtener la lista compleja de ligandos ordenados en función a su docking score.

3.1.5 Etapa 5: Metalado de los mejores ligandos obtenidos del virtual screening

En esta parte se procederá a metalar con galio los cinco ligandos con mejor docking score obtenidos en la etapa anterior. Para este propósito se empleará el programa molSimplify el cual nos proporciona alrededor de 160 ligandos que se encuentran incorporados en el programa. Sin embargo, también se da la opción de que nosotros suministremos nuestros propios ligandos como SMILES, y esta opción es la que se empleará para nuestro propósito. Estos SMILES metalados se obtendrán en la terminal del sistema operativo Ubuntu. Para este

propósito, se digitarán una serie de líneas de comandos en dicha terminal. Una vez obtenidos estos complejos metalados con galio ya se podrán visualizar las estructuras en un visualizador de gráficos 3D, en este caso se empleará el software IQmol, desde donde se guardarán las estructuras en formato .mol2, posteriormente se les aplicará la regla de Lipinski muy empleada en Química Medicinal. Finalmente se utilizará el programa Open Babel, que permitirá transformar esos archivos en formato .mol2 a .sdf que serán leídos en el programa Schrödinger 2020-3 .

3.1.6 Etapa 6: Docking molecular de las moléculas metaladas

En esta etapa se realizará un último docking molecular esta vez para las moléculas metaladas con Ga. Antes de realizar el docking molecular, se evaluará el cumplimiento de la regla de Lipinski para los ligandos metalados y posteriormente se deberá importar los archivos antes mencionados al programa Schrödinger 2020-3 donde realizará el docking molecular con todas las consideraciones mencionadas anteriormente (preparación de ligandos y blanco proteico). Esto permitirá que se realice un análisis de los mejores complejos de galio que se acoplen al blanco proteico.

3.1.7 Etapa 7: Dinámica Molecular

Se efectuará la dinámica molecular de aquella molécula que tenga mejor afinidad de inhibición respecto a la proteasa M^{Pro}, empleando el módulo Desmond de Schrödinger. La Figura 27 y 28 muestran un resumen de forma general de la metodología a emplearse.

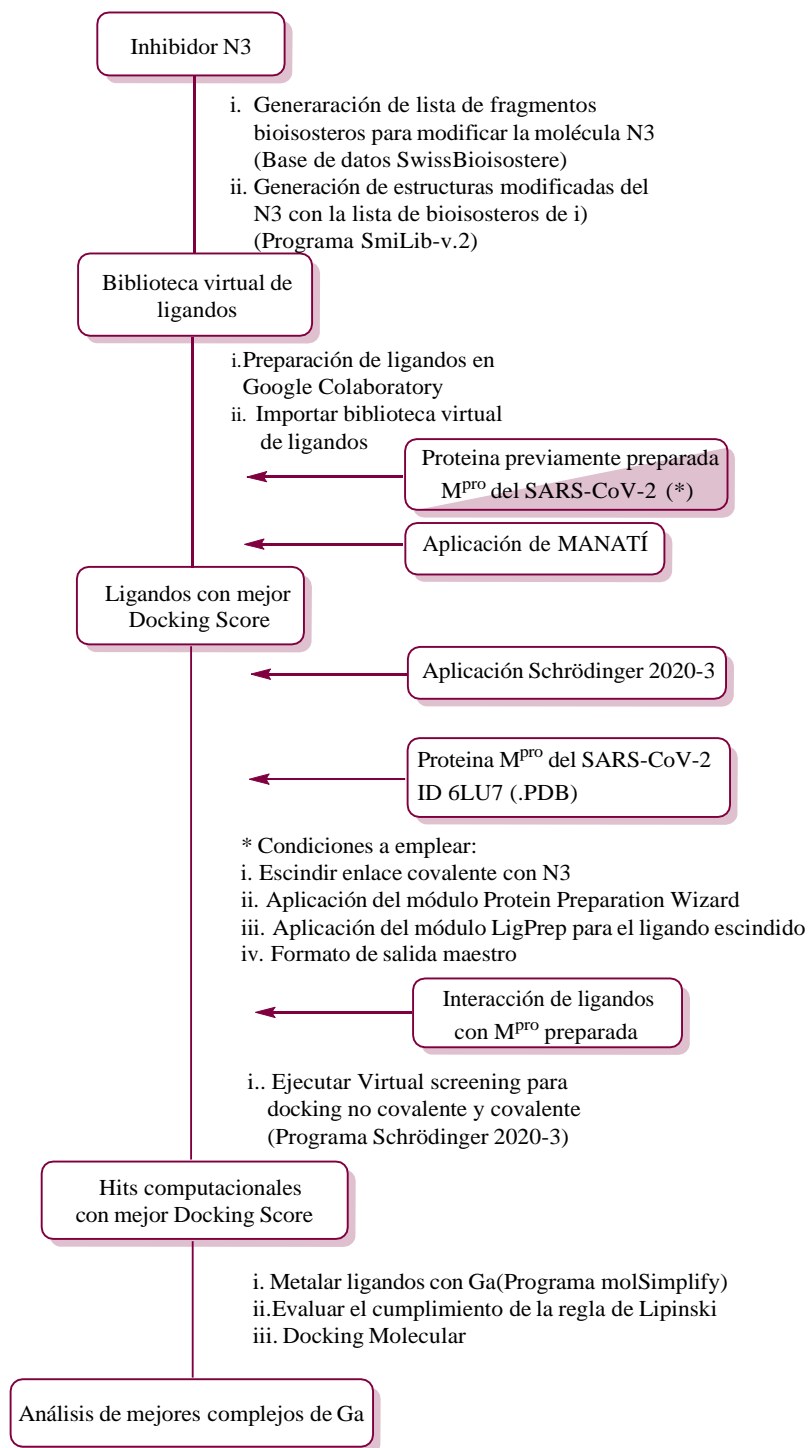


Figura 27. Diagrama de metodología.

(*) Revisar procedimiento para la preparación del blanco M^{PRO}

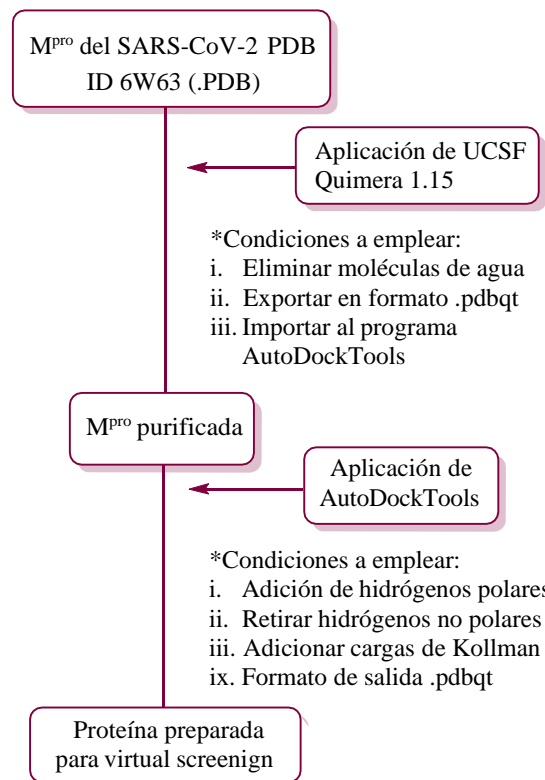


Figura 28. Preparación de la proteína M^{pro} para la ejecución del virtual screening.

3.2 Riesgos del proyecto de investigación y plan de acción para mitigar sus efectos

El enfoque de este trabajo de investigación es realizado *in silico*, por lo tanto, se resaltan las propiedades que ofrece como lo son el ahorro de tiempo y dinero durante las fases preclínicas y clínicas.

Sin embargo, el manipular gran cantidad de moléculas de una biblioteca virtual en ocasiones resulta dificultoso, más por la necesidad de tener herramientas computacionales actualizadas, como el caso de una computadora muy potente. Por ello se requerirá necesariamente trabajar en el sistema operativo Linux, esto se requiere porque la velocidad de ejecución de los programas empleados es más rápida a comparación de trabajar en Windows. Debido a ello se requerirá realizar una partición del disco de la computadora a

trabajar. Adicionalmente cabe mencionar que también es factible emplear softwares que simulan el sistema operativo Linux, como por ejemplo el VirtualBox.

Para el filtrado de los compuestos generados virtualmente en caso no se cuente con una computadora eficiente, se podrá emplear Colaboratory, también llamado “Colab”, el cual te permite el acceso a máquinas virtuales gratis, con una alta potencia para la ejecución en el empleo de bases de datos, utilizado para fines científicos o de investigación.

3.3 Materiales y procedimiento experimental

3.31 Equipo

3.2.1.1 Archivos en diferentes formatos

- Archivo de la proteína (ID 6W63) en formato .PDB
- Fragmentos bioisómeros en formato SMILES y .SDF

3.2.1.2 Hardware y Softwares

- Computadora con dual boot en el sistema operativo Windows 10 y Linux.
- Editor de textos y de código fuente Notepad++: <https://notepad-plus-plus.org/>
- USCF Chimera: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
- IQmol: <http://iqmol.org/>
- Avogadro: <https://avogadro.cc/>
- Marvin JS: <https://marvinjs-demo.chemaxon.com/latest/demo.html>
- ChemDraw: <https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw/>
- Schrödinger: <https://www.schrodinger.com/>

- molSimplify: <http://hjkgrp.mit.edu/>
- Smliv v2.0: <http://melolab.org/smlib/>

3.3.2 Etapa 1: Elaboración de la biblioteca virtual de estructuras

Se partió del inhibidor N3, al cual se le tomaron 7 zonas de la molécula para las respectivas modificaciones estructurales, en las Figuras 29-35 se presentan los puntos representativos, donde se ha encerrado con un círculo dichos fragmentos que se intercambiaron por grupos bioisostéricos.

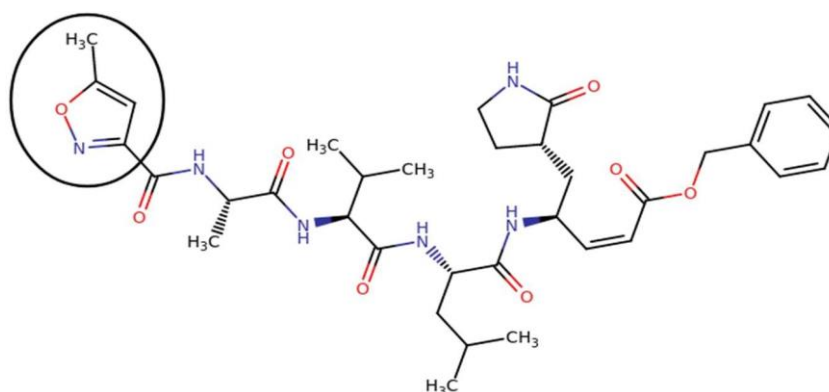


Figura 29. Primer fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.

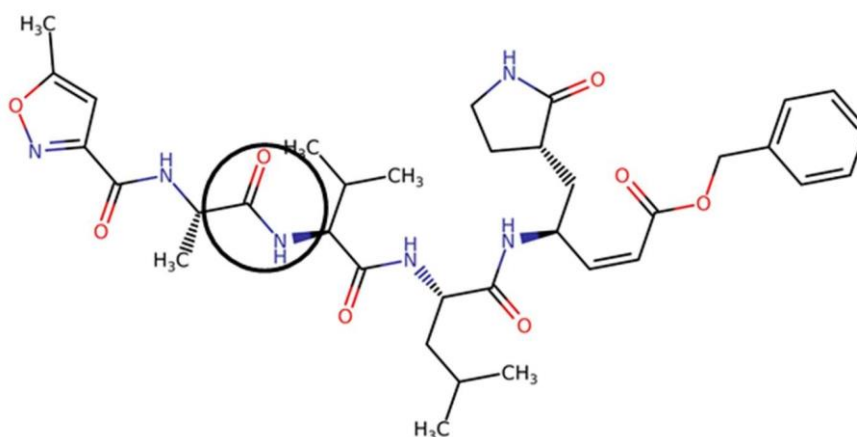


Figura 30. Segundo fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.

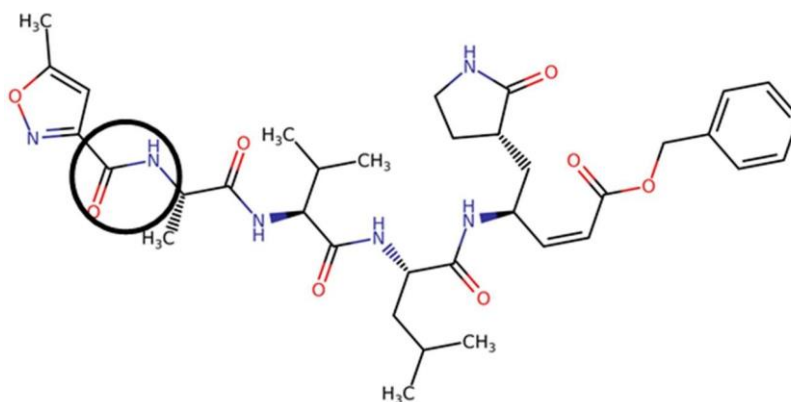


Figura 31. Tercer fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.

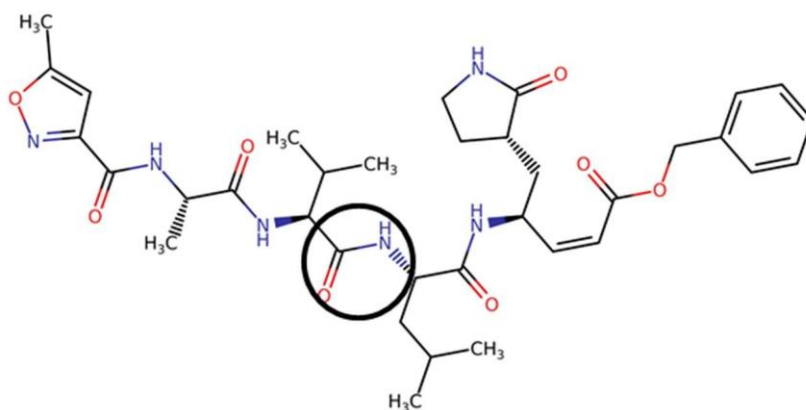


Figura 32. Cuarto fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.

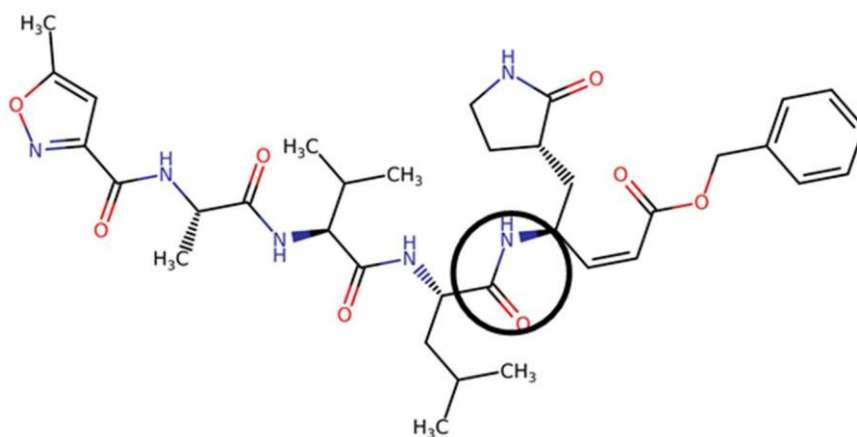


Figura 33. Quinto fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.

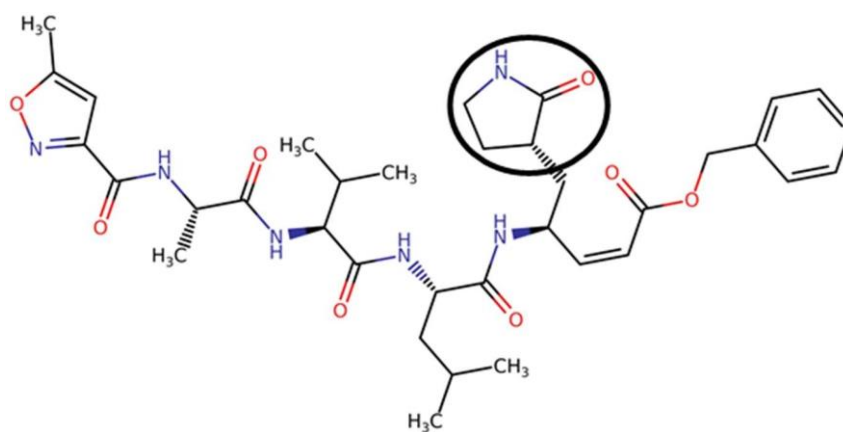


Figura 34. Sexto fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.

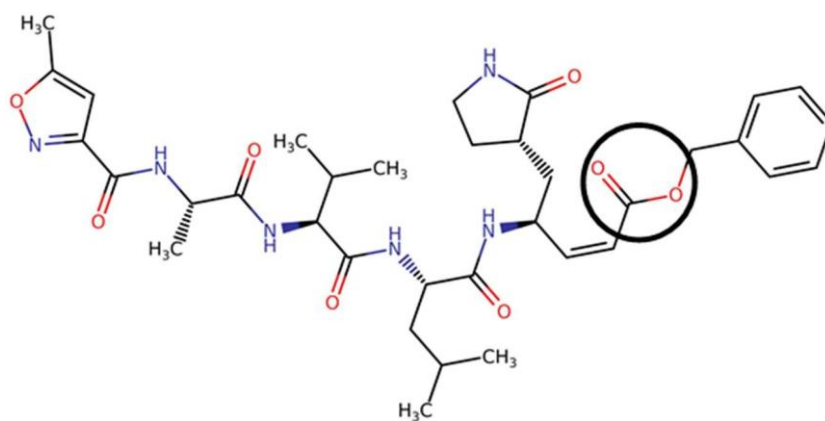


Figura 35. Séptimo fragmento a intercambiar por grupos bioisostéricos.

Se mostrará el procedimiento que se desarrolló para la primera modificación, para los restantes, se procedió de manera análoga.

Se comenzó modificando el 5-metiloxazol de la parte izquierda de la estructura (primera modificación).

Al dibujar este fragmento en la base de datos SwissBioisostere, se obtuvieron 427 entradas, como lo muestra la Figura 36.

Replacement	Activity	Frequency	Score	# Better	# Equal	# Worse	Δ logP	Δ tPSA	Δ MW	R group distance
		53	0.81	25	19	9	0.79	-26.03	-4.98	8.32
		48	0.74	10	29	9	0.05	-13.14	-3.99	6.29
		40	0.79	9	24	7	-0.4	-13.14	-3.99	7.69
		38	0.68	5	22	11	-0.15	-13.14	-3.99	10.92

Figura 36. Lista de fragmentos obtenida con el programa SwissBioisostere (427 entradas).

Los siguientes pasos fueron realizados:

- 1) Click derecho → Ver código fuente de página (Figura 37, muestra el código fuente).

```

1 <!DOCTYPE html>
2 <head>
3 <meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=ISO-8859-1"/>
4 <meta http-equiv="CACHE-CONTROL" CONTENT="NO-CACHE"/>
5 <meta name="author" content="Matthias Wirth">
6 <title>SwissBioisostere - A database of molecular replacements</title>
7
8 <link rel="stylesheet" href="css/fragStyle.css" type="text/css" />
9 <link rel="stylesheet" href="css/sib.css" type="text/css" />
10 <link rel="stylesheet" href="css/ExportFunc.css" type="text/css" />
11 <link rel="stylesheet" href="css/footer.css" type="text/css" />
12 <link rel="stylesheet" href="css/loadingData.css" type="text/css" />
13
14 <style type="text/css" title="currentStyle">
15 @import "DataTables-1.9.0/extras/TableTools/media/css/TableTools.css";
16 </style>
17 <style type="text/css" title="currentStyle">
18 @import "DataTables-1.9.0/media/css/mod_page.css";
19 @import "DataTables-1.9.0/media/css/mod_table.css";
20 </style>
21
22 <!-- [if lte IE 8]><script language="javascript" type="text/javascript" src="flot/excanvas.min.js"></script><![endif]-->
23 <!-- <script type="text/javascript" src="DataTables-1.9.0/media/js/jquery.js"></script> -->
24
25 <script src="//ajax.googleapis.com/ajax/libs/jquery/1.10.2/jquery.min.js"></script>
26 <script>window.jQuery || document.write('<script src="js/libs/jquery-1.10.2.min.js"></script>')</script>
27
28 <script type="text/javascript" src="flot/jquery.flot.js"></script>
29 <script type="text/javascript" src="flot/jquery.flot.selection.js"></script>
30 <script type="text/javascript" src="DataTables-1.9.0/media/js/jquery.dataTables.js"></script>
31 <script type="text/javascript" src="DataTables-1.9.0/media/js/dataTables.fnGetFilteredData.js"></script>
32 <script type="text/javascript" src="js/email_details.js"></script>
33 <script type="text/javascript" src="js/spin_min.js"></script>
34 <script type="text/javascript" src="marvinds/js/webservices.js"></script>
35

```

Figura 37. Código fuente de la página de la lista de fragmentos.

- 2) Se copió el contenido de toda la página (Ctrl + A) en un editor de texto, al cual se le llamó: ejemplo1.txt.
- 3) Abrir el terminal y ubicar la carpeta donde está ejemplo1.txt.
- 4) Digitar en el terminal: `grep "javascript:lookupRepl" ejemplo1.txt`. Esto es para buscar los SMILES (debido a que los SMILES están cercanos a esa palabra clave).

```
(base) mysteryo@Kevin-Lenovo-Uni-Chemistry:~/Escritorio$ vi ejemplo.txt
(base) mysteryo@Kevin-Lenovo-Uni-Chemistry:~/Escritorio$ vi ejemplo.txt
(base) mysteryo@Kevin-Lenovo-Uni-Chemistry:~/Escritorio$ grep "javascript:lookupRepl" ejemplo.txt
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cccc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cccc[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1c[n]ccc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cc[n]cc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1[n]cc[s]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1[n]c([*:1])c[s]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Fc1cccc1[*:1]');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1c[n]cc[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>C[*:1]');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1cc([*:1])o[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cccc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1cccc([*:1])cc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1ccc[s]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cc[n]c[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cccc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Fc1cc([*:1])ccc1F');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>CC([*:1])c1cccc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>CC[*:1]');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>C0CC[*:1]');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Fc1ccc([*:1])cc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>C0C[*:1]');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1ccc01');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1cccc1[*:1]');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1c[s]cc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1c([*:1])o[n]c1c');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cco[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1CC1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1cc([*:1])[n](C)[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1[n]c([*:1])o[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1cccc([*:1])[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1[s]c[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>[*:1]c1cccc1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1c[s]c([*:1])[n]1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1c[n]c([*:1])o1');">
<a href="javascript:lookupRepl(cc1cc([*:1])[n]o1>Cc1ccc[n]c1[*:1]');">
```

Figura 38. Visualización del archivo ejemplo1.txt donde se resaltan las zonas que no son necesarias y se eliminarán.

La Figura 38 muestra las zonas que se eliminarán, para la obtención solo de la notación SMILES de las moléculas de interés.

De esta manera se obtuvo los SMILES. Sin embargo, todavía se tenía contenido que no era de nuestro interés, el cual se observa en los rectángulos de color amarillo, por esta razón procederemos a eliminarlo. Primero se eliminó el contenido del rectángulo de la parte izquierda y de manera análoga se hizo para eliminar las terminaciones ');"> del lado derecho (en la imagen se han encerrado con un rectángulo amarillo algunas representativas, sin embargo, se deben eliminar todas).

- 5) Todo ese contenido actualizado que aparece en el terminal se copió en un nuevo archivo .txt llamado ejemplo1editado.txt.
- 6) Se abrió el archivo: ejemplo1editado.txt con el editor de texto Notepad++, y se digitó Ctrl + F (para buscar, y poder eliminar la parte que se necesitaba, Figura 39).

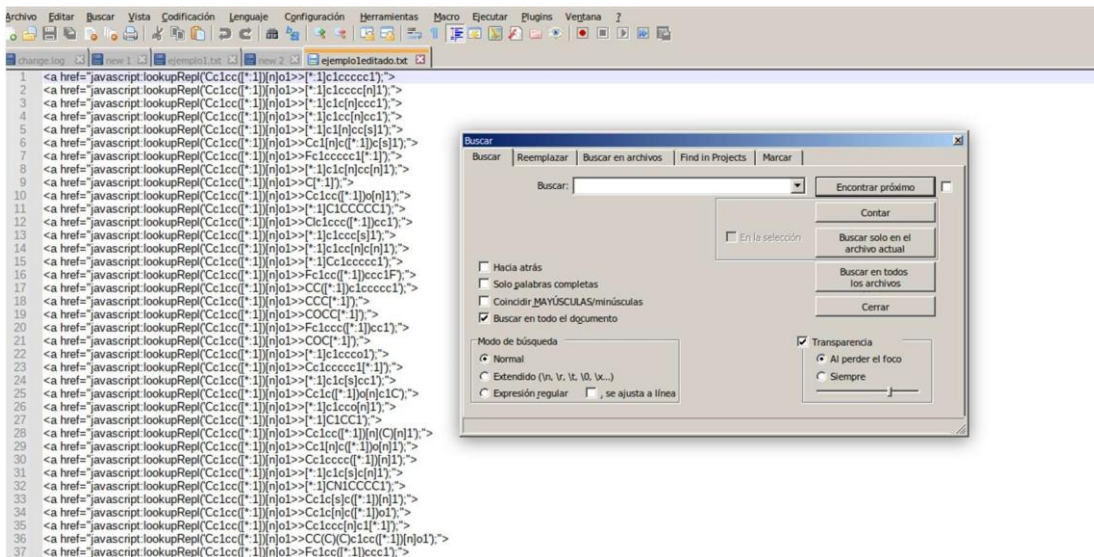


Figura 39. Archivo ejemplo1editado.txt y búsqueda de las partes a eliminar.

Seleccionar la opción: Reemplazar y digitar:

Buscar: >

Reemplazar: (lo dejaremos como espacio vacío, es decir para eliminar la línea anterior)

Luego seleccionar la opción: Reemplazar todo. Para eliminar el contenido innecesario mencionado anteriormente (las terminaciones ');>' encerradas en rectángulos amarillo del lado derecho) se procederá de manera análoga:

Buscar: ');>

Reemplazar: (vacío)

También

Buscar: *:1

Reemplazar: A

De esta manera obtendremos todos nuestros SMILES

- 7) Se empleó el programa SmiLib v2.0 para realizar la combinatoria entre los fragmentos obtenidos de la base de datos y el inhibidor N3 (para la inserción de cada fragmento en lugar del 5-metilisoxazol, como lo muestra la Figura 40).

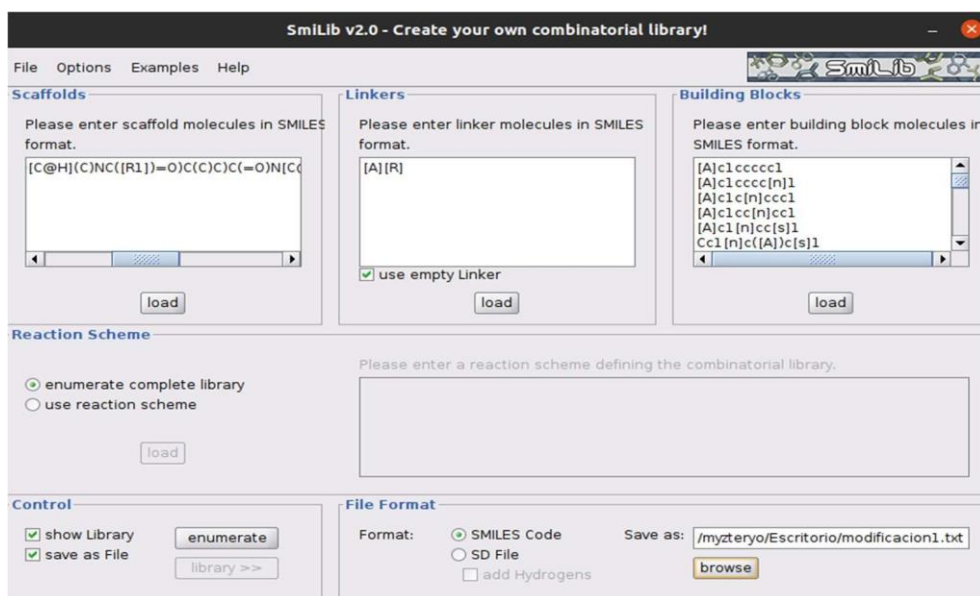


Figura 40. Inserción de SMILES en el programa SmiLib v2.0 para realizar las modificaciones del fragmento 5-metilisoxazol.

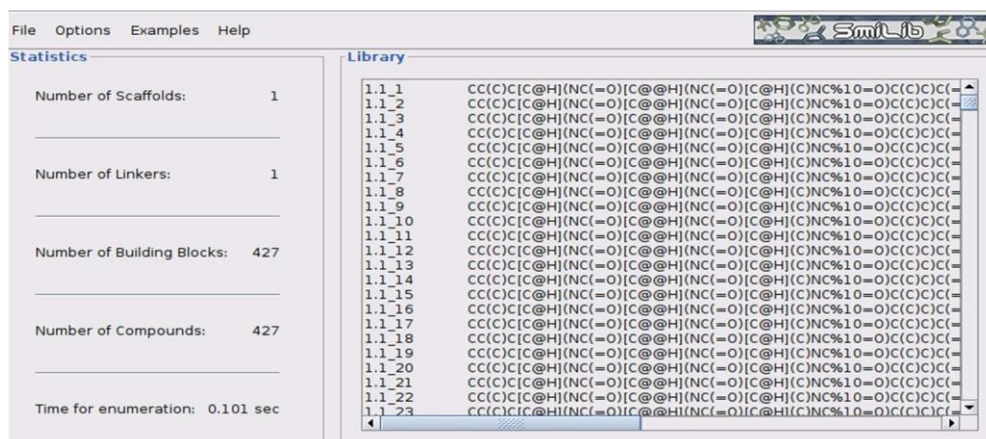


Figura 41. Listado de las 427 moléculas en representación SMILES, obtenidas de la primera modificación del N3.

Estas 427 entradas listadas en la Figura 41 se guardaron en formato .txt y .sdf. Para posteriormente hacer un virtual screening. Además de ello también se guardaron como formato .smi (para esto solo basta con modificar la terminación .txt → por .smi) antes de realizar el virtual screening en MANATÍ). En este caso todas las moléculas se encuentran en una disposición 2D y el siguiente paso consistió en transformarlas a coordenadas 3D.

3.3.3 Etapa 2: Preparación de ligandos en Google Colaboratory, proteína en Chimera y virtual screening en MANATÍ

a. Preparación de ligandos en Google Colaboratory

- 1) Para la modificación de las moléculas obtenidas (biblioteca virtual) se empleó el entorno de Google Colaboratory (ubicado en el drive personal, Figura 42), el cual te proporciona el empleo de GPU gratuito. De las 7 modificaciones que se han de realizar, se explicará el procedimiento trabajado con la primera modificación (que representa la primera parte de mi biblioteca virtual y contiene 427 moléculas), Esta primera modificación es un archivo con el nombre: kevin1.smi.

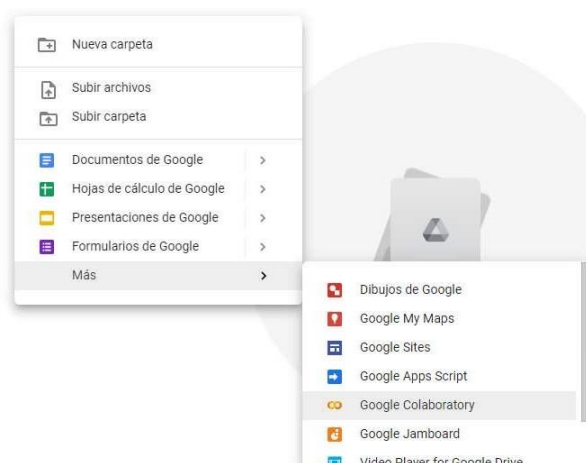


Figura 42. Ejecución de Google Colaboratory desde un drive personal.

Para abrir un archivo de Google Colaboratory basta con ir a un drive personal y realizar: click derecho → Más → Google Colaboratory.

- 2) Se sincronizó Google Colaboratory con el drive personal para poder importar el archivo kevin1.smi.
- 3) Lo siguiente que se realizó fue seleccionar la opción trabajar con GPU, esto con la finalidad de trabajar con una GPU gratuita de Google Colaboratory, las características de la GPU utilizada se presentan en la Figura 43.

```

Found GPU at: /device:GPU:0
Mon Oct 18 06:53:27 2021
-----+-----
| NVIDIA-SMI 470.74      Driver Version: 460.32.03   CUDA Version: 11.2     |
|-----+-----|
| GPU   Name           Persistence-M| Bus-Id        Disp.A | Volatile Uncorr. ECC |
| Fan  Temp  Perf    Pwr:Usage/Cap|      Memory-Usage | GPU-Util  Compute M. |
|-----+-----|
|    0  Tesla K80      Off          | 00000000:00:04.0 Off  |    0          0      |
| N/A   38C    P0      59W / 149W | 121MiB / 11441MiB |    0%      Default  |
|-----+-----|
|
| Processes:
| GPU   GI    CI          PID    Type   Process name          GPU Memory
|   ID   ID   ID              |              |           |         Usage
|-----+-----|

```

Figura 43. Características de la GPU brindada por Google Colaboratory.

Además de ello se digitó la siguiente línea de comando para instalar el programa Open Babel (como se mencionó anteriormente Google Colaboratory permite la instalación de diferentes programas) el cual nos servirá para cambiar las coordenadas de 2D a 3D de toda mi biblioteca virtual: `!apt-get -qq install -y openbabel`.

Para la generación de coordenadas 3D y generación del archivo kevin1_sdf.sdf se digitó `!obabel -i smi kevin1.smi -o sdf --gen3D > kevin1_sdf.sdf`, donde se obtuvieron 427 moléculas convertidas, sin embargo, estas no están separadas, pues solo se obtiene un nuevo archivo con nombre: kevin1_sdf.sdf. Y de este se conseguirán 427 archivos en otro formato .mol2.

- 4) Al obtener estas 427 moléculas convertidas, hay que tener presente que algunas veces se obtendrán WARNINGS, los cuales indicarán que en algunas ocasiones ciertos enlaces no han adquirido la orientación adecuada, sin embargo, hay que tener presente que estos son advertencias y en ningún momento son indicio de que el procedimiento esté incorrecto. Se eliminaron todos los WARNINGS en el archivo kevin1_sdf.sdf.
- 5) El siguiente comando se empleó para la protonación de todas las moléculas y para la separación en 427 archivos en formato .mol2: `!obabel -i sdf edit.sdf -o mol2-O prueba_mol.mol2 -h -m`
- 6) El siguiente paso consistió en realizar una optimización a todas las 427 moléculas, esto se realizó para que tengan una correcta orientación en el espacio: `!obabel *.mol2 -O opt.xyz --minimize --sd --steps 20000 --ff MMFF94 -p 7.4 --log -m`
- 7) Finalmente se convirtieron todas las 247 moléculas en formato .xyz a formato .pdbqt (comando: `!obabel -i xyz *.xyz -o pdbqt -O lig_.pdbqt -m`) las cuales estarán listas para correr el virtual screening en el MANATÍ.

En la Figura 44 se presenta una visualización de algunas moléculas en formato .pdbqt obtenidas finalmente. Este procedimiento se deberá realizar para las 6 modificaciones restantes.

 lig_optprueba_mol427.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol426.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol425.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol424.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol423.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol422.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol421.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol420.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB
 lig_optprueba_mol419.pdbqt 	yo	15 ago 2021 yo	5 kB

Figura 44. Listado de las 427 moléculas en formato .pdbqt y en coordenadas 3D listar para el virtual screening.

b. Preparación proteína en Chimera y AutoDockTools

En este caso se eliminó los residuos de aguas presentes en la estructura proteica 6W63, la cual es la proteasa principal M^{pro} unida a un potente inhibidor no covalente X77. Para este caso también se eliminó este ligando El proceso seguido de acuerdo a los procedimientos realizados en (Pettersen et al., 2004). De donde se exportó esta proteína en formato .pdb hacia AutoDockTools, donde se adicionaron hidrógenos polares, retiraron los hidrógenos no polares además de adicionar las cargas de Kollman (cargas que están predefinidas en una base de datos por aminoácidos dependiendo del estado de protonación del aminoácido). De este programa se exportó la proteína preparada en formato .pdbqt para emplearse en MANATÍ. Las Figuras 45 y 46 presentan a la proteína antes y después de ser preparada correctamente para el virtual screening en MANATÍ.

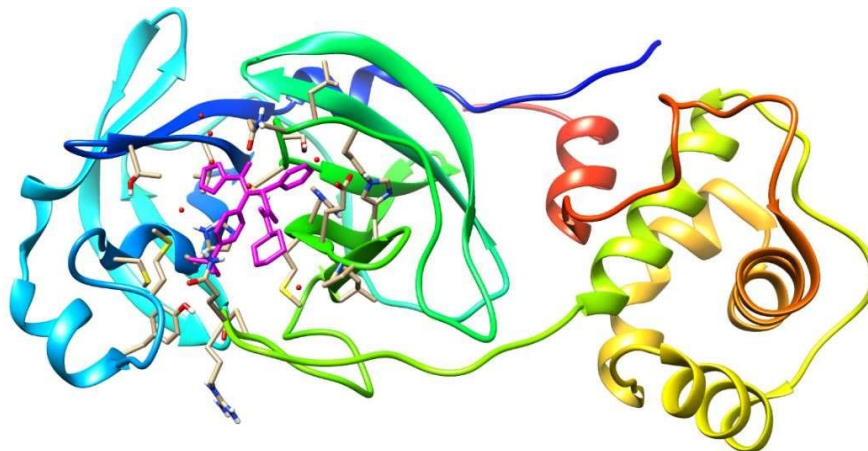


Figura 45. Proteína M^{pro} sin preparar.

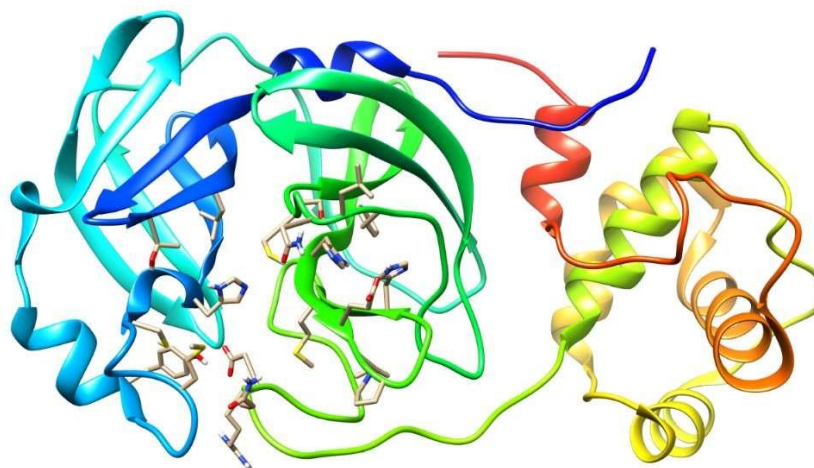


Figura 46. Proteína M^{pro} sin moléculas de agua y ligando.

c. Virtual Screening en MANATÍ

Los ligandos fueron exportados hacia MANATÍ en formato .pdbqt junto con la proteína preparada previamente. Se ejecutó el virtual screening empleando AutoDock Vina donde las coordenadas del grid fueron de $x = -22.194$, $y = 18.172$, $z = -24.459$, además el tamaño fue de $40\text{Å} \times 40\text{Å} \times 40\text{Å}$.

El tiempo estimado de trabajo para este virtual screening era para 5 meses en caso se emplease una laptop de escritorio, sin embargo, con la ayuda del MANATÍ, el procesamiento del virtual screening tardó 6 días en completarse. En las Figuras 47 y 48 se presentan la

interfaz del MANATÍ que se muestra al acceder por medio del programa PuTTY, además de una visualización del desarrollo del virtual screening.

```

login as: ktaype
ktaype@manati.iiap.gob.pe's password:
Last login: Tue Oct 26 21:31:04 2021 from 201.240.213.238

. . . . . :: Bienvenido al Centro de Alto Rendimiento
:: .. .. :: :: Computacional de la Amazonia Peruana
:: ... .. :: :: *****
::: .. .. ::: :: SUPERCOMPUTADORA MANATI - IIAP
:::: . . ::: :: **
:::: : : ::: :: www.iiap.org.pe/manati
..... :: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
.. .. :: Leer manual de acceso para ejecutar sus
.. .. :: programas/algoritmos en la cola de tareas
..... :: *****

[ktaype@manati ~]$ ls

```

Figura 47. Interfase del supercomputador MANATÍ.

```

Ejecutando...li
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####

WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1585195936
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****

```

Figura 48. Virtual screening en MANATÍ.

3.3.4 Etapa 3: Preparación previa al virtual screening de la proteína y los ligandos en Schrödinger

El procedimiento general de preparación de la proteína se hace mediante el módulo de maestro llamado “Protein Preparation Wizard” donde se le dan las condiciones apropiadas a la proteína, se asignan ordenes de enlace a los átomos del complejo proteína-ligando

empleando la base CCD (Chemical Component Dictionary) la cual contiene una lista de todos los residuos y todas las pequeñas moléculas que se encuentran en las entradas PDB, entonces empleando esta base se logra asigna los órdenes de enlace; también se adicionan hidrógenos, se crean enlaces disulfuros, se convierten selenometioninas a metioninas, etc. Otra parte importante también es su refinamiento, ya que anteriormente en el “preprocessing” se adiciona hidrógenos a la molécula, pero no la geometría correcta, de esta manera se optimizarán los enlaces hidrógenos para que se encuentren de una manera apropiada. Todas las consideraciones se resumen en la Figura 49 y 50.

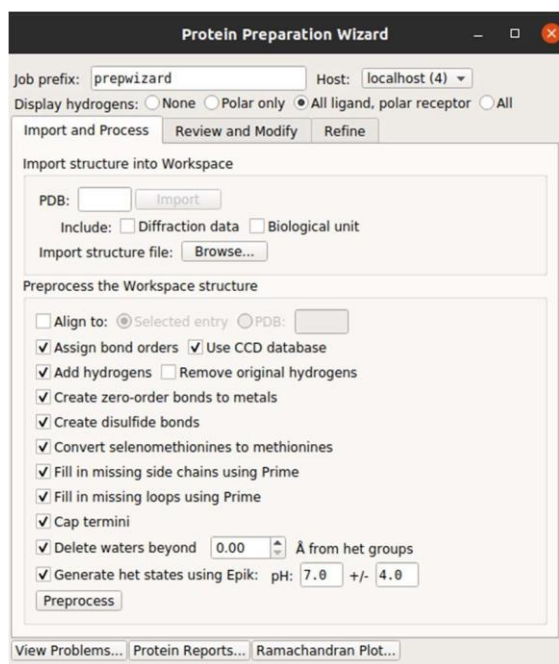


Figura 49. Parámetros considerandos en Protein Preparation Wizard.

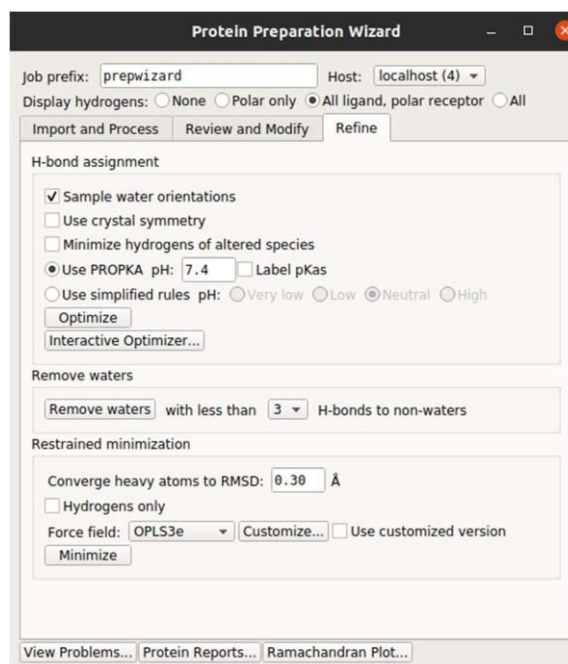


Figura 50. Parámetros considerandos en el Refine.

En el caso de los ligandos el módulo a emplearse es “LigPrep” se trabajó con el campo de fuerza OLPS3e a un pH de 7.4 usando Epik se desalinizó y generó un tautómeros por ligando (tener presente que este procedimiento se realiza para la molécula N3, y no para las

moléculas bioisostéricas que ya se habían preparado en el entorno de Google Colaboratory ni para los complejos que posteriormente se crearon y mantuvieron su geometría proporcionada por molSimplify). La lista de parámetros se muestra en la Figura 51.

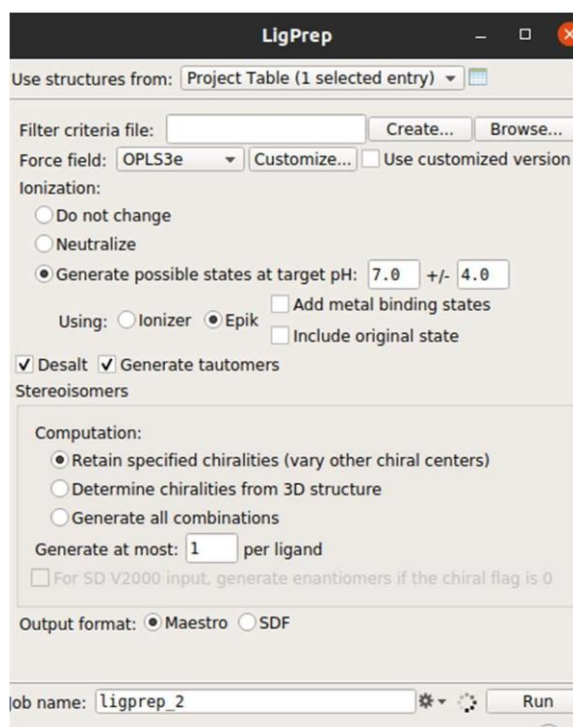


Figura 51. Parámetros en el módulo LigPrep.

3.3.5 Etapa 4: Virtual screening en Schrödinger

El protocolo del docking covalente que se siguió de acuerdo a (Zhu et al., 2014), donde se empleó el módulo CovDock de Schrödinger especificando la Cys145 como el reactivo receptor en la proteína M^{pro}, además de considerar el tipo de reacción de Michael y el grupo cetona α,β insaturado en su representación SMARTS ([C,c]=[C,c]-[C,c,S,s]=[O]). Las dimensiones de la malla de acoplamiento (GRID) fueron (X, Y, Z) = (-10.4, 12.23, 68.7) (Teli et al., 2021).

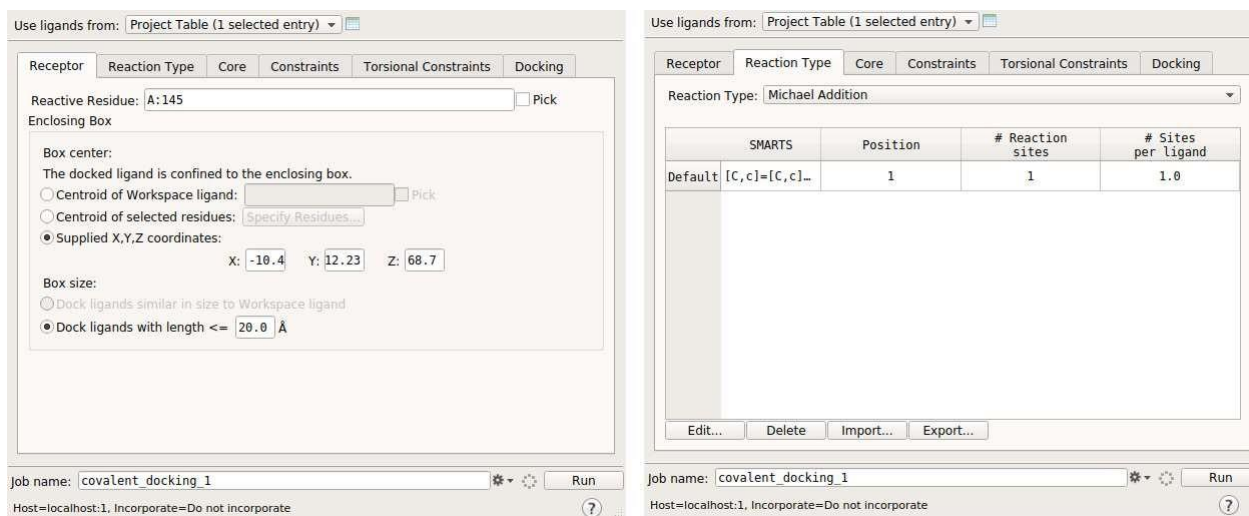


Figura 52. Condiciones ingresadas al módulo CovDock para el virtual screening de tipo covalente.

Para la ejecución del virtual screening del docking no covalente con las moléculas seleccionadas previamente, se consideró las posiciones que tenían previamente después del virtual screening en MANATÍ, de lo contrario se generarían muchos tautómeros, lo cual escaparía de los objetivos de este trabajo. Se empleó el módulo Glide, que nos ofrece esta posibilidad, adicionalmente se realizó el virtual screening empleando la opción XP (extra precisión) siguiendo el protocolo general de (Friesner et al., 2006). Las dimensiones de la malla de acoplamiento (GRID) fueron (X, Y, Z) = (-10.4, 12.23, 68.7) (Teli et al., 2021).

3.3.6 Etapa 5: Metalado de los mejores ligandos obtenidos del virtual screening

En este punto se decidió trabajar con el ligando que mejor puntuación previamente se había obtenido (-11.592 kcal mol⁻¹, Molécula1) a la cual se lo acompañaría con Ga por diferentes puntos de coordinación con la finalidad de conseguir una geometría octaédrica; el procedimiento general fue el siguiente:

En principio se dibujó a la estructura y teniendo presente que los cationes de Ga (III) se comportan como ácidos duros y presentan fuerte afinidad por ligandos duros o intermedios, principalmente por donadores de oxígeno o nitrógeno, se seleccionan 6 puntos de coordinación posibles señalados con diferentes colores para la Molécula 1, como se observa en la Figura 53.

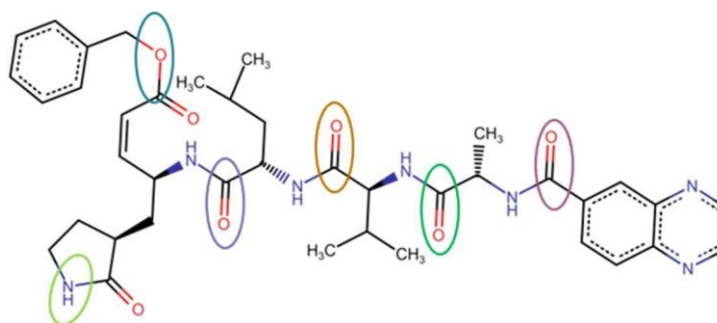


Figura 53. Representación de la Molécula 1 y selección de 6 puntos de coordinación para la generación del primer complejo.

Para ello fue necesario el emplear la representación SMILES de esta molécula:

```
[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1cc2nccnc2cc1)C(C)C)(C(=O)N[C@H](/C=C\C(=O)OCc1ccccc1)C[C@H]1C(=O)NCC1)CC(C)C
```

Esto es porque al programa que se empleó para generar los complejos de Ga (molSimplify) se le debe suministrar la molécula en esta notación, indicándole los puntos de coordinación que se enlazarán al metal en cuestión. Cuando se le suministra una cadena SMILES, molSimplify buscará automáticamente una conformación adecuada para la coordinación con el complejo objetivo. El comando ingresado fue:

```
molSimplify -lig
```

```
" [C@@H] (NC(=O) [C@@H] (NC(=O) [C@H] (C)NC(=O) c1cc2nccnc2cc1) C(C) C) (C(=O) N[C@H] (/C=C\C(=O) OCc1ccccc1) C[C@H] 1C(=O) NCC1) CC(C) C" -ligocc 1 -smicat
```

```
5,10,16,31,39,52 -core gallium -geometry oct -coord 6 -oxstate III -spin  
0 -skipANN True
```

Donde se indicó el estado de oxidación, además del número de oxidación, los puntos de coordinación por donde se debería coordinar al centro metálico (“5,10,16,31,39,52”) ubicados en la representación SMILES iniciando el conteo desde la izquierda y la geometría que se deseaba obtener. Este procedimiento se realizó para para 35 posiciones de coordinación, con la consecuente de 35 complejos de coordinación metalados con Ga. El software molSimplify busca una conformación adecuada para la coordinación que se ha especificado empleando una base de datos amplia que posee y de la cual ha aprendido, no es un programa de química cuántica. Adicionalmente para corroborar la estabilidad de los complejos generados se calcularon energías entre el HOMO-LUMO (HOMO-LUMO gap), esto se realizó empleando el software XTB, el cual es un software con el cual se puede desarrollar optimizaciones geométricas, cálculos de frecuencias e interacciones no covalentes; este programa está parametrizado para 86 elementos de la tabla periódica.(Bannwarth, Ehlert, & Grimme, 2019)

Para el cálculo de los HOMO-LUMO gap se trabajó en el entorno de Google Colaboratory e inicialmente se realizó una optimización de los complejos, para realizar seguidamente un cálculo de los orbitales moleculares mediante las siguientes líneas de código:

```
# Ejecutamos XTB  
# uhf es el número de electrones desapareados  
!./xtb complejo35.xyz --opt --chrg 3 --uhf 0 --gbsa water >  
complejo35.out  
  
#Ahora para obtener los orbitales moleculares y HOMO-LUMO gap  
!./xtb xtbopt.xyz --molden > xtb-molden.out
```

Esto generó un archivo llamado xtb-model.out en el cual se encontraba la información relacionada a los orbitales moleculares de los 35 complejos generados.

3.3.7 Etapa 6: Docking molecular de las moléculas metaladas

Para ejecutar el virtual screening de los complejos en el software Schrödinger, se empleó el módulo Ligand Docking con un docking XP (extra precisión), adicionalmente se solicitó información de los aminoácidos del entorno del complejo.

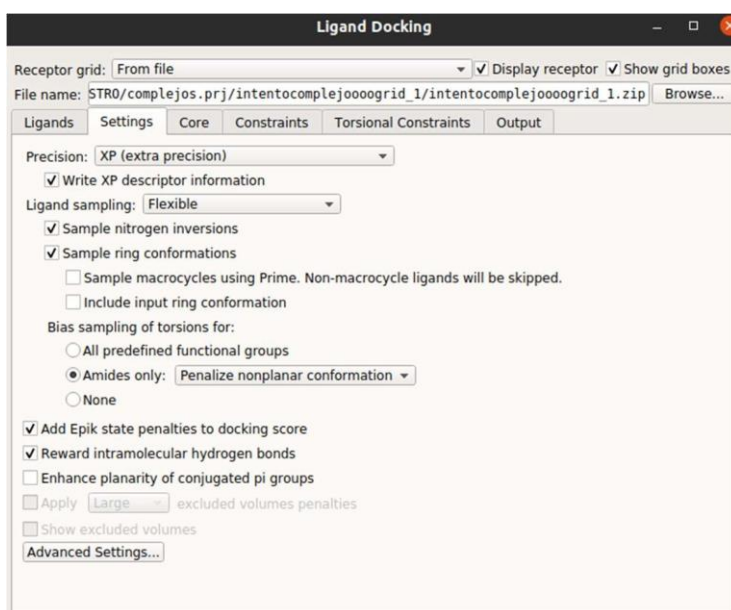


Figura 54. Parámetros considerados en el docking de los complejos vista 1.

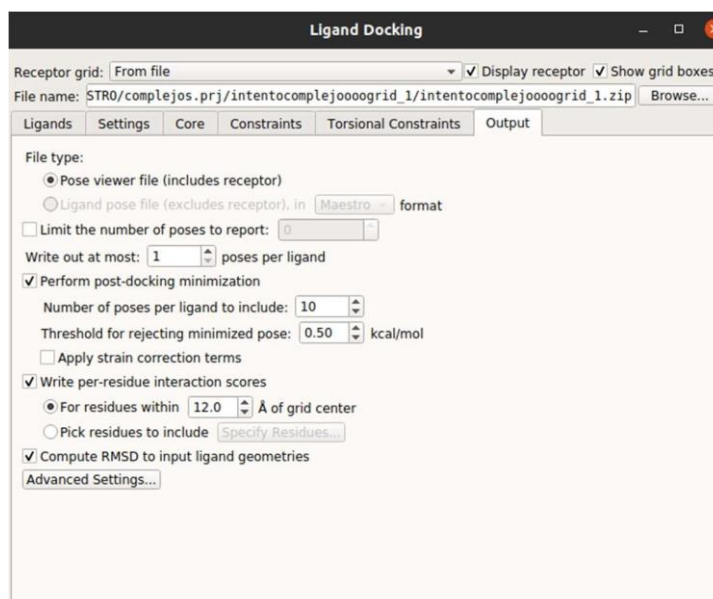


Figura 55. *Parámetros considerados en el docking de los complejos vista 2.*

Tener presente que, en este punto, se vio en la necesidad de realizar una sonda inorgánica, intercambiando el átomo de Ga (III) por el de Fe (III) debido a que no se encontraba parametrizado este átomo en el software de trabajo, adicionalmente también se agregaron estructuras en las cuales se retiró el átomo de hidrógeno que interfería en los enlaces coordinados Ga-OH, y Ga-NH. Esta justificación se detalla más a profundidad en la parte de resultados y discusiones, sin embargo, bajo esas consideraciones el procedimiento del virtual screening de los complejos no varía (los parámetros considerados siguen siendo los que se muestran en las Figuras 54 y 55).

3.3.8 Etapa 7: Dinámica molecular

Para esta etapa se empleó el módulo Desmond de Schrödinger, el cual es el encargado del programa Schrödinger en efectuar las simulaciones de dinámica molecular. De manera general se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación de la molécula: Lo cual incluye preparar correctamente a la macromolécula junto con su inhibidor acoplado, revisando que todos sus enlaces y cadenas estén correctamente posicionados, esto con el fin de evitar algún error en la simulación.
- Pre-Procesamiento: Esto incluye seleccionar el campo de fuerza para trabajar (se empleó OPLS), construcción del sistema, es decir su correcta solvatación, considerando las moléculas de agua que este debe incluir, con una concentración iónica (sales de cloruro de sodio se emplearon) y un tamaño adecuado de la caja de simulación, respetando las condiciones límites del sistema. También se deberá minimizar al sistema, con la finalidad de que este adopte una mejor disposición en el volumen seleccionado, evitando alguna superposición o choque entre las moléculas que pueda ocasionar grandes fuerzas interatómicas a fin de tener una buena configuración de inicio del sistema a simular.
- Ejecución de la dinámica molecular: Esto incluye considerar equilibración del sistema, deseando que llegue a 25 °C, y empezando a 0°C, es necesario equilibrar el sistema y llegue a la temperatura objetivo y llegado ahí no cambie, es decir esté equilibrado mi sistema. En este punto se logra empezar a simular bajo las condiciones establecidas a el sistema (N,P,T).
- Post-Procesamiento: Incluye a la determinación de las propiedades de interés de la trayectoria de simulación.

3.4 Manejo de residuos y normas de seguridad

El presente trabajo de investigación se realiza de forma *in silico*, por tanto, no se emplean reactivos que puedan ser contaminantes, o perjudiciales al medio ambiente, sin

embargo, se mencionan algunas normas importantes a tener en cuenta cuando se expone de manera constante a la laptop o computadora.

a. Reducir posturas forzadas y desviación articular

- Manipular la altura de la silla de manera que los brazos se flexionen un ángulo de 90° y no se levanten los hombros.
- Mantener la espalda recostada sobre la silla, de forma que las piernas formen un ángulo de 90°.
- Colocar la laptop de trabajo de manera que haya espacio para apoyar la mano en forma neutra y evitar tensiones musculares.
- Sentarse frente a la pantalla del portátil, de manera que permita ubicarnos en un ángulo visual que no incomode la flexión del cuello.
- Se recomienda realizar descansos frecuentes, por ejemplo, pausas cortas que se acompañen de pequeños estiramientos para relajar el cuerpo.

b. Control de la fatiga visual

- Es recomendable colocar la pantalla de la portátil a una distancia mayor a 40 cm con respecto a los ojos.
- Se recomienda realizar pausas breves de 20 segundos cada 20 minutos, para descansar los ojos.

c. Evitar la exposición a movimientos repetitivos

- Disminuir la cantidad de veces que se manipula el teclado, aprovechando los sistemas de autocompletado cuando sea posible.
- Emplear accesos directos los cuales van a ser de gran ayuda para no sobrecargar la tensión en nuestras manos.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Virtual Screening en MANATÍ

La ejecución del virtual screening en el supercomputador MANATÍ demoró 6 días, lo cual aceleró mucho el proceso de cálculo, ya que al trabajarse con una laptop promedio se estima que el proceso pudo demorarse entre 4-5 meses.

En este proceso también se realizó en acoplamiento con el inhibidor N3, el cual dio un docking score de $-6.9 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Bajo esta consideración se decidió a partir de este primer filtro trabajar con los compuestos con un docking score mayor o igual a $-9.0 \text{ kcal mol}^{-1}$, de donde se seleccionaron 41 moléculas que eran las únicas que cumplían con esta condición, las cuales fueron enumeradas en el orden (Molécula 1, Molécula 2, etc.).

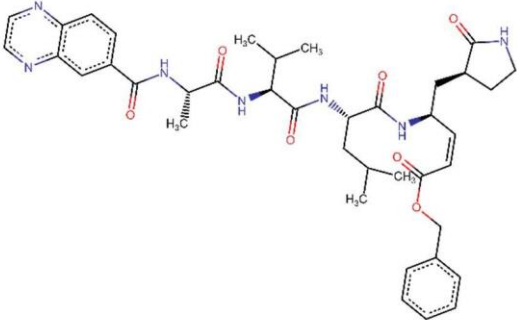
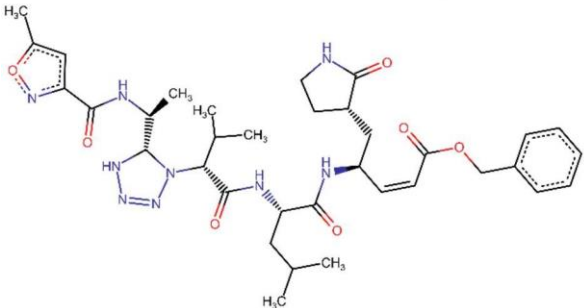
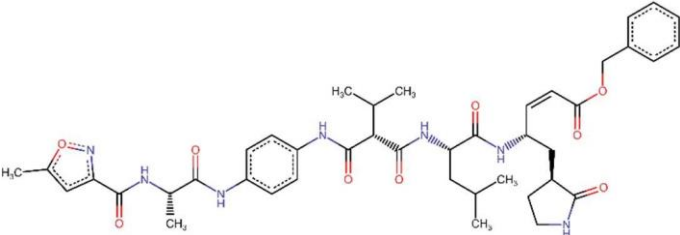
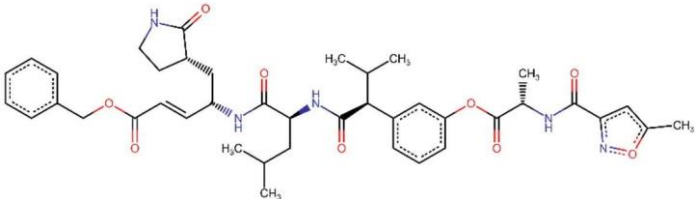
Sin embargo, al inspeccionar una por una, se encontró que 5 moléculas estaban defectuosas, poseían algunos enlaces cruzados (molécula 5, molécula 7, molécula 16, molécula 21 y la molécula 32).

Por esta razón se tuvo que repetir todo el procedimiento para estas moléculas, desde su preparación en Google Colaboratory hasta ejecución en el MANATÍ. Al analizar los docking score de estas se encontró que no superaban el filtro de $-9.0 \text{ kcal mol}^{-1}$, de esta manera fueron descartadas.

Adicionalmente se encontró que en la “molécula 31” había una incoherencia en cuanto al orden de enlace, se halló un nitrógeno con 4 enlaces, y por esta razón también fue descartada. Al final de este primer proceso de selección, se obtuvo un total de 35 moléculas, las cuales se presentan en la Tabla 8, donde no se presentan las moléculas descartadas mencionadas anteriormente.

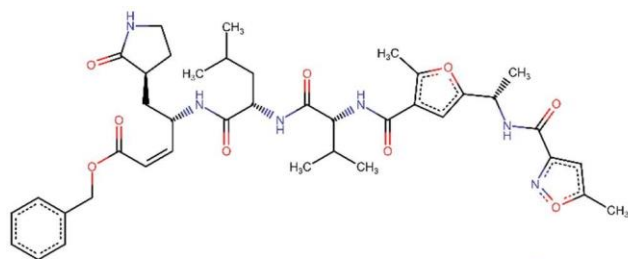
Tabla 8

Moléculas con docking score mayor o igual a -9.0 kcal mol⁻¹ obtenidas del virtual screening en MANATÍ

Nombre	Representación 2D	Docking Score (Kcal mol ⁻¹)
Molécula 1		-9.0
Molécula 2		-9.1
Molécula 3		-9.0
Molécula 4		-9.0

Molécula

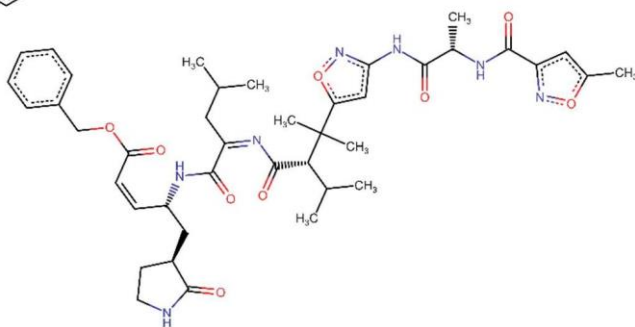
6



-9.0

Molécula

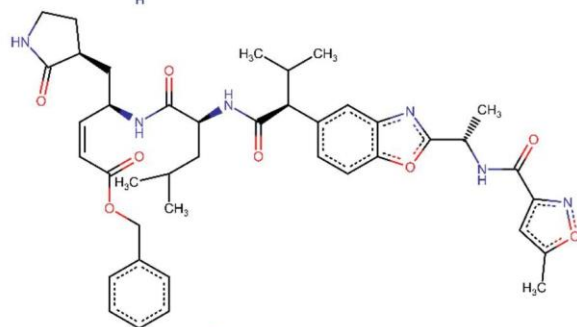
8



-9.0

Molécula

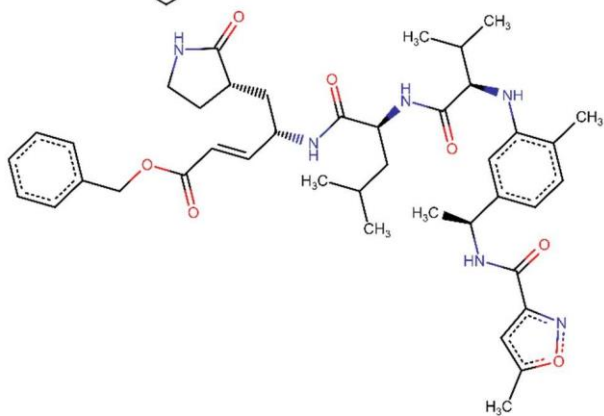
9



-9.2

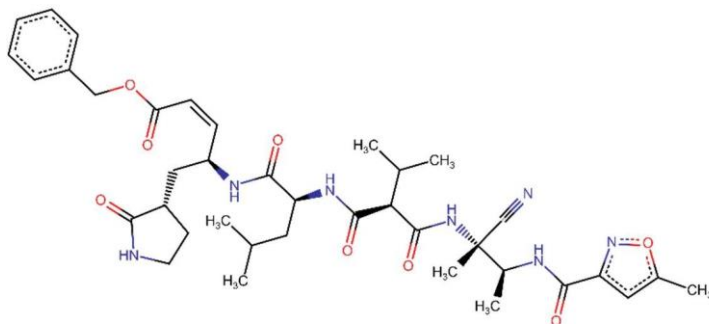
Molécula

10



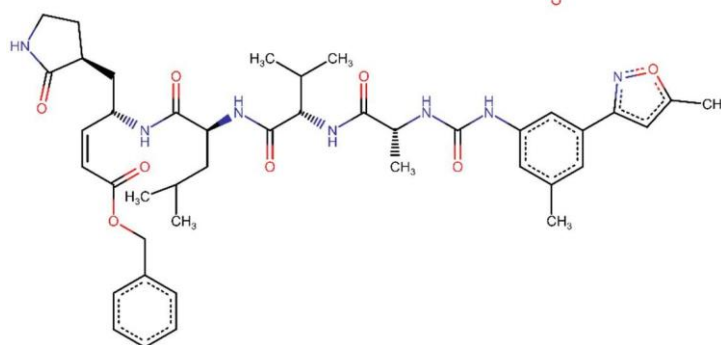
-9.0

Molécula
11



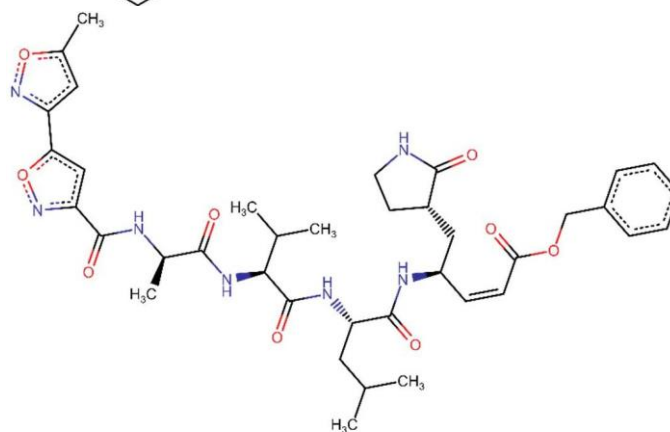
-9.0

Molécula
12



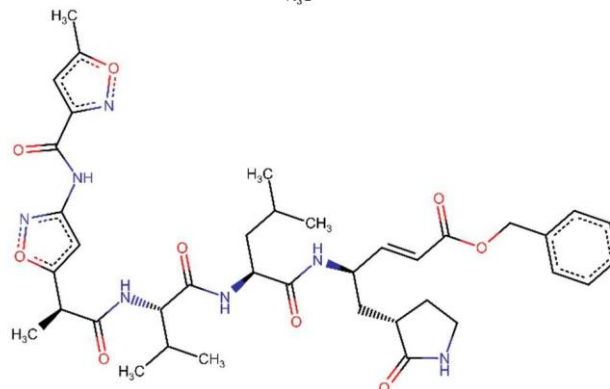
-9.5

Molécula
13



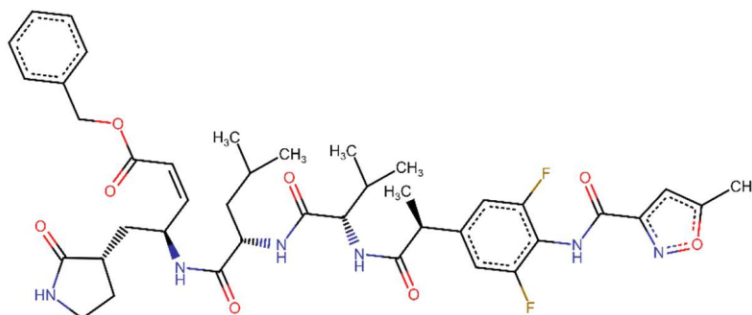
-9.1

Molécula
14



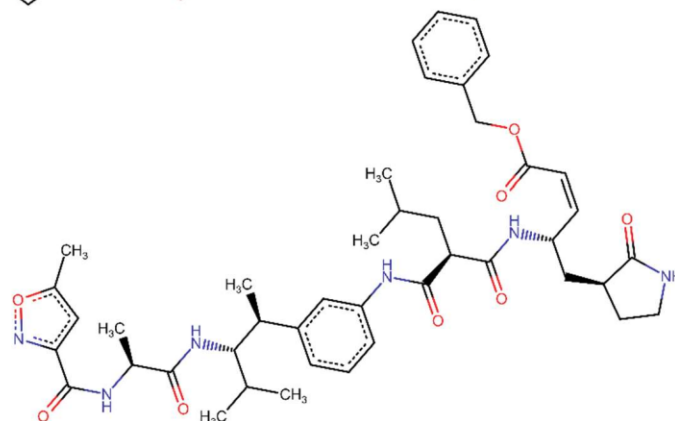
-9.0

Molécula
15



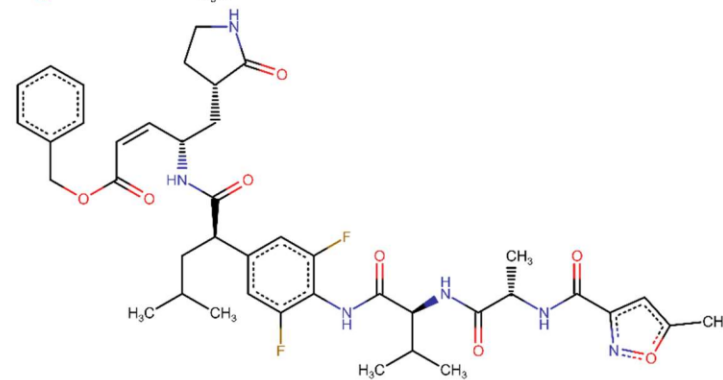
-9.0

Molécula
17



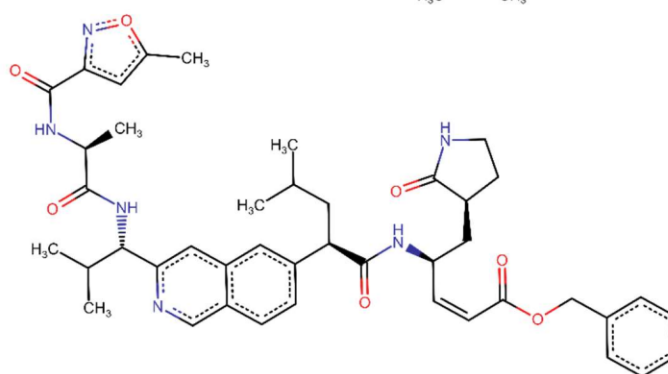
-9.1

Molécula
18



-9.3

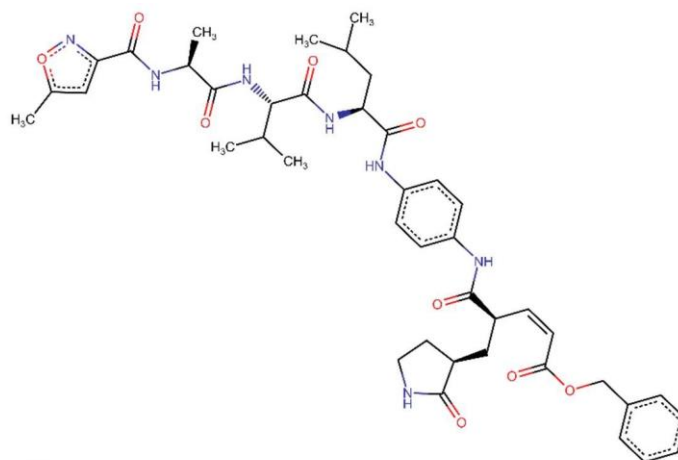
Molécula
19



-9.0

Molécula

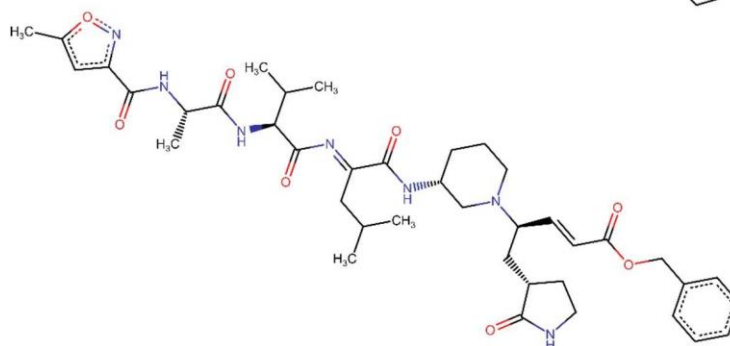
20



-9.8

Molécula

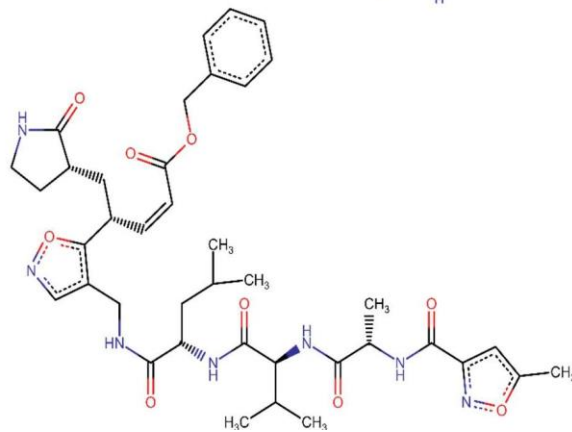
22



-9.3

Molécula

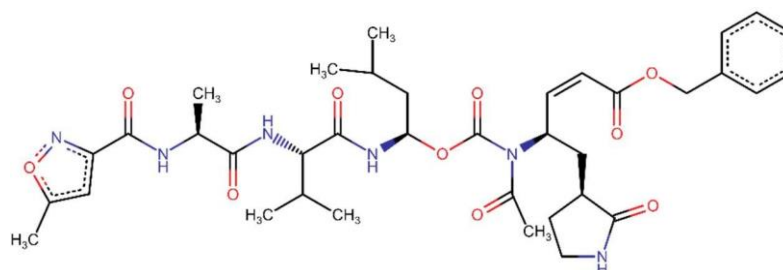
23



-9.1

Molécula

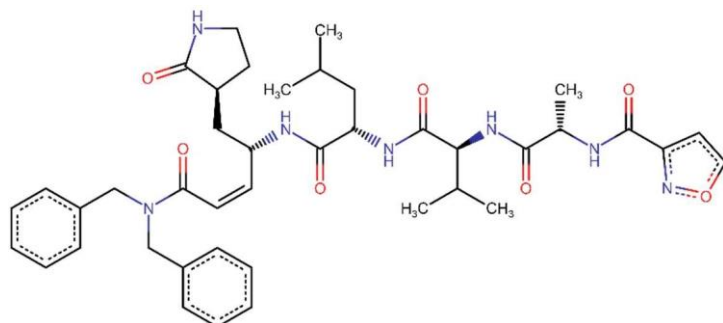
24



-9.2

Molécula

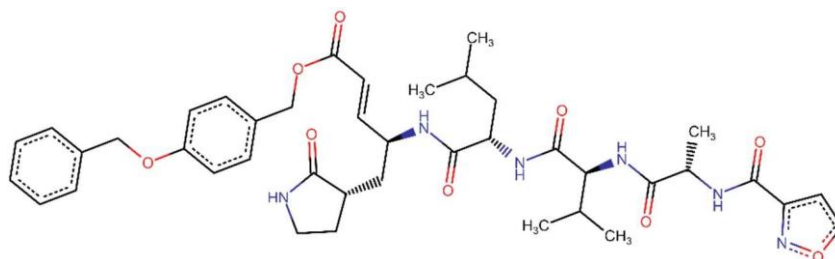
25



-9.2

Molécula

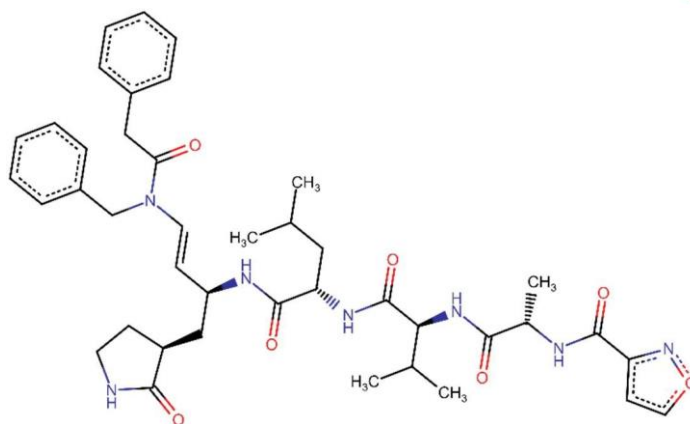
26



-9.1

Molécula

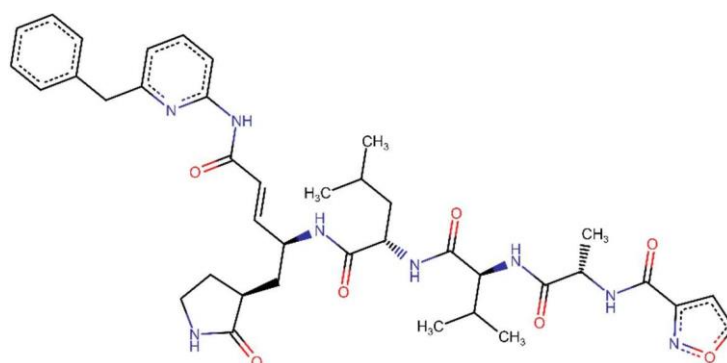
27



-9.0

Molécula

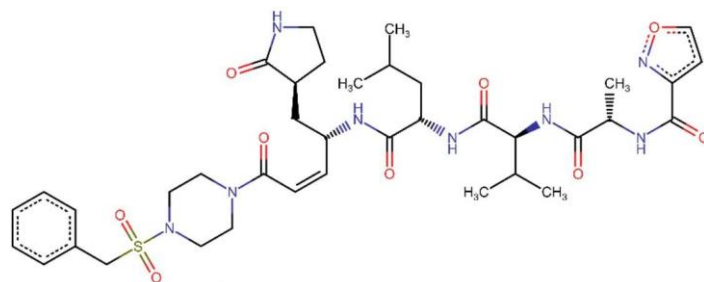
28



-9.0

Molécula

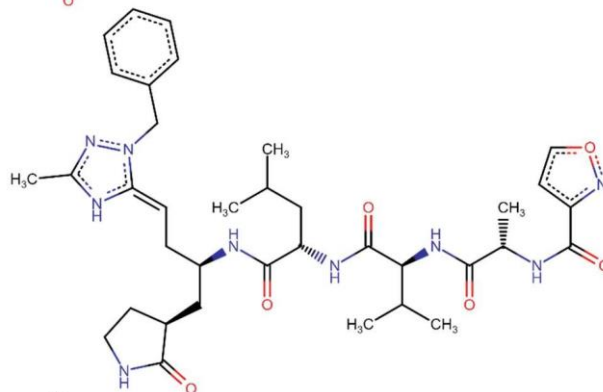
29



-9.1

Molécula

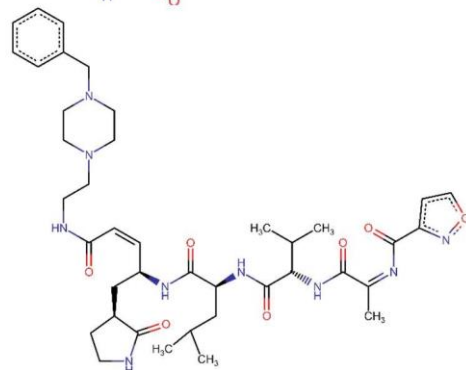
30



-9.0

Molécula

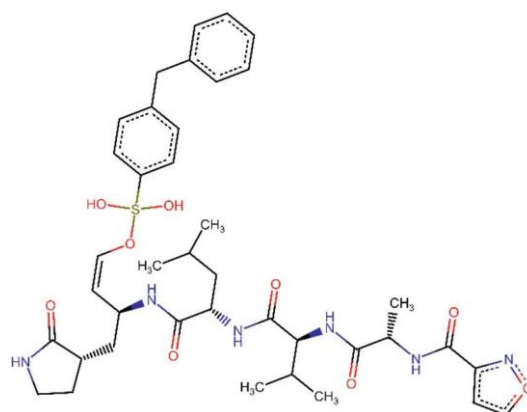
33



-9.2

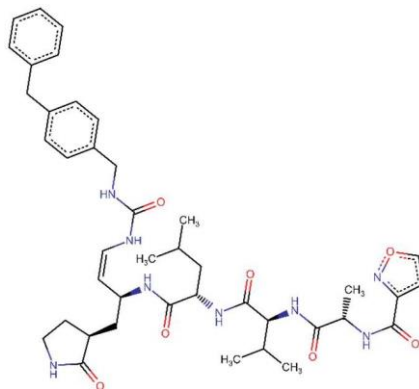
Molécula

34



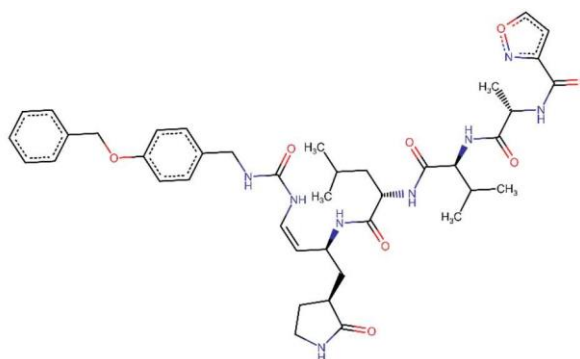
-9.0

Molécula
35



-9.1

Molécula
36



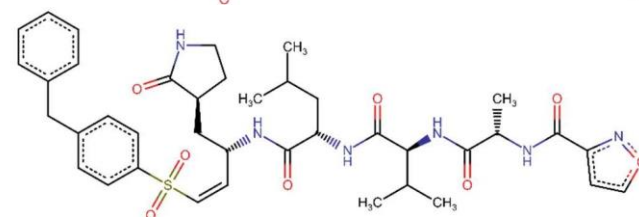
-9.1

Molécula
37



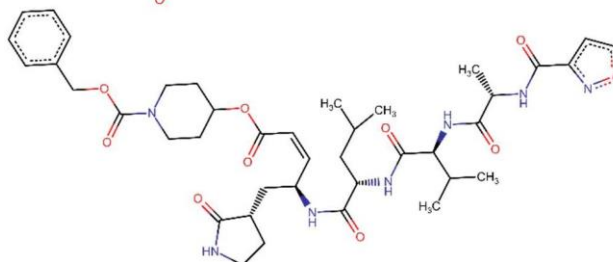
-9.5

Molécula
38

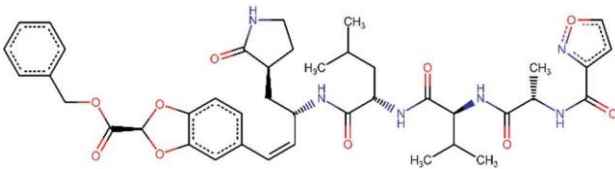
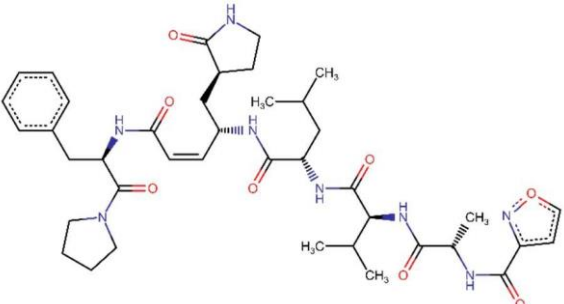


-9.0

Molécula
39



-9.2

Molécula 40		-9.2
Molécula 41		-9.0

4.2 Virtual screening covalente y no covalente en Schrödinger

En este punto, resulta muy importante recordar que la molécula N3 es un inhibidor de M^{pro} de tipo covalente, por ello es importante realizar un docking con M^{pro} (ID: 6LU7), que es justamente la proteína de donde provino N3 el cual se encuentra unido covalentemente a M^{pro} a través del enlace con el azufre de la Cys145. Por ello la necesidad de ver que posibles fármacos superan en docking score justamente al acoplamiento N3-M^{pro} (ID: 6LU7). Para ello en primer lugar se discriminó a qué moléculas se les aplicaría un docking covalente y a cuáles otras un docking tradicional, es decir no covalente.

Debido a esto se analizó en primer lugar qué interacciones originan que N3 se comporte de manera covalente frente a M^{pro}, y como se presenta en la Figura 56, se destaca en un óvalo el grupo cetona α, β insaturado, el cual es el grupo por donde se produce la interacción directamente con M^{pro}. Además de ello se especificó que este grupo actuaba como un aceptor de Michael, pues para que el azufre de la Cys145 se enlace al grupo cetona α, β insaturado se produce la reacción de Michael especificada en la Figura 57.



Figura 56. Característica estructural del inhibidor covalente N3. Adaptado de (Teli et al., 2021).

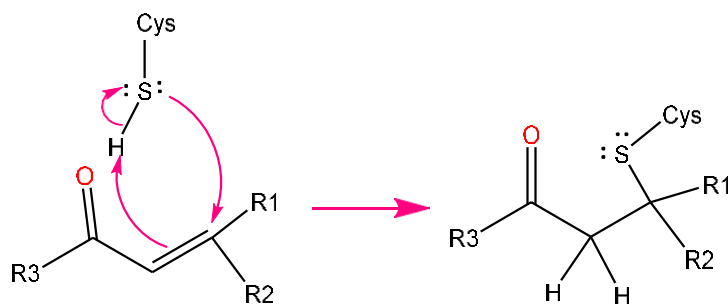


Figura 57. Reacción química de Michael. Adaptado de: (Zhu et al., 2014)

Cabe destacar la importancia de conocer de qué manera se enlaza el inhibidor N3 a M^{Pro}, porque este parámetro se ingresó en el software Schrödinger para que reconozca de qué manera se realizará el virtual screening de tipo covalente. En la Figura 58 se muestra el

diagrama de interacción del inhibidor N3 con M^{pro}, donde la línea color violeta resaltada representa el enlace covalente.

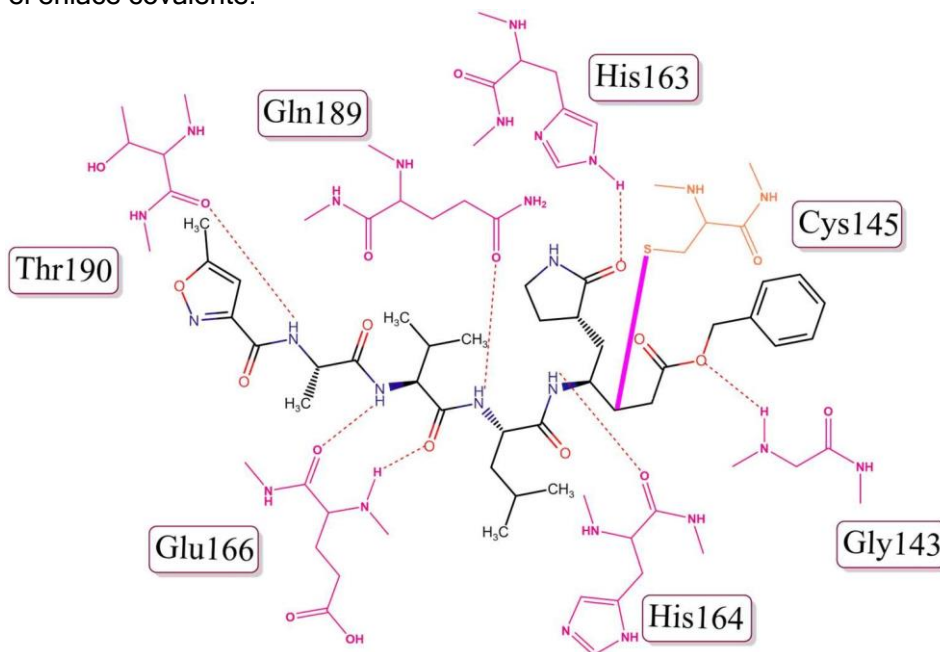


Figura 58. Diagrama de interacción entre N3 y M^{pro}. Adaptado de (Teli et al., 2021).

De esta manera se seleccionaron las moléculas que presentaban el grupo cetona α , β insaturado para realizarles un virtual screening de docking covalente. Y las moléculas restantes fueron seleccionadas para ejecutar un virtual screening de docking no covalente. Toda esta selección de moléculas se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9

Clasificación de moléculas para realizar virtual screening covalente y no covalente

Moléculas seleccionadas para virtual screening covalente				Moléculas seleccionadas para virtual screening no covalente			
Molécula1	Molécula2	Molécula3	Molécula4	Molécula27	Molécula30	Molécula35	Molécula36
Molécula6	Molécula9	Molécula10		Molécula37	Molécula38	Molécula40	
Molécula11	Molécula12	Molécula13					
Molécula14	Molécula15	Molécula17					
Molécula18	Molécula19	Molécula20					
Molécula2	Molécula23	Molécula25					
Molécula26	Molécula28	Molécula33					
Molécula39	Molécula41						

a. Virtual screening de docking covalente

Las 2 moléculas con mejor docking score fueron la Molécula1 y la Molécula 17 que alcanzaron valores de -11.592 y -9.543 kcal mol⁻¹ respectivamente, las cuales se encuentran entre las 14 moléculas obtenidas con enlace covalente que superaron la puntuación de N3 con M^{pro} que presentó un valor de -7.038 kcal mol⁻¹. En la Figura 59 y 60 se presenta a la Molécula 1 interactuando con M^{pro} en su representación de superficie molecular, además se obtuvo un diagrama de interacciones 2D, de donde se puede apreciar que los enlaces puente de hidrógeno, representados con flechas violetas, se producen cuando los oxígenos de los grupos carboxílicos interactúan con los aminoácidos **GLY143** y **GLU166**, otra interacción puente de hidrógeno se presentó entre el **GLN189** y el hidrógeno del grupo amino. También se observa la interacción covalente del grupo cetona α, β insaturado con el azufre perteneciente a la **CYS145**, el cual presenta un comportamiento hidrofóbico.

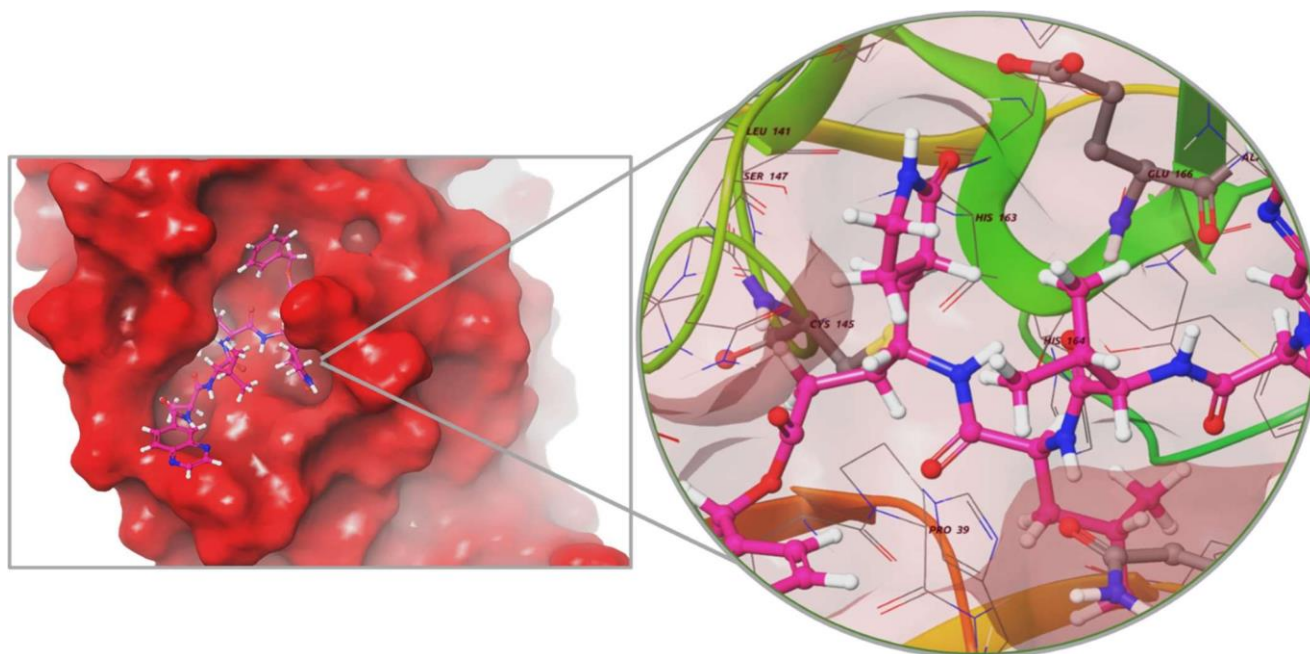


Figura 59. Interacción de la Molécula1 con M^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.

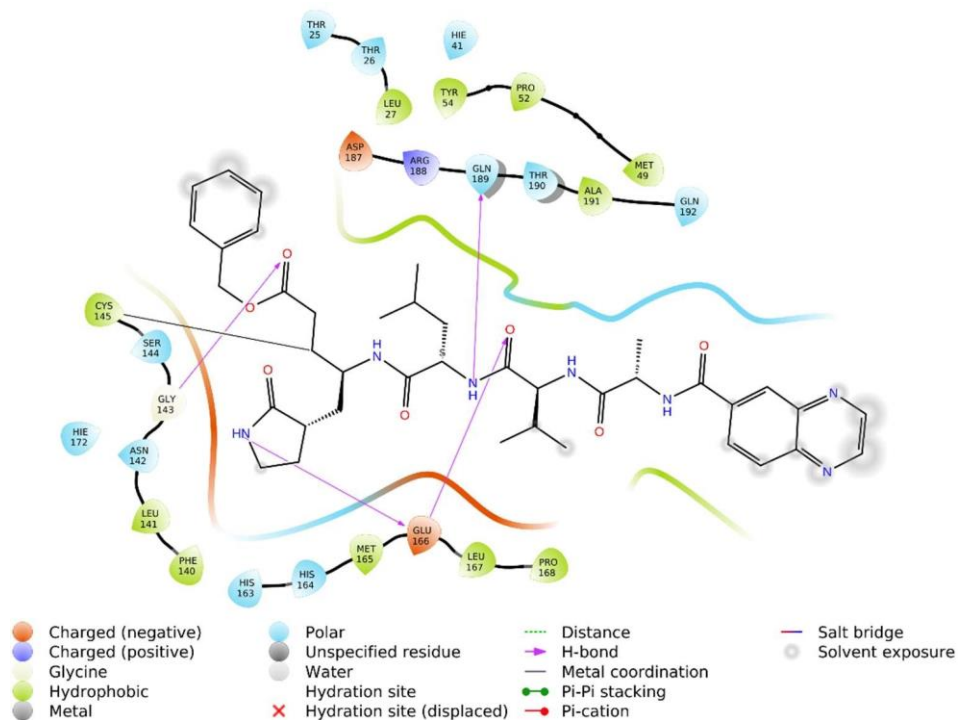


Figura 60. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula1 con M^{pro}.

Las zonas presentadas en coloración naranja representan un comportamiento básico (cargadas negativamente) tal es el caso del aminoácido **GLU166**. Las zonas con coloración celeste representan un comportamiento polar como los aminoácidos **GLN163**, **HIS164** los cuales presentan interacciones intermoleculares dipolo-dipolo con el grupo lactama perteneciente al inhibidor N3. Adicionalmente mencionar que la coloración verde hace referencia un comportamiento de los aminoácidos hidrofóbico.

Las Figura 61 y 62 representan la interacción de la Molécula 17 con M^{pro}, donde como se aprecia en la Figura 61, hay una menor área de contacto a comparación al primer caso, el pocket o bolsillo donde encaja la Molécula es menor a comparación del caso anterior, esto justifica el menor docking score obtenido, sin embargo, se destaca que aún sigue teniendo una

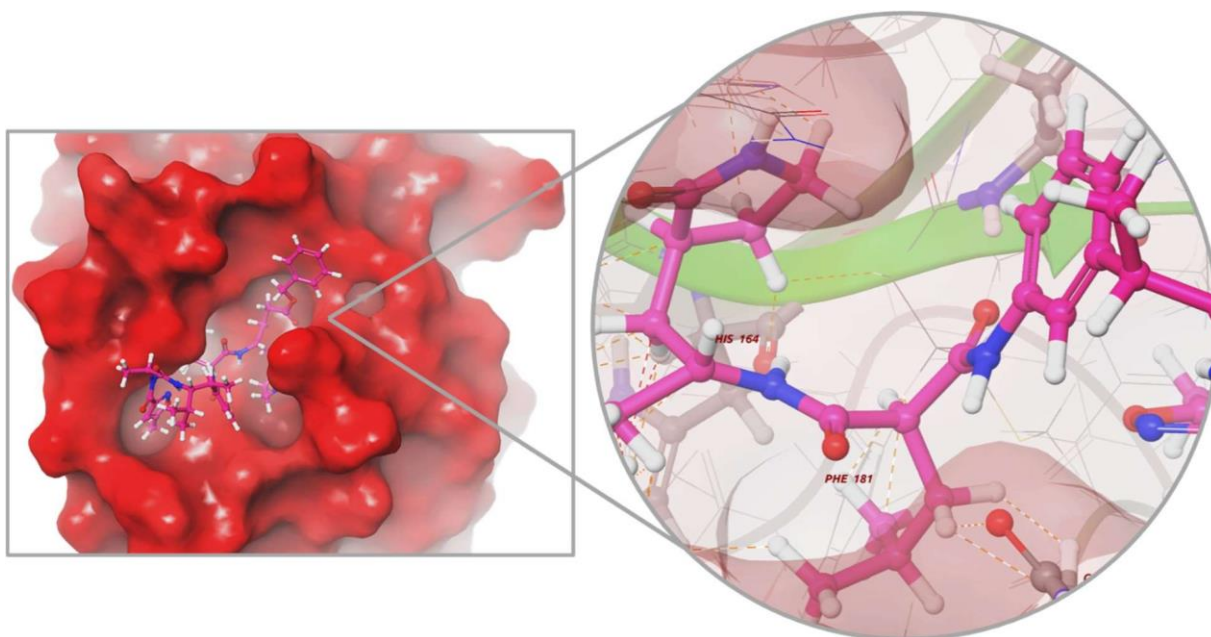


Figura 61. Interacción de la Molécula 17 con M^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.

buena puntuación a comparación de la interacción N3-M^{pro}

Se presenta el diagrama de interacción 2D donde efectivamente se justifica y evidencia con mejor claridad lo comentado anteriormente. Hay evidencia de interacciones puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo lactama y los aminoácidos **SER144**, **GLY143**. El hidrógeno del grupo amino también presentó el mismo tipo de interacción (puente de hidrógeno) con **HIS164**, del mismo modo el nitrógeno del grupo amino en la parte superior interaccionó con la **GLN189** y finalmente la **GLU166** con el oxígeno del grupo carbonilo presentaron la misma interacción. También hay observa la interacción covalente del grupo cetona α , β insaturado con el azufre perteneciente a la **CYS145**, el cual presenta un comportamiento hidrofóbico. También se aprecia las interacciones hidrofóbicas entre el grupo

lactama con los aminoácidos **LEU141** y **PHE140**. Lo resaltante de este punto es que solo un área es la que ha ocasionado que se presente una buena puntuación, la parte de la molécula que tiene un comportamiento hidrofóbico con algunas zonas polares y prácticamente ningún aminoácido ácido.

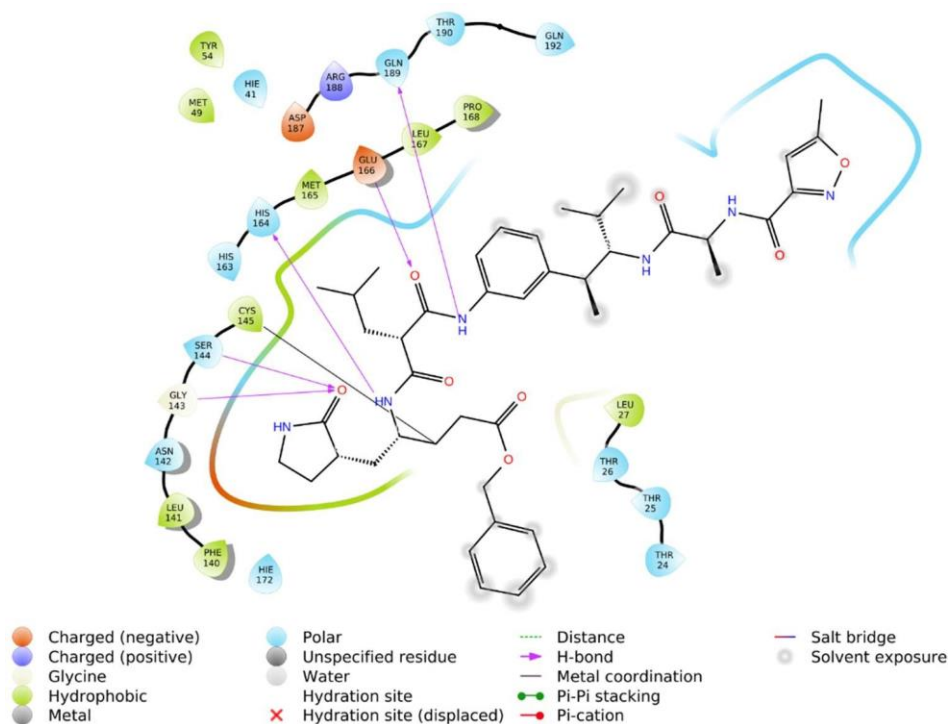


Figura 62. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula 17 con M^{pro} .

Las restantes interacciones con enlace covalente de las moléculas que superaron la puntuación de N3- M^{pro} se presentan en el ANEXO 3.

En la Figura 63 se presenta el enlace covalente entre el grupo cetona α, β insaturado con el azufre que se escindió para proceder a separar a la molécula N3 de M^{pro} , el software Schrödinger dispone de una herramienta para construir enlaces, así como para romperlos, además de adicionar estados de oxidación en caso que se desee trabajar con ligandos metálicos, entre otras ventajas.

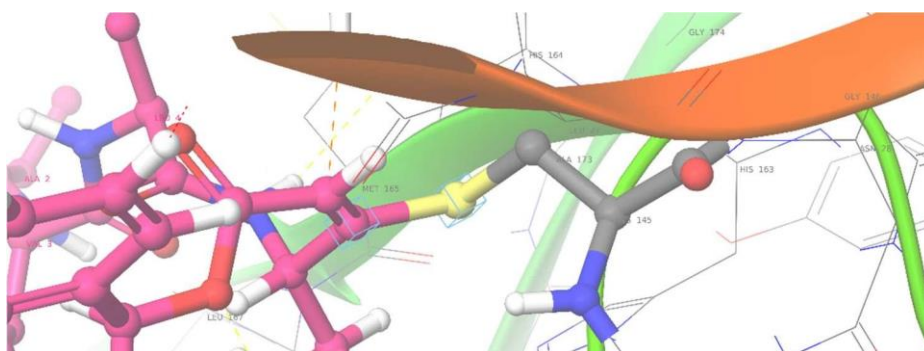


Figura 63. Enlace a escindir para separar N3 de M^{pro} para posterior docking covalente.

b. Virtual screening de docking no covalente

Se presentan 2 moléculas (Molécula27 y Molécula30) con docking score de -10.260, -7.329 kcal mol⁻¹, las cuales superaban a el valor obtenido del docking de N3-M^{pro} (-7.038 kcal mol⁻¹). Las Figura 64 y 65 representan la interacción de la Molécula 27 con M^{pro}, donde como se aprecia no existe un enlace directo entre el azufre y la Molécula 27, esto es porque esta no presenta el grupo cetona α , β insaturado. Además, se observan las interacciones puentes de hidrógenos formados entre la **GLY143** y un oxígeno perteneciente a un carbonilo, también entre la **GLU166**-oxígeno del grupo carbonilo y **GLU166**-hidrógeno del grupo amino. Otro enlace puente hidrógeno se presentó entre la **GLN189**-hidrógeno del grupo amino y finalmente entre la **THR190**-hidrógeno de un grupo amino.

Notar que la presencia del anillo en la parte izquierda da presencia de un carácter negativo, por la presencia de la resonancia en dicho anillo, con los aminoácidos **PHE140** y **LEU141**, ocurren interacciones hidrofóbicas, también se presentan interacciones hidrofóbicas entre el aminoácido **CYS145** y el grupo lactama. Otro punto que podemos notar es que los

aminoácidos están alrededor de la molécula y están bastante próximos a esta, para un radio de 4 Å de distancia, que es el que corresponde el diagrama de interacciones presentado.

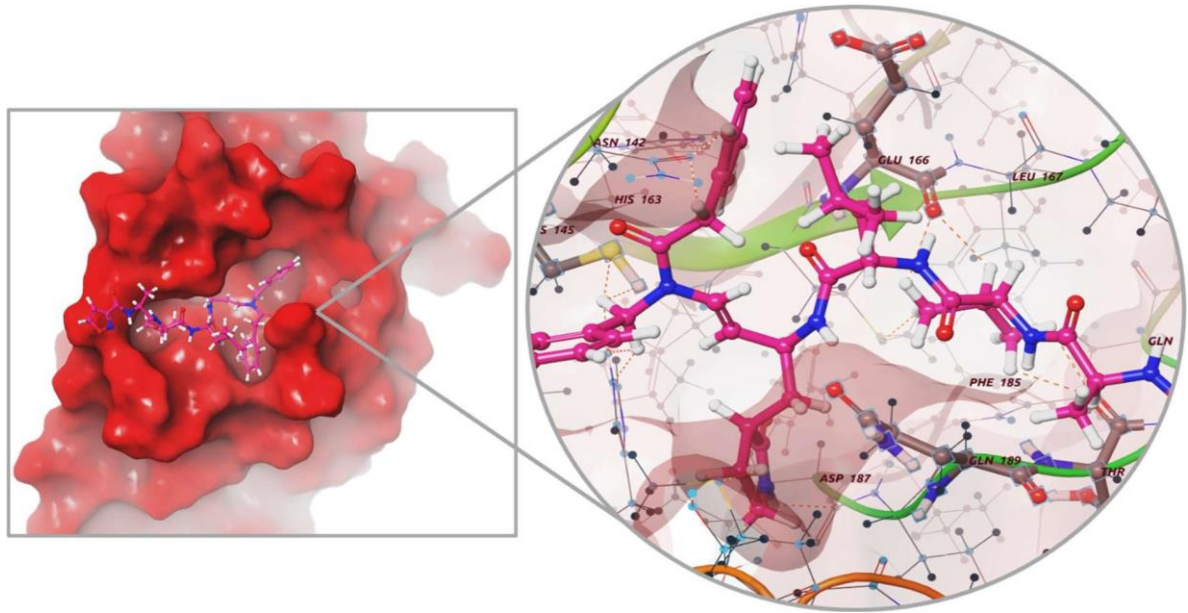


Figura 64. Interacción de la Molécula 27 con M^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.

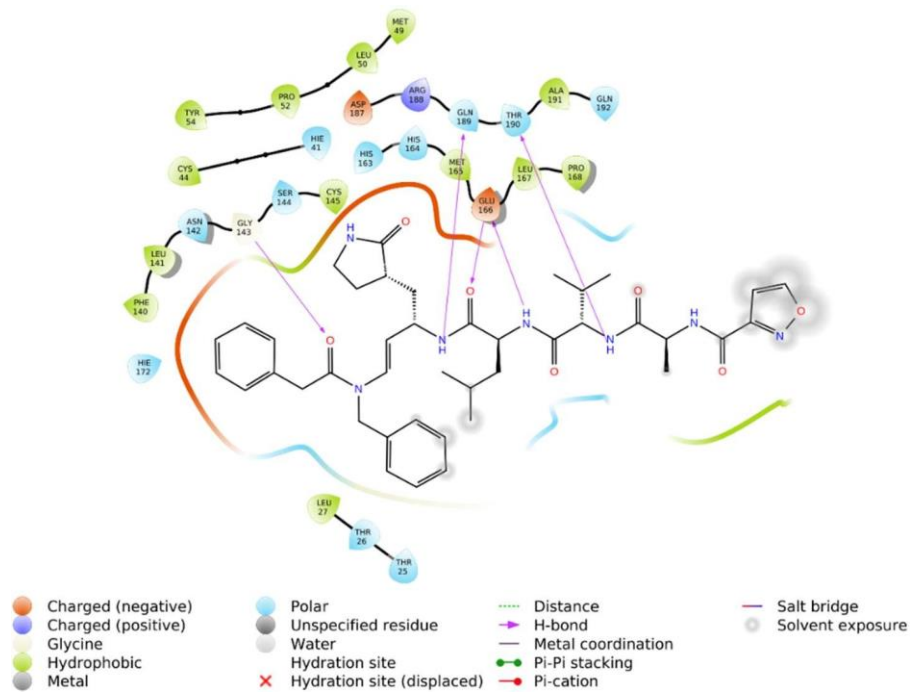


Figura 65. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula 27 con M^{pro} .

Para el caso de la Molécula 30 (docking score $-7.329 \text{ kcal mol}^{-1}$) también se presenta la interacción con M^{pro} de carácter no covalente, donde las interacciones puente de hidrógeno se dan entre la **PRO168**-grupo lactama, hay 3 interacciones **GLU166**-hidrógeno con un grupo amino producidas en la parte central de la molécula. Otra interacción puente de hidrógeno se presentó entre **GLU166**-oxígeno del grupo carbonilo. También se observó la presencia de las interacciones de tipo π - π entre el isoxazol y el aminoácido **HIE41** (que representa una histidina protonada). El diagrama más detallado de todas las interacciones y comportamiento de aminoácidos en el entorno cercano de la Molécula 30 se presenta en las Figuras 66 y 67. Adicionalmente el diagrama de interacciones de las restantes moléculas con interacción no covalente se presenta en el ANEXO 3. Por otro lado, la Tabla 10 resume los docking score de las moléculas posterior al virtual screening, junto con los aminoácidos de sus entornos cercanos.

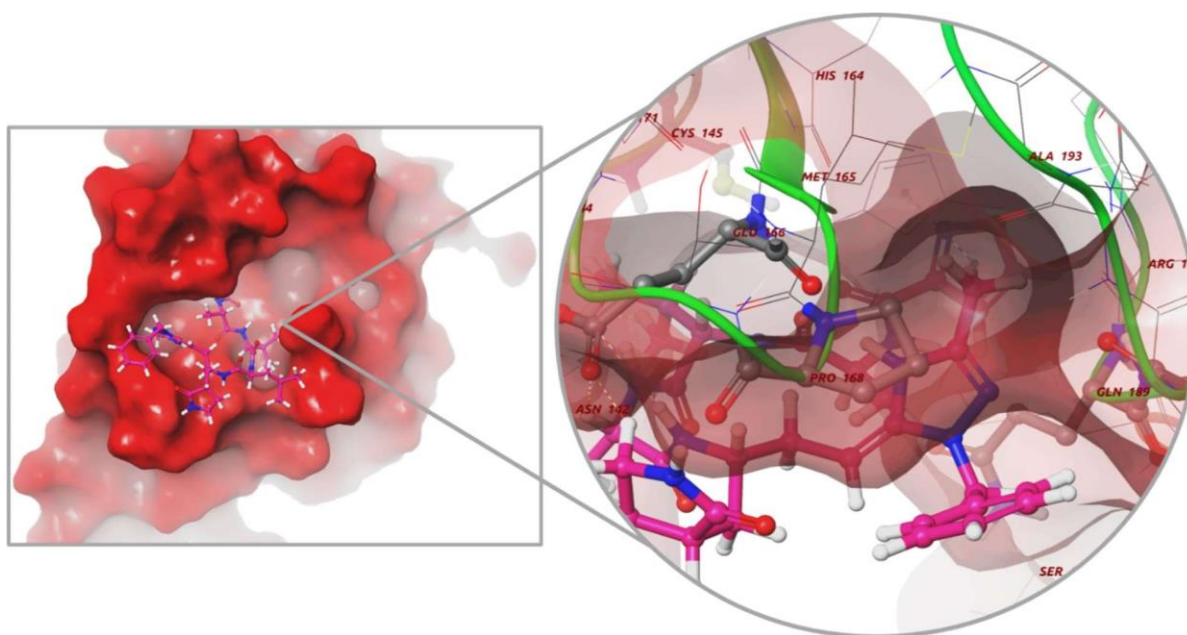


Figura 66. Interacción de la Molécula 30 con M^{pro} (superficie molecular) y ampliación del sitio de interacción.

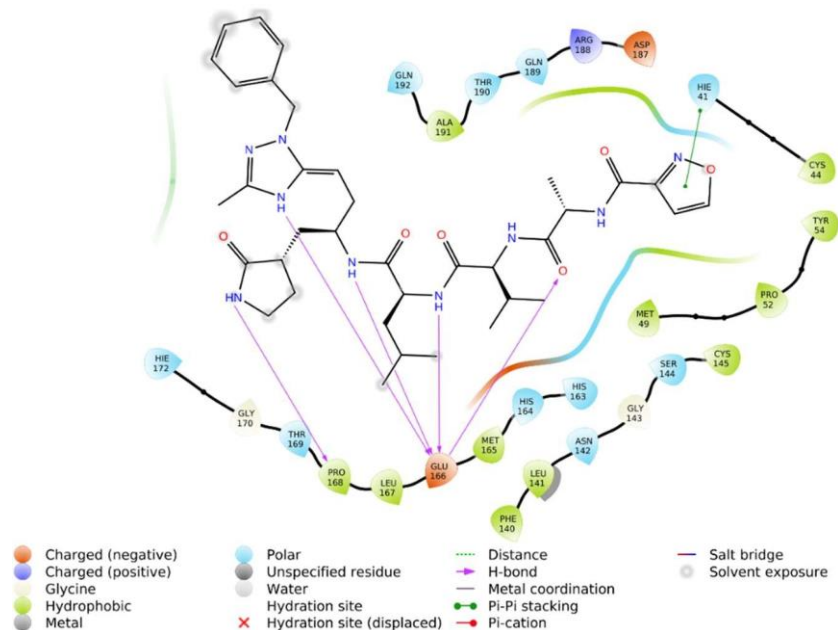


Figura 67. Diagrama 2D de las principales interacciones de la Molécula 30 con M^{pro}.

Tabla 10

Docking score e interacciones de las moléculas después del virtual screening covalente y no covalente

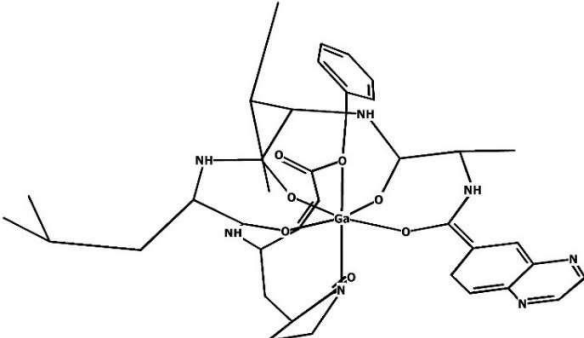
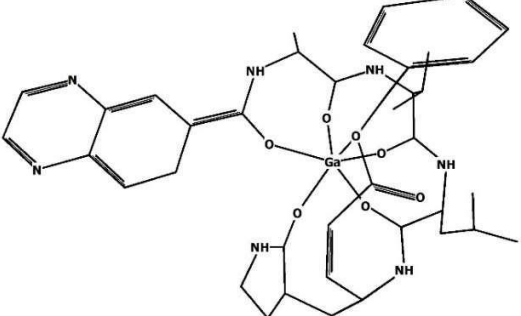
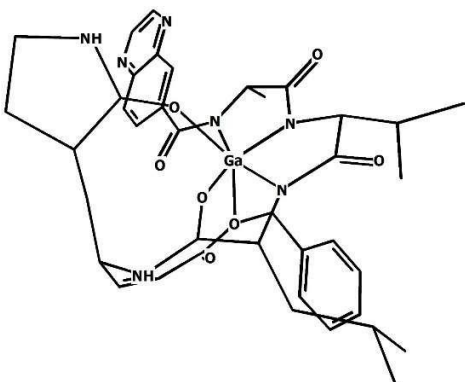
Nombre de moléculas	Interacciones de las moléculas docking score superior al inhibidor N3	Docking Score (kcal mol ⁻¹)
Molécula1	Gln189, Glu166, Cys145, Gly143	-11,592
Molécula27	Gln189, Gly143, Glu166, Thr190	-10.260
Molécula17	Gln189, Glu166, His164, Cys145, Ser144, Gly143	-9.543
Molécula18	Phe140, Cys145	-9.487
Molécula4	Cys145, Phe140, Gln189, Glu166	-9.478
Molécula10	Cys145, His164, Gln189, Glu166	-8.992
Molécula9	Cys145, Glu166	-8.652
Molécula19	Gly143, Ser144, Cys145, Glu166	-8.179
Molécula15	Asn142, Phe140, Gly143, Cys145, Glu166	-8.165
Molécula2	Cys145, Gly143, Phe140	-7.874
Molécula22	Glu166, Gly143, Cys145	-7.738
Molécula14	Gln189, His164, Hie141, Cys145, Gly143, Phe140	-7.708
Molécula13	Cys145, Glu166, Gln189	-7.660
Molécula23	Gly143, Cys145, Glu166	-7.598
Molécula30	Pro168, Glu166, Hie41	-7.329
Molécula20	Glu166, Gly143, Cys145, Hie41	-7.192
Inhibidor N3	Thr190, Glu166, His164, Gly143, Cys145, His163, Gln189	-7.038
Molécula40	Cys145, Gly143, Thr190, Glu166, Hie172	-7.034

4.3 Metalado de el mejor ligando obtenido del virtual screening

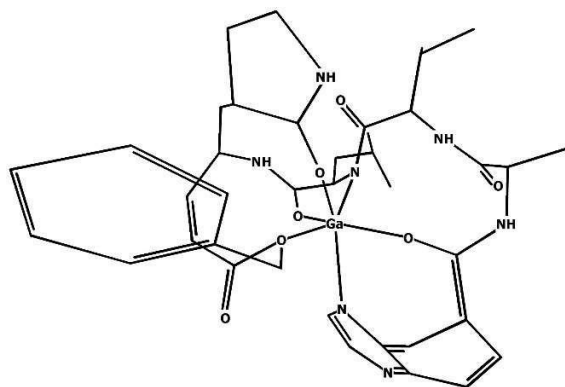
La Tabla 11 resume los complejos elaborados en el programa molSimplify, junto con sus energías Homo-Lumo, sus representaciones tridimensionales y sus puntos de coordinación, considerando la estructura SMILES.

Tabla 11

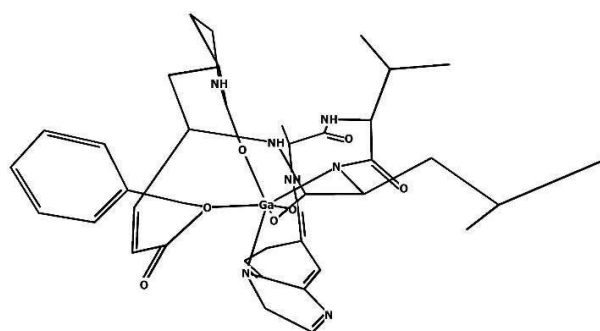
Lista de complejos obtenidos con el programa molSimplify

Nombre	Homo-Lumo Gap (eV)	Puntos a coordinar	Representación 3D molécula
Complejo1	0.195610228742	5 10 16 31 39 52	
Complejo2	0.045312119003	5 10 16 31 39 51	
Complejo3	0.046933902441	3 8 14 31 39 51	

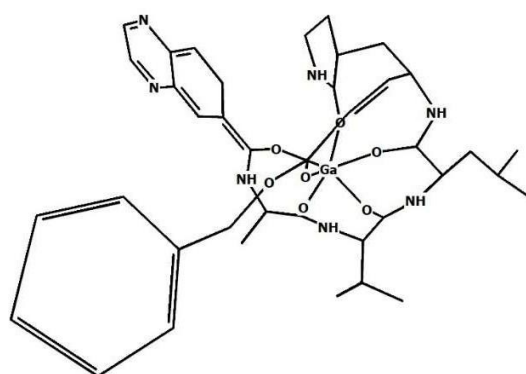
Complejo4 0.081122875405 3 16 20 31 39
51



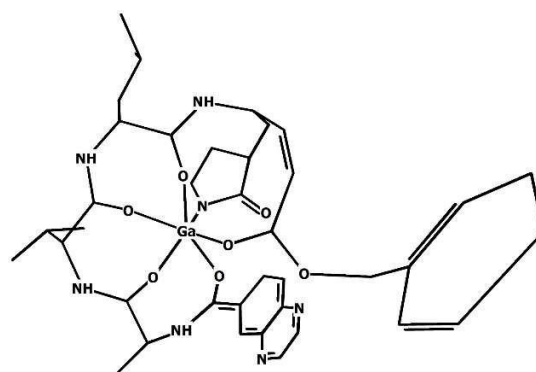
Complejo5 0.077758464810 3 16 23 31 39
51



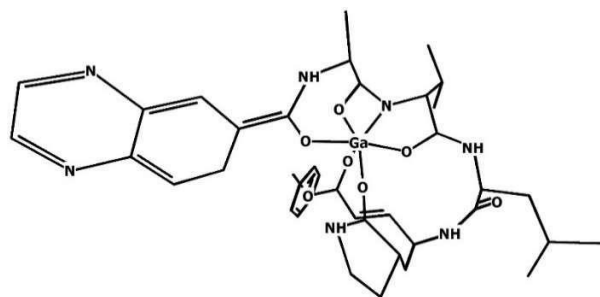
Complejo6 0.151523091230 5 10 16 31 38
51



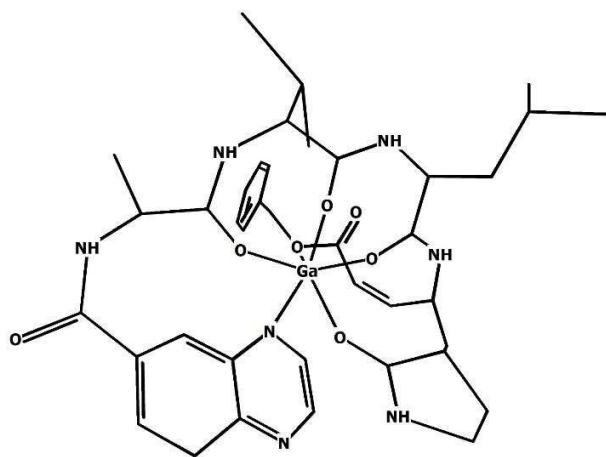
Complejo7 0.120709513691 5 10 16 31 38
52



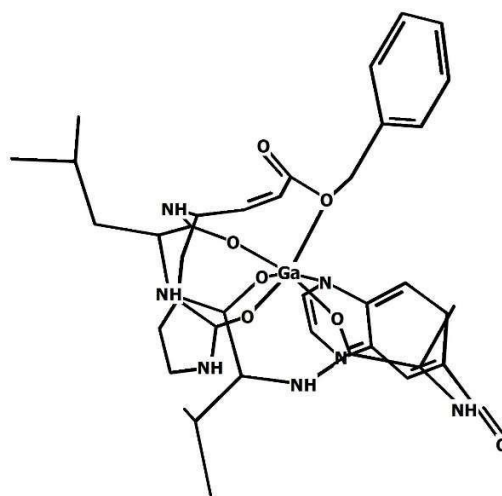
Complejo8 0.138225979492 5 8 10 16 38
51



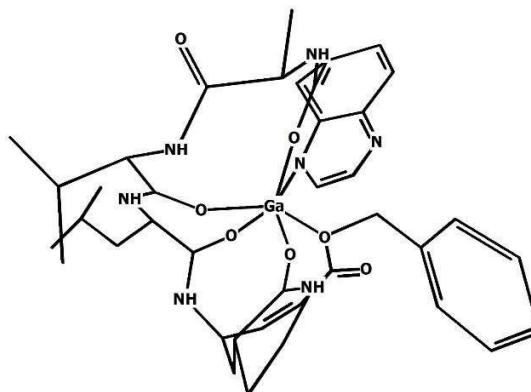
Complejo9 0.022025796577 5 10 20 31 39
51



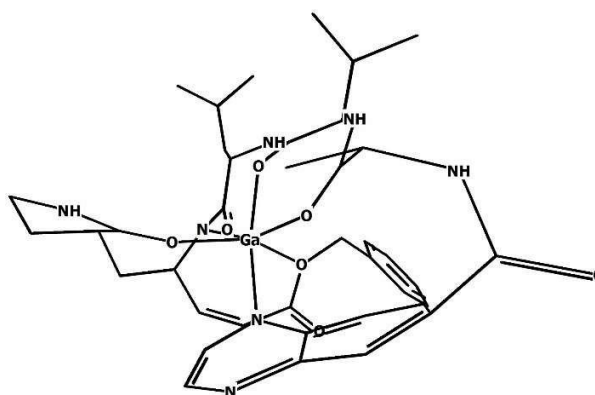
Complejo10 0.050878842308 5 10 23 31 39
51



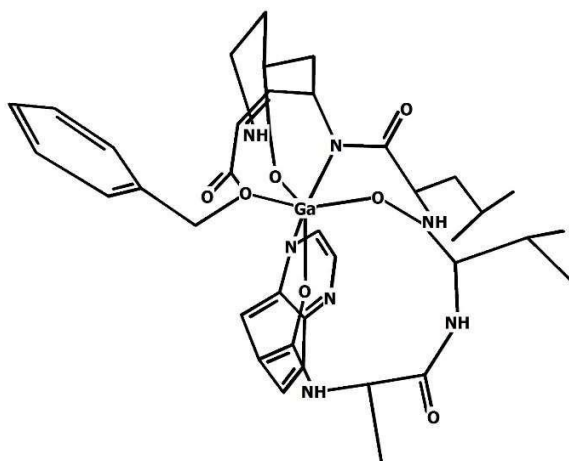
Complejo11 0.027807130864 5 16 20 31 39
51



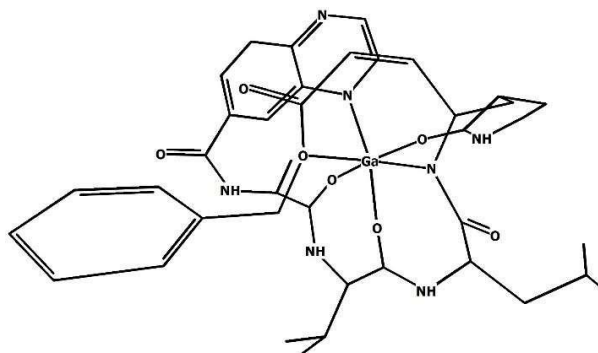
Complejo12 0.349292476777 5 10 23 32 39
51



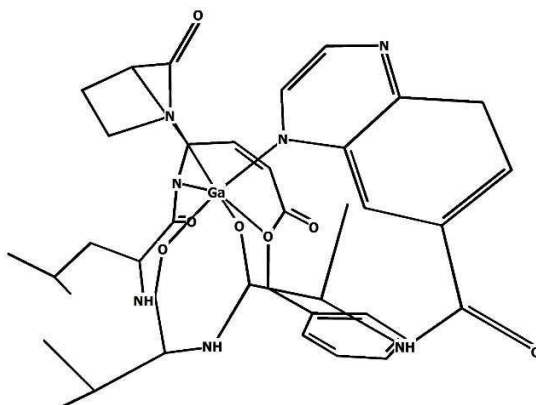
Complejo13 0.055086018866 5 16 20 32 39
51



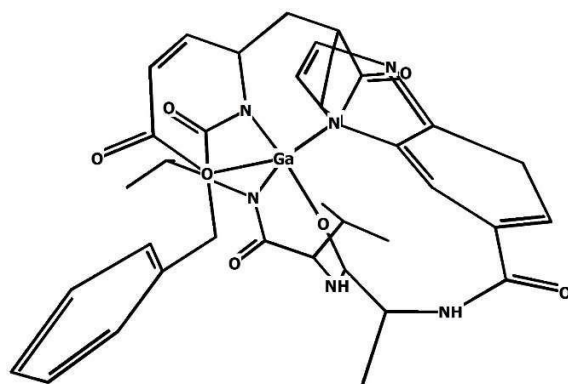
Complejo14 0.024554159070 5 10 20 32 39
51



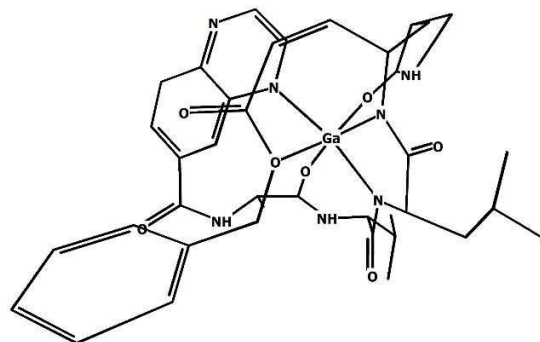
Complejo15 0.117497827378 5 10 20 32 39
52



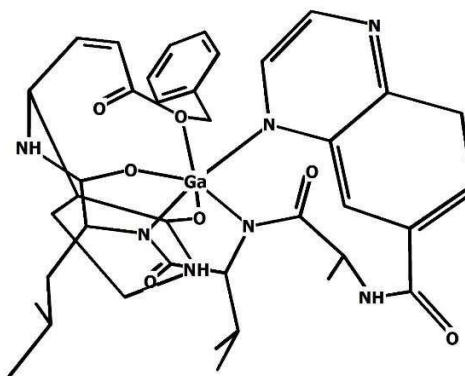
Complejo16 0.012949888905 3 10 20 32 39
52



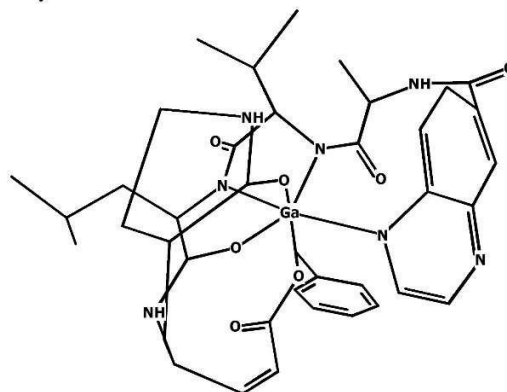
Complejo17 0.137471594472 3 10 20 32 39
51



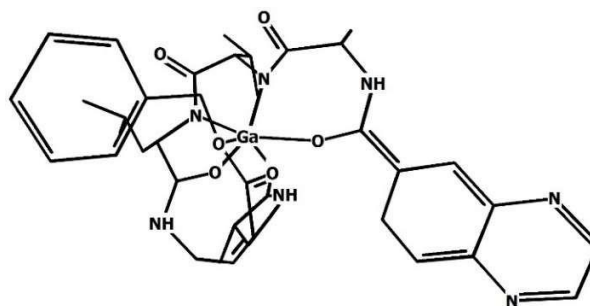
Complejo18 0.072923863202 3 8 20 31 39
51



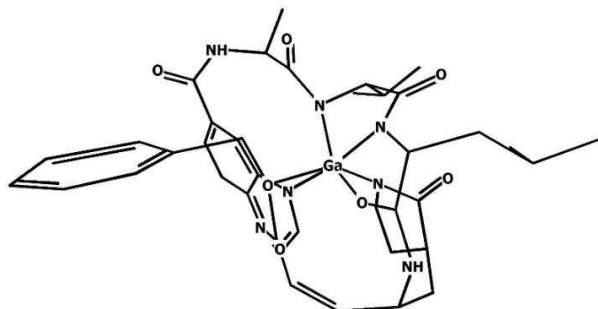
Complejo19 0.094007276392 3 8 23 31 39
51



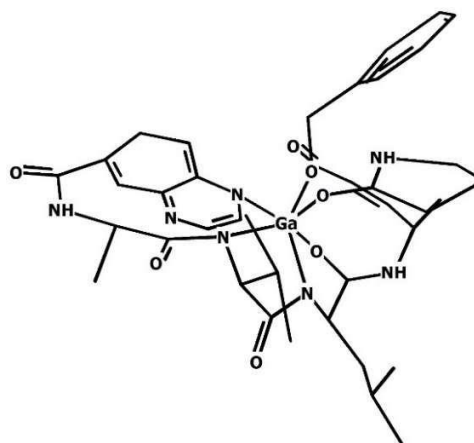
Complejo20 0.054011647062 3 8 16 31 39
51



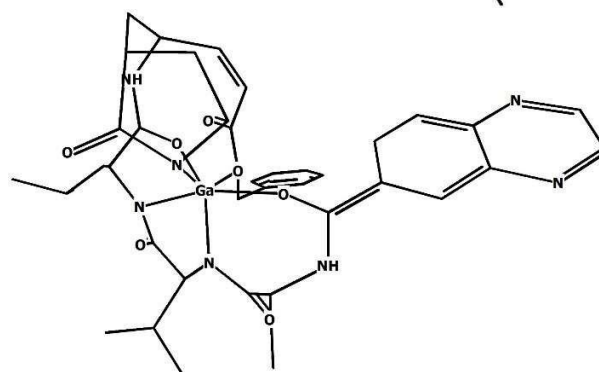
Complejo21 0.098946754292 3 8 20 31 39
52



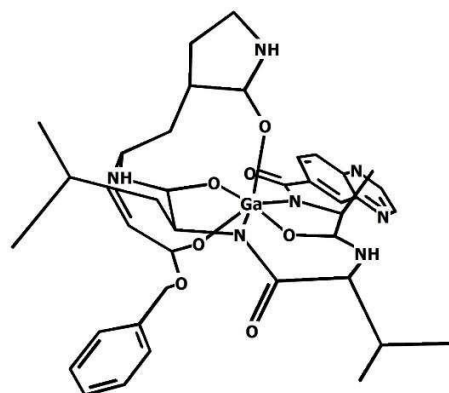
Complejo22 0.136166234439 3 8 23 31 39
51



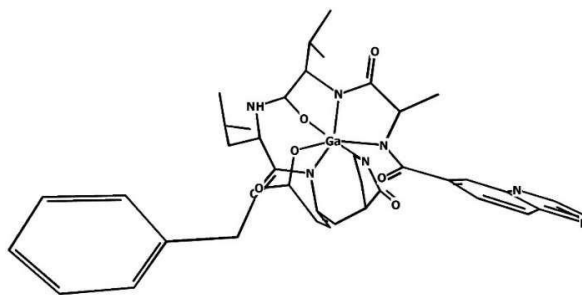
Complejo23 0.041382621996 3 8 16 31 39
52



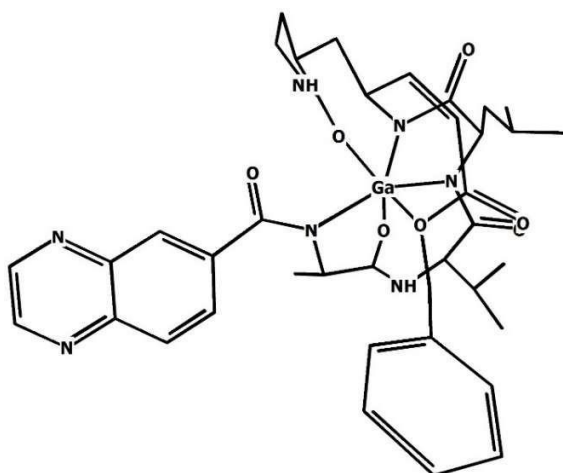
Complejo24 0.038657115954 3 10 14 31 38
51



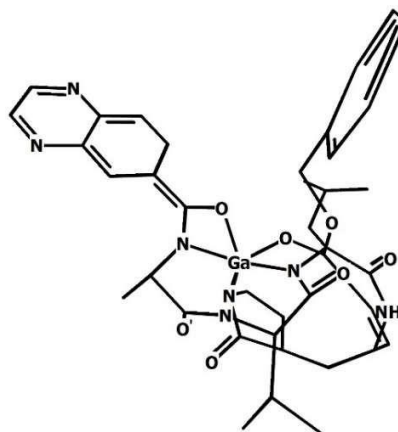
Complejo25 0.008630089967 5 8 14 32 38
52



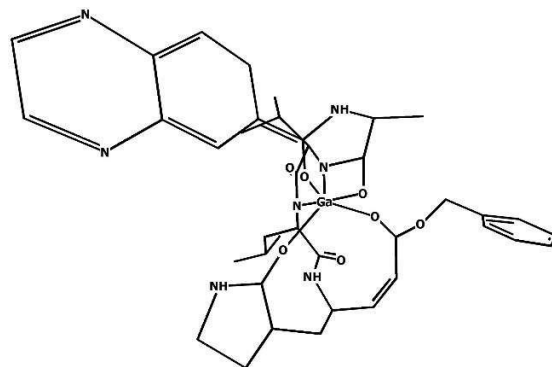
Complejo26 0.043538028272 3 10 14 32 39
51



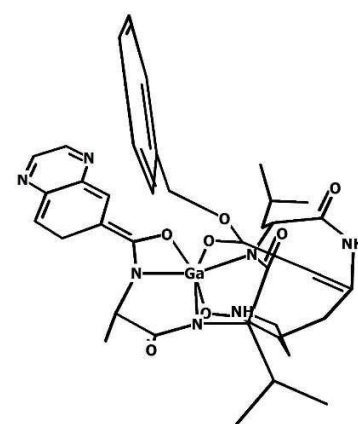
Complejo27 0.048187759435 3 8 14 16 38
52



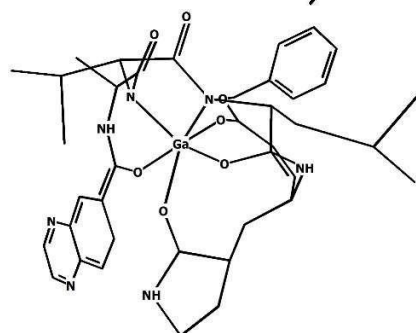
Complejo28 0.032536289418 3 8 10 16 38
51



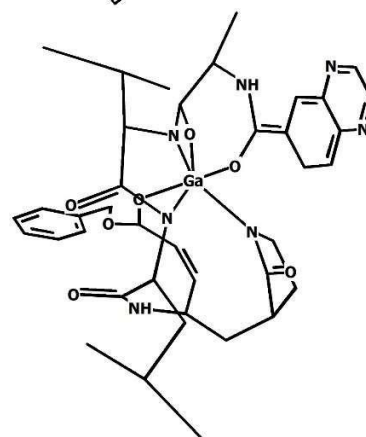
Complejo29 0.057822068920 3 8 14 16 38
51



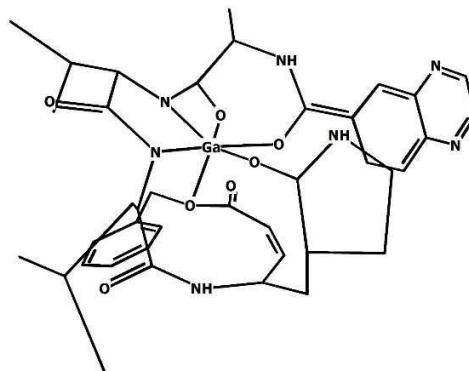
Complejo30 0.051090895614 3 8 16 31 38
51



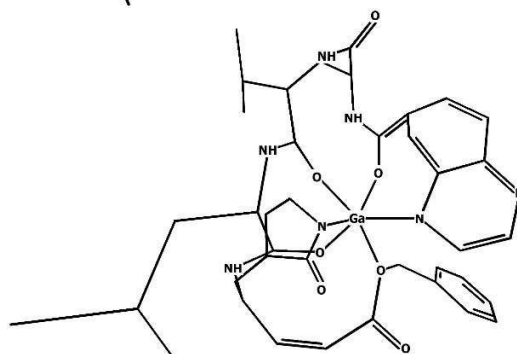
Complejo31 0.043448126862 3 8 10 16 38
52



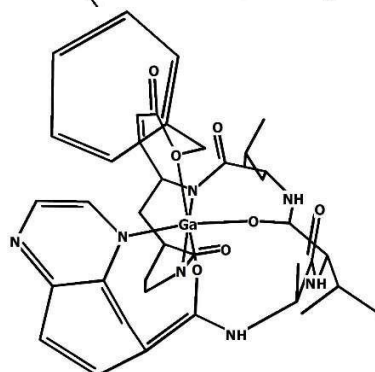
Complejo32 0.035589890903 3 8 10 16 39
51



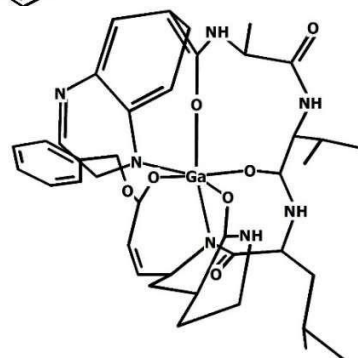
Complejo33 0.228449704485 5 16 20 31 39
52



Complejo34 0.155571505971 5 16 20 32 39
52



Complejo35 0.117996170388 5 16 23 32 38
51



4.4 Docking molecular de moléculas metaladas

En este punto se presentó una dificultad al tratar de realizar el docking de los complejos, al ser ingresadas al software con la geometría presentada anteriormente, el software Schrödinger reconocía a las moléculas, pero al ejecutar el programa no devolvía los valores de energía de acoplamiento, en este punto se intentaron diferentes soluciones como el ampliar el grid box porque una posibilidad era que estos complejos creados no lograsen encajar por su gran tamaño, otro punto que se modificó a fin de que se pudiera ejecutar correctamente fue que, observando algunos complejos generados se percató que algunos de ellos tenían hidrógenos orientados en la misma dirección que el enlace coordinado nitrógeno-metal central, por lo cual se tomó la decisión de retirarlos para poder conseguir complejos mejor coordinados, más estables y con un mejor acoplamiento con la proteína, y es que dependiendo del pH del cuerpo humano estos complejos podrían estar desprotonados justamente. Por ello se consideraron ambas posibilidades y se crearon complejos adicionales, para adicionarlos a los inicialmente creados, tal como lo resume la Tabla 12.

Tabla 12.

Lista de complejos con H interferentes y nuevos complejos adicionados retirando estos H

Complejos que presentaban H interferentes en la misma orientación que el enlace coordinado N-ión metálico				Complejos adicionados generados retirando los H interferentes.			
Complejo1	Complejo3	Complejo4	Complejo5	Complejo1*	Complejo3*	Complejo4*	Complejo5*
Complejo7	Complejo8	Complejo12	Complejo13	Complejo7*	Complejo8*	Complejo12*	Complejo13*
Complejo14	Complejo15	Complejo16	Complejo17	Complejo14*	Complejo15*	Complejo16*	
Complejo18	Complejo19	Complejo20	Complejo21	Complejo17*	Complejo18*	Complejo19*	
Complejo22	Complejo23	Complejo24	Complejo25	Complejo20*	Complejo21*	Complejo22*	
Complejo26	Complejo27	Complejo28	Complejo29	Complejo23*	Complejo24*	Complejo25*	
				Complejo26*	Complejo27*	Complejo28*	

Complejo30	Complejo31	Complejo32	Complejo33	Complejo29*	Complejo30*	Complejo31*
Complejo34	Complejo35			Complejo32*	Complejo33*	Complejo34*
				Complejo35*		

La Figura 68 (Complejo35) representa los antes mencionado, donde como se aprecia el hidrógeno enlazado al nitrógeno podría ser un interferente para la correcta coordinación al metal central.

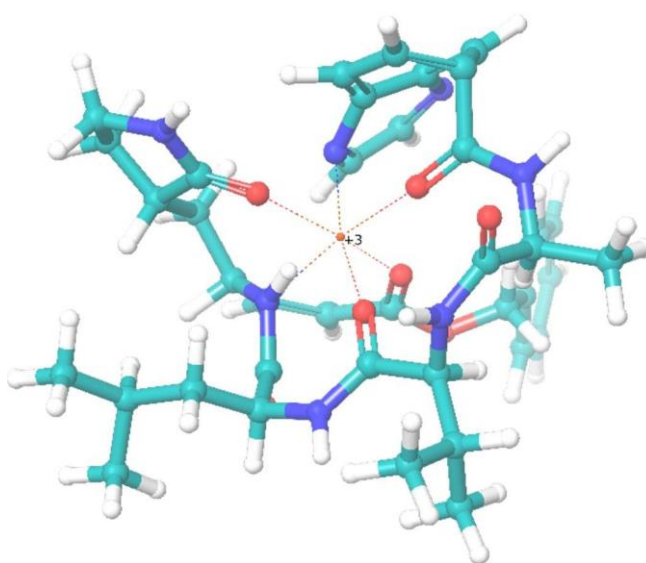


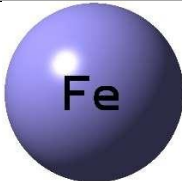

Figura 68. Complejo35-interferencia por parte de un H enlazado a un N justamente en la dirección de la coordinación con el centro metálico.

Sin embargo, aun así, el software no reconoció al galio y esto es porque posiblemente no es encuentre correctamente parametrizado al menos en la versión con la cual se encuentra trabajando. Por lo cual en este punto se trabajó con una sonda inorgánica (intercambiando el átomo de Ga por el de Fe) para poder conocer toda la naturaleza del entorno de coordinación de los complejos de Ga y ver las posibles interacciones de la proteína con el complejo, esta sonda inorgánica consiste en intercambiar un ión por otro con la finalidad de obtener información respecto a propiedades óptimas, magnética, etc. Esto se justifica porque tanto el

Ga (III) como el Fe (III) presentan un comportamiento químico similar en términos de carga eléctrica, diámetro de iones, número de coordinación, afinidad electrónica, tendencia a formar enlaces iónicos, potencial de ionización y configuración electrónica. Algunos de estos parámetros se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13.

Comparaciones entre el Fe (III) y Ga (III) para justificar la sonda inorgánica

Lista de parámetros	Fe (III)	Ga (III)
Radio iónico de Ga (III) y Fe (III) (Å) N.C = 6	 0.65 alto spín 0.55 bajo spín	 0.62
Afinidad de Ionización	30.65 eV	30.71 eV
Acidez según Pearson	Ácido duro	Ácido duro
Preferencia a bases de Lewis	Oxígeno, Nitrógeno	Oxígeno, Nitrógeno

Fuente: Adaptado de (Chitambar, 2016; Huayhuaz et al., 2017; Kandanapitiye et al., 2016; Kircheva & Dudev, 2021; Li, Liu, Huang, & Yang, 2022)

El hecho de considerar los 2 casos (moléculas protonadas con el H interferente en el enlace N-ión metálico y aquellas en las que se le retiró) se vio reflejado en una ligera mejora de los docking score, la lista completa de complejos con sus docking score se ve en la Tabla 14.

Tabla 14.*Lista de complejos después del Docking con sus respectivos Docking Score y SMILES*

Nombre	SMILES	Docking Score (Kcal mol ⁻¹)
Complejo30*	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@H]([N-]C(=O)[C@@H]([N-]C(=O)[C@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-5.846
Complejo28*	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H]([N-]C(=O)[C@H]([N-]C(=O)[C@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@H](C[C@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-5.729
Complejo7*	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@H](C[C@@H]1CC[N-]C1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-5.639
Complejo1*	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@H](C[C@@H]1CC[N-]C1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-5.558
Complejo8*	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H]([N-]C(=O)[C@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-5.262
Complejo28	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@H](C[C@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-5.107
Complejo2	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C</chem>	-4.950

	(C)C(=O)N[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O) /C=C\C(=O)OCc1cccc1	
Complejo24*	[Fe+3].CC(C)C[C@H]([N-]C(=O)[C@H](NC(=O) [C@H](C)[N-]C(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@@H] (C[C@@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1cccc1	-4.877
Complejo23	[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O) [C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O) N[C@@H](C[C@@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OC c1cccc1	-4.797
Complejo7	[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C @@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N [C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1 cccc1	-4.731
Complejo5*	[Fe+3].CC(C)C[C@H]([N-]C(=O)[C@@H](NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)c1cc c2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]1 CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1cccc1	-4.602
Complejo31*	[Fe+3].CC(C)C[C@@H]([N-]C(=O)[C@H]([N-]C(=O)[C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C) C)C(=O)NC(C[C@H]1CC[N-]C1=O)/C=C\C(=O)OCc1cccc1	-4.446
Complejo8	[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H](NC(=O) [C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C (=O)N[C@@H](C[C@@H]1CCNC1=O)/C=C/C (=O)OCc1cccc1	-4.427
Complejo6	[Fe+3].CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C @@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)	-4.410

	<chem>N[C@@H](C[C@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	
Complejo23*	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H]([N-]C(=O)[C@@H]([N-]C(=O)[C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@@H](C[C@H]1CC[N-]C1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-4.308
Complejo1	<chem>[Fe+3].CC(C)C[C@@H](NC(=O)[C@H](NC(=O)[C@@H](C)NC(=O)c1ccc2nccnc2c1)C(C)C(=O)N[C@H](C[C@H]1CCNC1=O)/C=C\C(=O)OCc1ccccc1</chem>	-4.270

En este punto se procedió a evaluar la Regla de Lipinski muy empleada en la Química Medicinal en el desarrollo de fármacos. Se optó por un servidor web abierto “TargetNet” (<http://targetnet.scbdd.com/home/index/>) y gratis el cual se usa para múltiples fines como predecir la unión de moléculas a blancos proteicos, así como predecir la actividad de una molécula en diferentes proteínas humanas.

Este servidor también ofrece la opción de subir hasta un máximo de 5000 moléculas a la vez para el análisis lo que facilitó el procedimiento al subir solo un archivo con las moléculas de interés dentro de este en formato SMILES (.smi) (Yao et al., 2016). El resumen de los parámetros obtenidos al evaluar la Regla de Lipinski en los complejos se presenta en la Tabla 15.

Tabla 15.*Resumen de parámetros obtenidos al evaluar la Regla de Lipinski para los complejos*

Molécula	Peso	HDB	HBA	logP	Regla de
	Molecular	(donador-H)	(Aceptor-H)		Lipinski
Complejo31*	780.67024	2	15	5.1925	25.00 %
Complejo23*	780.67024	2	16	5.1925	25.00 %
Complejo28*	781.67818	3	17	5.4067	25.00 %
Complejo30*	781.67818	3	17	5.4067	25.00 %
Complejo24*	781.67818	3	17	5.4067	25.00 %
Complejo8*	782.68612	4	18	5.0135	25.00 %
Complejo5*	782.68612	4	18	5.0135	25.00 %
Complejo1*	782.68612	4	18	4.4061	50.00 %
Complejo7*	782.68612	4	18	4.4061	50.00 %
Complejo23	783.69406	5	19	4.6203	25.00 %
Complejo8	783.69406	5	19	4.6203	25.00 %
Complejo1	783.69406	5	19	4.6203	25.00 %
Complejo2	783.69406	5	19	4.6203	25.00 %
Complejo7	783.69406	5	19	4.6203	25.00 %
Complejo28	783.69406	5	19	4.6203	25.00 %
Complejo6	783.69406	5	19	4.6203	25.00 %

Si bien no se aprecia algún complejo que satisfaga completamente la Regla de Lipinski, este era un resultado que se esperaba, principalmente por el tamaño grande de las moléculas con los que se ha estado trabajando, sin embargo, aun así, es un indicador muy importante a considerar. Lo que se puede apreciar de los cálculos realizados es que hay coherencia respecto a los 2 complejos que en su mayoría cumplen la Regla de Lipinski (Complejo1* y Complejo7*) ya que estos se encuentran entre los primeros complejos que han obtenido mejor puntuación en cuanto a docking score.

En este punto se presenta algunos complejos (los que han obtenido mejor docking score), lo resaltante a mencionar es que en general se han disminuido en general las interacciones con el entorno proteico, lo cual se ha reflejado en la disminución de las interacciones con los aminoácidos cercanos así como las interacciones puente hidrógeno, si bien no se precian la formación de interacciones puente hidrógeno, la mayor estabilidad por parte de los complejos al poseer enlaces coordinados más fuertes con los nitrógenos y oxígenos y el hierro como ión central proporciona mejores docking score en comparación de aquellos complejos que presentaban hidrógenos interferentes orientados justamente en la posición de coordinación. En las siguientes imágenes (Figuras 69-72) se pueden apreciar con más detalle todas las interacciones presentadas junto con sus respectivas leyendas y símbolos correspondientes. Adicionalmente el diagrama de interacciones de las restantes moléculas (considerando las 10 moléculas con mejores puntuaciones) se presenta en el ANEXO 3, sección B.

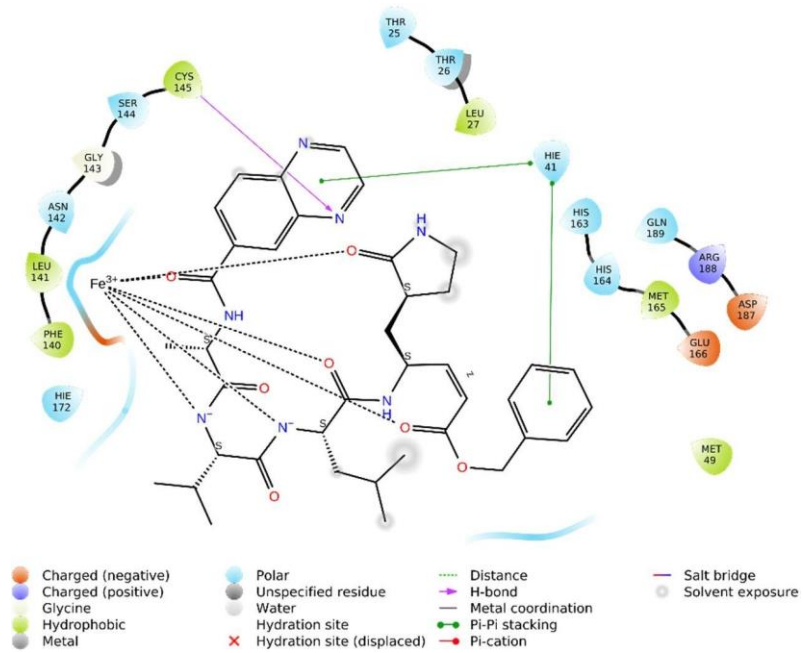


Figura 69. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo30* con M^{pro} .

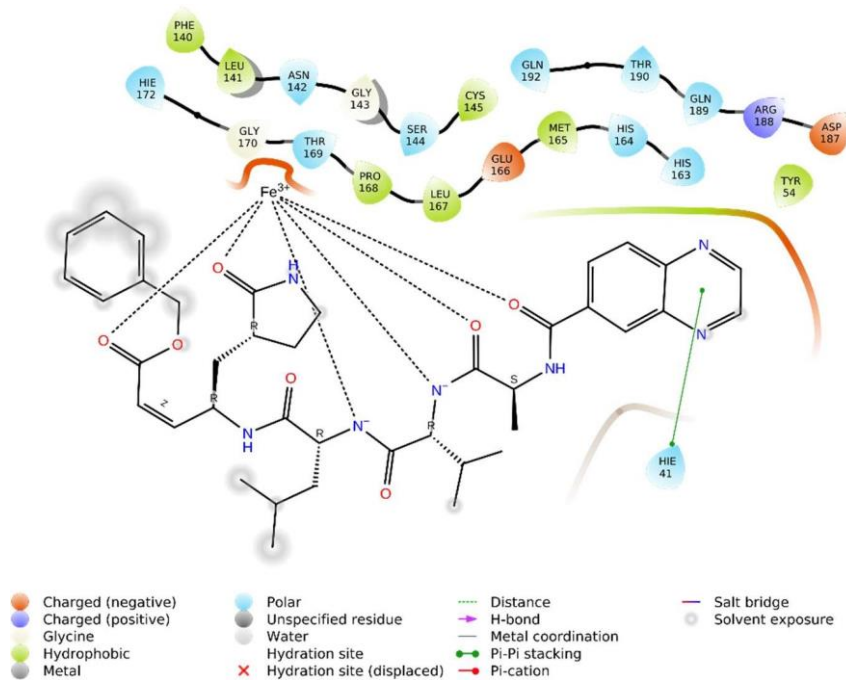


Figura 70. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo28* con M^{pro} .

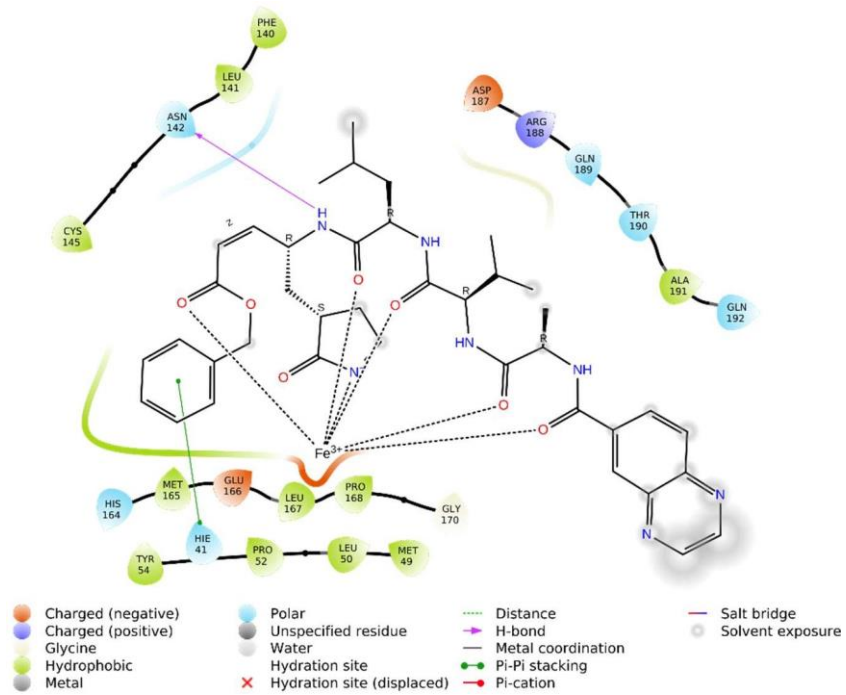


Figura 71. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo7* con M^{pro} .

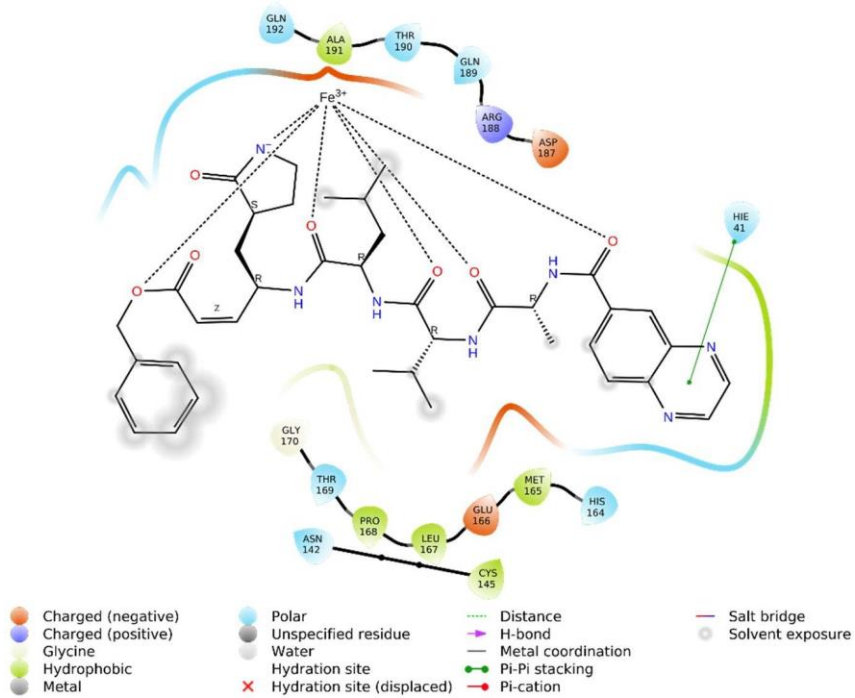


Figura 72. Diagrama 2D de las principales interacciones del Complejo 1* con M^{pro} .

Además de los diagramas de interacciones de los complejos, se obtuvo otros parámetros importantes de los complejos, en total se obtuvieron 237 descriptores moleculares para cada complejo (61 en total, algunos son mostrados en la Figura 73) que se ejecutó en Schrödinger.

```
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
df = pd.read_excel("./tabla2propiedadescomplejos.xlsx")
df
```

	Title	docking score	glide ligand efficiency	glide ligand efficiency sa	glide ligand efficiency ln	XP GScore	glide gscore	glide evdw	glide ecoul	glide energy	...	res:A26 vdw	res:A26 coul	res:A26 hbond	res:A26 dist	res:A26 Eint
0	com30prima	-5.846	-0.108	-0.409	-1.172	-5.846	-5.846	-50.352	-0.960	-51.312	...	-0.902	-0.383	0	3.290	-1.286
1	com28prima	-5.729	-0.106	-0.401	-1.148	-5.729	-5.729	-45.688	-4.532	-50.220	...	-0.033	-0.156	0	8.407	-0.189
2	com7prima	-5.639	-0.104	-0.395	-1.130	-5.639	-5.639	-45.460	-7.533	-52.993	...	-0.035	-0.324	0	8.710	-0.359
3	com1prima	-5.558	-0.103	-0.389	-1.114	-5.558	-5.558	-47.658	-2.483	-50.141	...	-0.025	-0.224	0	8.650	-0.249
4	com8prima	-5.262	-0.097	-0.368	-1.055	-5.262	-5.262	-45.068	-5.691	-50.759	...	-0.447	-0.433	0	4.115	-0.879
...
56	com16	1.298	0.024	0.091	0.260	1.298	1.298	-31.737	-8.597	-40.334	...	-0.058	-0.358	0	7.258	-0.416
57	com31	1.553	0.029	0.109	0.311	1.553	1.553	-46.452	-8.632	-55.084	...	-0.998	-0.577	0	3.141	-1.575
58	com29	2.508	0.046	0.176	0.503	2.508	2.508	-21.826	-6.863	-28.688	...	-2.844	-1.129	0	2.808	-3.973
59	com16prima	3.057	0.057	0.214	0.613	3.057	3.057	-24.637	-8.410	-33.047	...	-1.869	-0.417	0	2.223	-2.286
60	com29prima	5.064	0.094	0.354	1.015	5.064	5.064	-20.943	-6.017	-26.960	...	-1.476	-0.167	0	2.483	-1.643

61 rows x 237 columns

Figura 73. Visualización de descriptores moleculares de los complejos.

Se exportaron todos los descriptores moleculares del programa Schrödinger para posteriormente tratarlos en el entorno de Google Colaboratory, donde se importaron diferentes librerías de Python, tales como Pandas (<https://pandas.pydata.org/docs/>), Matplotlib (<https://matplotlib.org/stable/index.html>) y Seaborn (<https://seaborn.pydata.org/>).

Se proporciona el link directo a los datos obtenidos posterior al docking molecular de los complejos, además del archivo .ipynb que se puede visualizar en Google Colaboratory

donde se explica detalladamente el código empleado en la presente trabajo de tesis profesional:

<https://drive.google.com/drive/folders/1sGpTZJ0FCFL3VuVDBTUfEq8BQB1Af6pA?usp=sharing>

Del mismo modo se proporciona el código QR para la adquisición de los datos en caso se desee manipular o reproducir los resultados de este proyecto (Figura 74).



Figura 74. Código QR para la adquisición de datos.

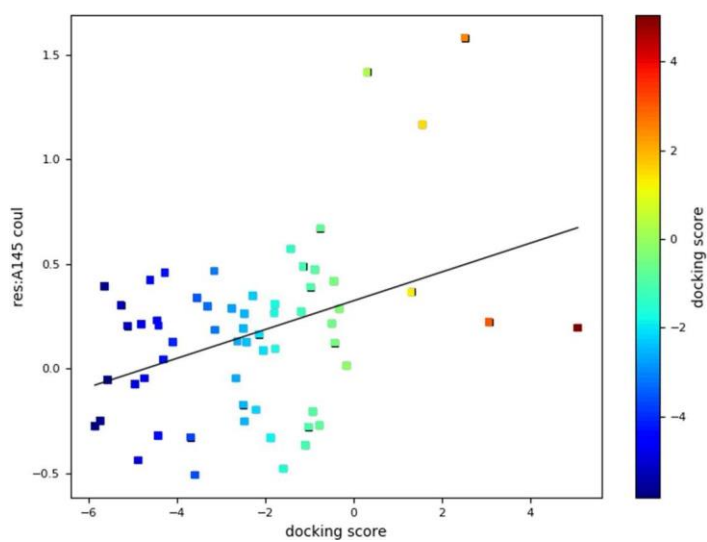


Figura 75. Scatterplot del Cys145coul relacionada con el docking score.

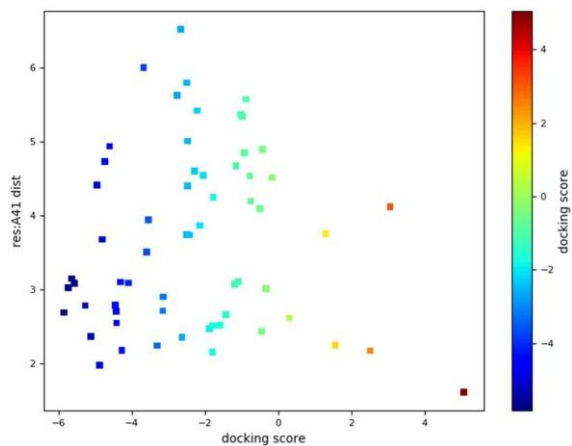


Figura 76. Scatterplot del Cys145dist relacionada con el docking score.

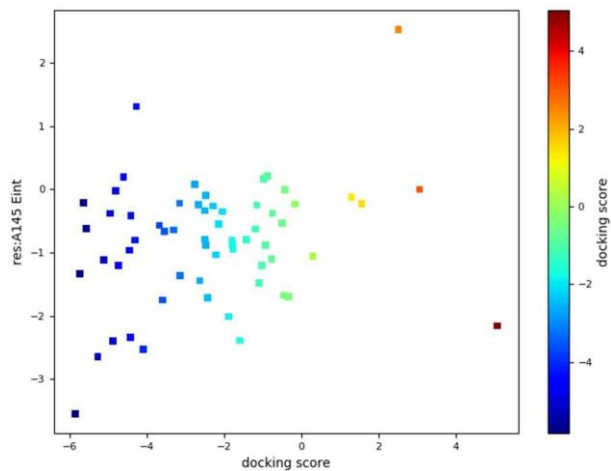


Figura 77. Scatterplot del Cys145Eint relacionada con el docking score.

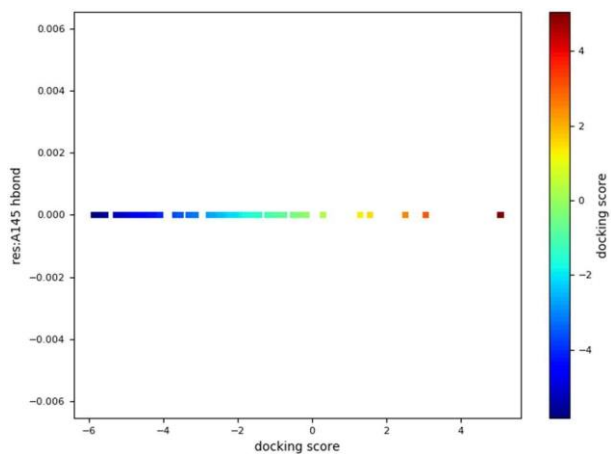


Figura 78. Scatterplot del Cys145hbond relacionada con el docking score.

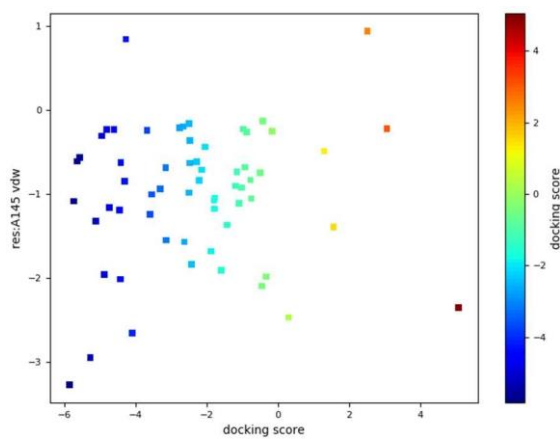


Figura 79. Scatterplot del Cys145vdw relacionada con el docking score.

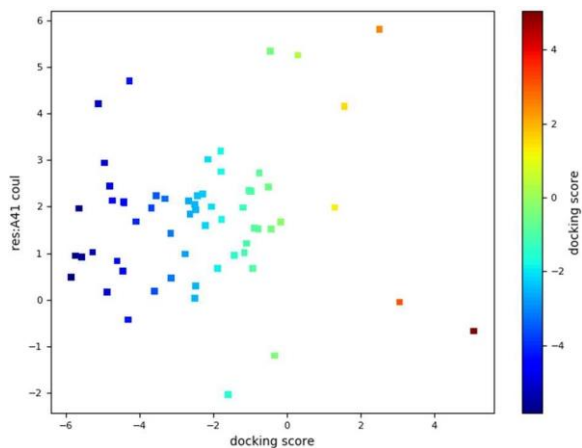


Figura 80. Scatterplot del His41coul relacionada con el docking score.

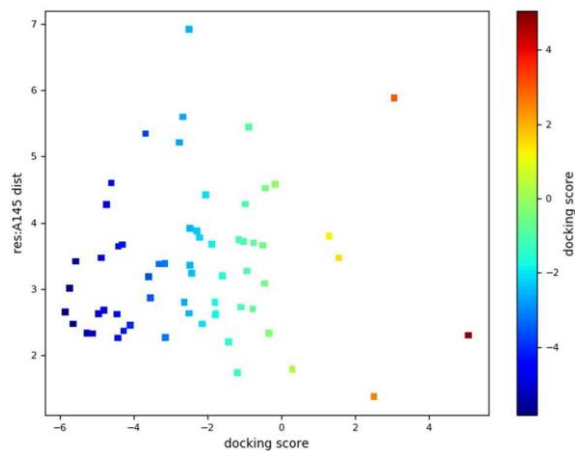


Figura 81. Scatterplot del His41dist relacionada con el docking score.

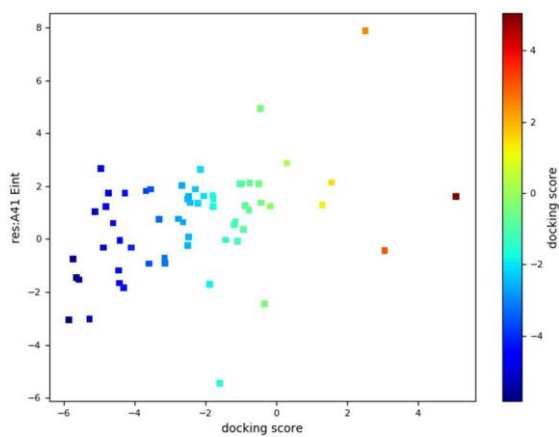


Figura 82. Scatterplot del His41Eint relacionada con el docking score.

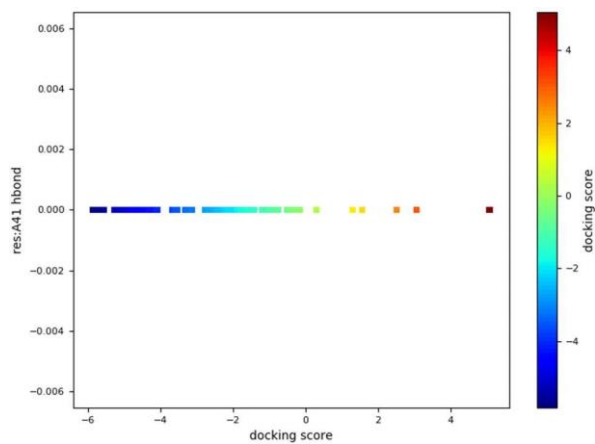


Figura 83. Scatterplot del His41hbond relacionada con el docking score.

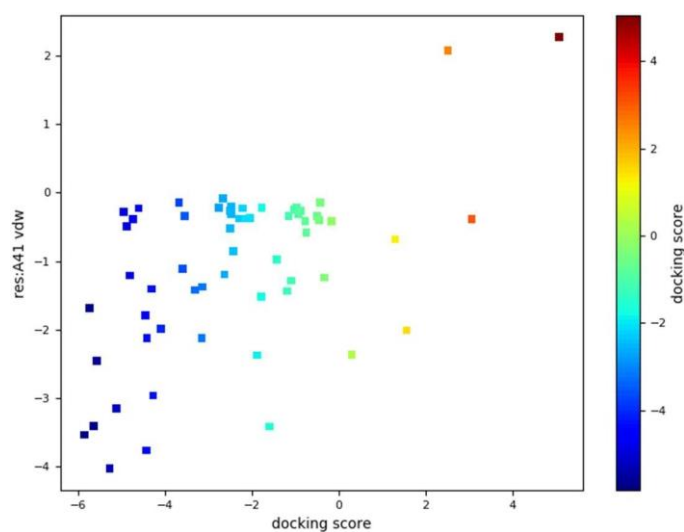


Figura 84. Scatterplot del His41coul relacionada con el docking score.

Otros descriptores importantes obtenidos fueron los referidos a los aminoácidos del entorno catalítico y sus alrededores, para una distancia de 10-12 Å. Se obtuvieron energías de tipo electrostáticas “coul”, de distancias “dist”, de interacción “Eint”, de Van der Walls “vdw” y de tipo puente hidrógeno “hbond”. Se podría realizar un análisis de todos los aminoácidos obtenidos pero la visualización de la distribución de puntos obtenidos se centró en la diada catalítica His41 y Cys145 como se muestra a continuación en las Figuras 75-84. Todas las gráficas presentadas anteriormente representan un scatterplot de los valores de afinidad de los aminoácidos Cys145 y His41 que presentaron los complejos al evaluarse el docking molecular. Como se observa la Figura 75, el comportamiento de los valores tiene a ser negativos en su mayoría, como máximo se acercan al valor de -6 kcal mol^{-1} (siendo el máximo valor negativo de $-0.51 \text{ kcal mol}^{-1}$). Solo 6 complejos obtuvieron afinidades para sus aminoácidos de Cys145 con valores positivos. Se presenta en imagen una recta con ecuación de recta ($y= 0.07x + 0.32$, $R^2 = 0.15$) la cual solo se presenta de manera demostrativa para resaltar la importancia de la manipulación grandes cantidades de información obtenida ya sea

de manera experimental o teórica. Si se obtuviese una mayor cantidad de datos se podría tratar de correlacionar mediante un modelo matemático 2 variables (tomados de los descriptores moleculares obtenidos y mencionados anteriormente) y hacer predicciones. Sin embargo, la cantidad de valores en este caso no es suficiente para tratar de hacer predicciones además de que el valor de R^2 es demasiado bajo para afirmar que existe una correlación lineal. Como se observa en los restantes scatterplots no existe ningún indicio que indique que haya algún tipo de relación.

En la gran parte de los casos se aprecia que las energías obtenidas de tipo electrostáticas “coul”, de distancias “dist”, de interacción “Eint” y de Van der Walls “vdw” aportan a la estabilidad del complejo en el sitio catalítico, sin embargo las interacciones de tipo puente hidrógeno “hbond” no tienen gran importancia en la estabilidad de los complejos, pues presentan una tendencia lineal justamente ubicada en el punto 0, lo que indica que no existe presencia de este tipo de interacción en los complejos. En este punto se pueden realizar comparaciones entre estos 2 residuos de aminoácidos y ver qué interacción prevaleció en general en ambos casos.

Por ejemplo, al comparar las interacciones de tipo “coul” entre los 2 aminoácidos notamos que se presenta una mayor distribución o tendencia de puntos agrupadas hacia la zona inferior del aminoácido His41 a comparación del aminoácido Cys145, y esto podemos notar viendo la escala en la zona izquierda de los gráficos, ya que el residuo His41 tiene rango de interacción “coul” entre (-0.5; 1.5 kcal mol⁻¹) y la Cys145 abarca desde (-2; 6 kcal mol⁻¹). Específicamente hay 2 complejos con una mejor interacción “coul” que son el Complejo25* (-1.198 kcal mol⁻¹) y el Complejo26* (-2.039 kcal mol⁻¹) de esta manera podemos responder comparativamente a las tendencias de afinidades que presentan estos aminoácidos además de a simple vista dar razones del porqué no se han obtenido grandes puntuaciones de

acoplamiento, y esto es justamente porque las interacciones de tipo puente de hidrógeno no han aportado ese plus para hacer que se consiga una mejor interacción.

Para continuar analizando las interacciones de los complejos obtenidos, resulta importante comprender qué tan bien estas moléculas se complementan al receptor proteico, así como a regiones adyacentes que podrían promover la unión. Se empleó otra herramienta proporcionada por el software Schrödinger llamada “SiteMap”, una de las funcionalidades que proporciona es, que cuando no se conoce la ubicación de un sitio para las interacciones proteína-ligando o proteína-proteína, esta herramienta puede ayudar a sugerir sitios de unión probables donde una proteína se una a ligandos estrechamente. SiteMap genera información acerca del carácter de los sitios vinculantes empleando funciones de búsqueda y análisis y le brinda información al software para que estos sitios se logren visualizar. En este caso se empleará para conocer mejor el entorno de los 6 mejores complejos obtenidos.

SiteMap proporcionó 5 sitios como puntos probables para las interacciones proteína-ligandos; para cada caso se obtuvo un “SiteScore” (una puntuación para conocer qué sitio presenta mayor probabilidad de interacción), “Size” (que representa el tamaño del sitio en Å), “Dscore” (drugscore, que indica posibilidad del sitio para ser inhibida por un posible fármaco) y “Volume” (que representa el volumen del sitio en Å³), todos los parámetros obtenidos por SiteMap se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16.

Parámetros obtenidos al evaluar SiteMap

Sitios	SiteScore	Size (Å)	Dscore	Volume (Å ³)
Sitemap_1	1.037340	111	1.092158	271.999000
Sitemap_2	0.674508	32	0.473410	111.818000
Sitemap_3	0.633078	37	0.574807	116.963000
Sitemap_4	0.617417	27	0.580414	71.687000
Sitemap_5	0.495157	22	0.446635	49.049000

En la Figura 85 se presenta la superficie molecular de la proteína donde se presentan los 5 sitios que SiteMap ha reconocido con diferentes colores (amarillo, rojo y azul).

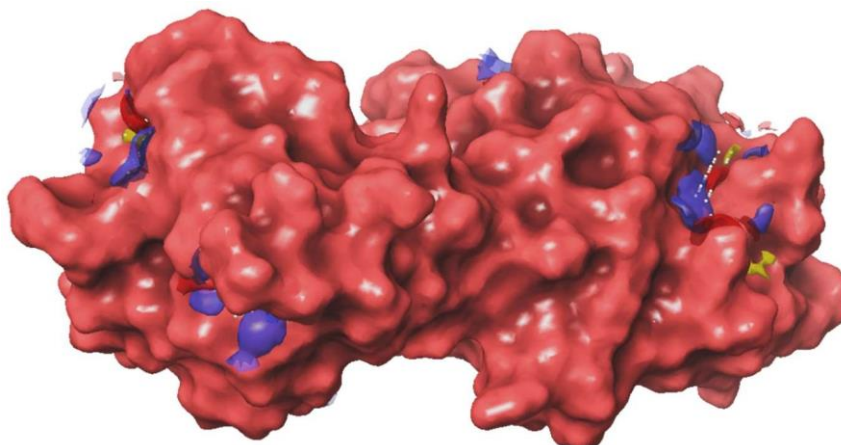


Figura 85. Sitios reconocidos por SiteMap en la superficie molecular de la proteína M^{pro} .

SiteMap trabaja con 3 regiones (región hidrofóbica: color amarillo; región donante del enlace H del ligando: color azul; región aceptora del enlace H del ligando: color rojo). El sitio "Sitemap_1" presentó un mayor volumen a comparación de los restos, y es justamente donde se encuentra la diada catalítica de M^{pro} , además de ser el sitio donde se acoplaron todos los complejos. Se empleó SiteMap con la finalidad de visualizar los mapas de sitio que nos muestran explícitamente la forma y extensión de las regiones filicas y fóbicas. Este análisis se realizó solo para los complejos que presentaron mejor acoplamiento con M^{pro} (Complejo30*, Complejo28*, Complejo7*, Complejo1*, Complejo8*, Complejo28).

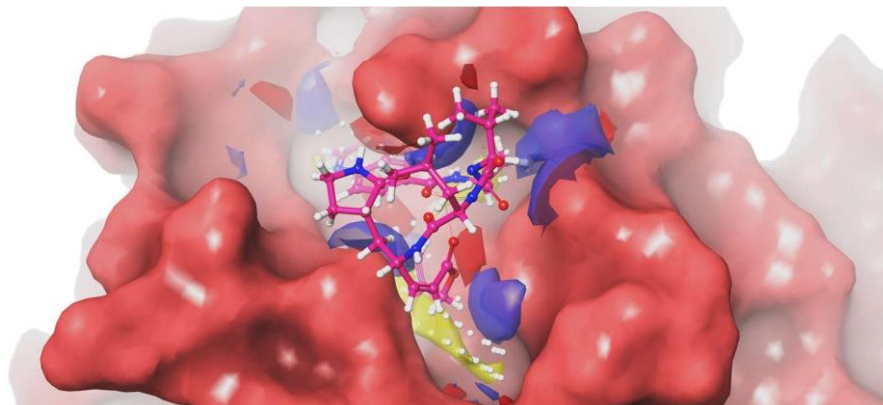


Figura 86. Complejo30* acoplado en el pocket Sitemap_1.

Como se aprecia en la Figura 86, los mapas color azul son los que destacan más en dicho pocket, lo que evidencia la importancia de dichas regiones en el acoplamiento además de decirnos que en esas zonas se debieron priorizar las interacciones puente de hidrógeno por parte del complejo hacia la proteína. Cabe también destacar que si bien el sitio “Sitemap_1” presenta un mayor volumen, además de una mayor puntuación “SiteScore”, esto no indica que el 100% de las veces el acoplamiento se llevará por este lugar, porque como se ha presentado existen regiones adicionales que también influirán en la mejor interacción complejo-proteína pues al ser un sistema dinámico por más pequeño que sea el cambio que pueda ocurrir en los sitios, por ejemplo estos complejos podrían inducir un plegamiento de la proteína o una desnaturalización estructural en dichos sitios, lo que repercutirá en el comportamiento de sus adyacentes, podría ocasionar que se favorezca la actividad inhibitoria o por el contrario sea un efecto perjudicial.

El resto de las representaciones con los complejos: Complejo28*, Complejo7*, Complejo1*, Complejo8* y Complejo28 se presentan en el ANEXO 3, sección C.

4.5 Dinámica Molecular

El parámetro más conocido al analizar la dinámica molecular de inhibidores frente a un blanco resulta ser la desviación cuadrática media (RMSD), empleada para medir el cambio promedio de un conjunto de átomos para un frame (marco) específico de la trayectoria, respecto a un frame de referencia, este cálculo se realiza empleando todos los frames de la trayectoria de la dinámica molecular, y para un frame en específico se calcula como:

$$RMSD_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}))^2}$$

N = Número de átomos

t_{ref} = Tiempo de referencia/usualmente el primer frame ($t=0$)

r' = Posición de los átomos seleccionados en el frame x , después de superponerse con el frame de referencia

Figura 87. Concepto de RMSD en dinámica molecular.

Las simulaciones se llevaron a cabo para los Complejo1* y Complejo7*, empleando el Ga como centro metálico, donde para el caso del Complejo7*, este no resultó estable en el tiempo, ya que en los 100 ns de simulación, dejaba el sitio catalítico, por ello se presenta en esta sección el análisis del Complejo1* que resultó estable en el tiempo. La Figura 87 muestra el RMSD de la proteína en unidades de ángstrom (Å), para un tiempo de simulación de 100 nanosegundos, que resulta ser suficientes para ver la estabilidad del complejo ligando-receptor que proviene del docking, solo se buscó información sobre la estabilidad, sin embargo, si se deseara obtener información de cambios estructurales en la proteína seguramente se necesiten simulaciones mucho más largas (en el rango de 1000 ns a más), en este caso en

particular no se deseó dicho análisis. El RMSD en la parte izquierda (líneas de azul) es el de la proteína respecto al ligando, cómo se mueve uno respecto al otro.

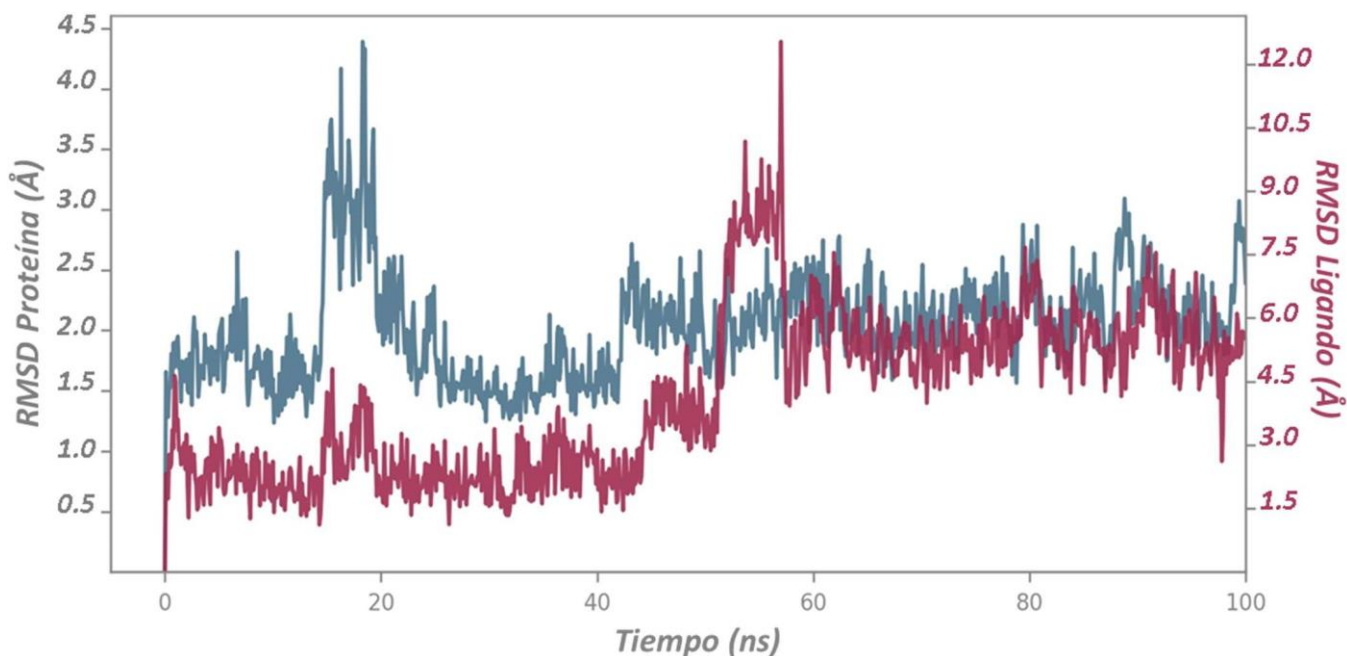


Figura 88. RMSD del ligando y proteína.

Lo ideal que se esperaría obtener son valores de RMSD bajos, que se asocian con la estabilidad, se observa en la gráfica que el movimiento de manera general se mantiene estable, si bien se aprecia un salto en la gráfica del RMSD la proteína (color azul) en el tiempo 20 ns (200 frames) aproximadamente, este movimiento es realmente pequeño, porque su escala está en ángstroms, además de que un valor menor a 1 nm de RMSD todavía se asocia un movimiento pequeño, sin embargo esto no quiere decir que este sea un valor de referencia o estándar, sin embargo, suponiendo se observasen picos que llegasen a 2 nm o sobrepasasen este valor, entonces seguramente se debería de revisar la dinámica molecular nuevamente, cosa que no es el caso. Este pico puede asociarse con un giro del complejo dentro del sitio de unión o un pequeño salto para reacomodarse, además se observa que

pasado el frame 200, se reduce el pico, es decir, el complejo es muy poco probable que haya salido a otras zonas de la proteína, porque cuando se salen los ligandos, se aprecian picos muy exagerados, más altos de los observados ahora, tener presente que el comportamiento de los ligandos es muy variable, en unas ocasiones puede permanecer en el sitio de unión, y en otras sale y se reubica en un sitio que estabiliza al ligando, cosa que sucede con muchas enzimas. También se aprecia que posteriormente se mantiene una estabilidad en los valores de RMSD, lo que indica que la simulación ha convergido y se ha equilibrado el sistema. Para el caso de las líneas de RMSD de rojo, estas indican qué tan estable es el ligando respecto a la proteína y el sitio de unión, En el gráfico anterior, se muestra el RMSD de un ligando cuando el complejo proteína-ligando se alinea primero con la proteína de la referencia (frame 1, $t = 0$) y luego se mide el RMSD de los átomos pesados del ligando. Al observar que los valores observados de RMSD del ligando, no superan ligeramente a los de la proteína, entonces se puede afirmar que el ligando aún se conserva en su sitio de unión, lo que desde luego se corresponde con la visualización de la simulación en el tiempo.

Conclusiones

- Se elaboró una base de datos (biblioteca virtual de estructuras) a partir de modificaciones estructurales del inhibidor N3 de la proteasa M^{pro} empleando fragmentos bioisostéricos de la base de datos SwissBioisostere (ligandos) de donde resultó un total de 11493 moléculas.
- Se ejecutó el virtual screening (cribado virtual) del blanco M^{pro} con la biblioteca virtual de ligandos creada empleando el supercomputador MANATÍ, obteniendo 41 moléculas con mejor docking score superiores a $-6.9 \text{ kcal mol}^{-1}$, de donde 6 moléculas al examinarlas no presentaron una estructura química adecuada. A pesar de volver a prepararlas nuevamente, una continuó presentando una estructura química inadecuada y las 5 restantes no alcanzaron la puntuación necesaria a superar.
- Se realizó el docking covalente y no covalente para las moléculas con mejor puntuación obtenidas del virtual screening en MANATÍ, donde el criterio de distinción se hizo en base a la presencia del grupo cetona α, β insaturado para las moléculas que se enlazaron covalentemente a N3. De donde se obtuvo 17 moléculas con mejor docking score en comparación de la puntuación del acoplamiento con N3 ($-7.038 \text{ kcal mol}^{-1}$).
- Se generaron en total 35 complejos de Ga a partir del ligando que mejor puntuación obtuvo ($-11.592 \text{ kcal mol}^{-1}$, Molécula1) al cual se le coordinó con el Ga por diferentes puntos de coordinación con la finalidad de conseguir una geometría octaédrica. Además de calcularse con el software XTB las energías entre el HOMO-LUMO (HOMO-LUMO gap) a fin de comprobarse la estabilidad de los complejos generados.
- Para realizar el docking molecular de los complejos obtenidos se presentaron problemas con el Ga (II) por no encontrarse parametrizado en Schrödinger por lo que

se realizó una sonda inorgánica con el Fe (III) para simular el entorno de los complejos de Ga (III)

- Los resultados indicaron una clara disminución en la afinidad de interacción de los complejos a comparación de los ligandos solos, esto se evidenció tanto mediante la evaluación de la regla de Lipinski, los diagramas de interacciones y los diagramas de Scatterplot elaborados en Google Colaboratory para la diada catalítica Cys-His.
- Finalmente se empleó la herramienta de Schrödinger “SiteMap” para continuar analizando y comprender qué tan bien estas moléculas se complementan al receptor proteico, así como a regiones adyacentes que podrían promover la unión.
- Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron para el Complejo7* y Complejo1*, descartando el primero por no ser estable en el tiempo de simulación (100 ns), donde el Complejo1* resultó ser más estable y considerándose como posible candidato óptimo a inhibir la proteasa M^{pro}.

Recomendaciones

- Con el creciente surgimiento en la investigación de fármacos covalentes, resulta importante la comprensión computacional del acoplamiento covalente (covalent docking), por ello es recomendable no solo enfocarse en el docking tradicional que considera las interacciones intermoleculares de manera no covalente, de esta manera se conseguirá abordar fármacos más específicos y con mayor capacidad de inhibición, justamente por poseer ojivas covalentes (warheads).
- Las interacciones presentadas en los estudios de docking para una proteína-ligando, nos dan una idea o bosquejo con qué trabajar y no debe verse como un estudio definitivo. Estos deben ser complementados con otros estudios como la dinámica molecular, para garantizar una unión estable, pero adicionalmente hay trabajos que utilizan posterior a los estudios antes mencionados, estudios volumétricos, estudios de deshidratación que proporcionan información sobre si se altera o no la actividad biológica de la proteína, que al final es lo que buscan los estudios de docking molecular.
- Normalmente el realizar un estudio empleando docking covalente resulta en muchos casos difícil de trabajar con un software gratuito. En el caso del software Schrödinger, este trabaja con un sistema de identificación de reacciones para identificar cual se produce para que el ligando se enlace con la proteína. En este caso resulta muy importante conocer cuál es el tipo de reacción, por ello se recomienda consultar diferentes fuentes antes de ejecutar el acoplamiento ligando-blanco.
- Al metalar los ligandos con galio, o en general con algún metal de interés, el software molSimplify te proporciona la estructura que considera más estable, basándose en una base de estructuras que tiene en su base de datos, y no mediante la optimización de

un campo de fuerza. Se recomienda trabajar con estas estructuras pues el optimizarlas empleando algoritmos de química cuántica tardarían un tiempo considerable.

- En este trabajo se ha empleado una sonda inorgánica reemplazando el átomo de Ga por Fe porque principalmente se ha trabajado con el software Schrödinger, sin embargo, otra opción pudo ser emplear otro software como AutoDock, la dificultad radica en la parametrización del átomo y los enlaces. Eso ya correspondería a otro trabajo comparando los resultados de los diferentes softwares.

Referencias Bibliográficas

- [1]. Abdelaal Ahmed Mahmoud M. Alkhatip, A., Georgakis, M., Montero Valenzuela, L. R., Hamza, M., Farag, E., Hodgkinson, J., ... Elramely, M. A. (2021). Metal-bound methisazone; novel drugs targeting prophylaxis and treatment of sars-cov-2, a molecular docking study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms22062977>
- [2]. Amamuddy, O. S., Verkhivker, G. M., & Bishop, Ö. T. (2020). Impact of early pandemic stage mutations on molecular dynamics of SARS-CoV-2 MPro. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(10), 5080-5102. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00634>
- [3]. Azcárate, M. (2018). Investigación documental: Importancia de la biodisponibilidad en el proceso de desarrollo de medicamentos (Vol. 53).
- [4]. Ballón, W., & Grados, R. (2019). Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Con Ciencia*, 7(2), 55-72. Retrieved from <http://farbio.edu.bo/csegc/conciencia/index.php/ojs/article/view/68/130%0Ahttp://farbio.edu.bo/csegc/conciencia/index.php/ojs/article/view/68>
- [5]. Bannwarth, C., Ehlert, S., & Grimme, S. (2019). GFN2-xTB - An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(3), 1652-1671. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01176>
- [6]. Baran, E. J. (2008). La nueva farmacoterapia inorgánica XIX. Compuestos de Galio. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(5), 776-779.
- [7]. Baran, E. J. (2014). Metalofármacos: una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina. *Anales Acad. Nac. de Cs. Ex., Fís. y Nat., Tomo*, 66, 5-21. Retrieved from http://www.ancefn.org.ar/biblioteca/anales/tomo_63/21.pdf
- [8]. Bernstein, L. R., & Zhang, L. (2020). Gallium maltolate has in vitro antiviral activity against SARS-CoV-2 and is a potential treatment for COVID-19. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 28, 1-4. <https://doi.org/10.1177/2040206620983780>
- [9]. Bowers, K. J., Chow, E., Xu, H., Dror, R. O., Eastwood, M. P., Gregersen, B. A., ... Shaw, D. E. (2006). Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing, SC'06*,

(November). <https://doi.org/10.1145/1188455.1188544>

- [10]. Campillo-Balderas, J. A. (2020). ¿ *Qué fue primero : los virus o las células ? Which came first : viruses or the cells ?*
- [11]. Cao, T. Q., Kim, J. A., Woo, M. H., & Min, B. S. (2021). SARS-CoV-2 main protease inhibition by compounds isolated from *Luffa cylindrica* using molecular docking. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 40(November 2020), 127972. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127972>
- [12]. Chitambar, C. R. (2016). Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(8), 2044-2053. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.027>
- [13]. Ciotti, M., Angeletti, S., Minieri, M., Giovannetti, M., Benvenuto, D., Pascarella, S., ... Ciccozzi, M. (2020). Biología del SARS-CoV-2: hacia el entendimiento y tratamiento de COVID-19. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 58, 1-19. Retrieved from <https://www.karger.com/Article/FullText/507423>
- [14]. Corum Jonathan, & Zimmer Carl. (2021). How the Pfizer-BioNTech Covid-19 Vaccine Works - The New York Times. Retrieved April 21, 2021, from <https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/pfizer-biontech-covid-19-vaccine.html>
- [15]. Covid 19 en el Perú - Ministerio del Salud. (n.d.). Retrieved July 28, 2021, from https://covid19.minsa.gob.pe/sala_situacional.asp
- [16]. De Paiva, R. E. F., Marçal Neto, A., Santos, I. A., Jardim, A. C. G., Corbi, P. P., & Bergamini, F. R. G. (2020). What is holding back the development of antiviral metallodrugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks. *Dalton Transactions*, 49(45), 16004-16033. <https://doi.org/10.1039/d0dt02478c>
- [17]. Desmond Molecular Dynamics System, version 4.2, D. E. Shaw Research, New York, N. (2015). *Desmond 4.2*.
- [18]. Díaz-Castrillón, F. J., & Toro-Montoya, A. I. (2020). SARS-CoV-2/COVID-19: el virus, la enfermedad y la pandemia. *Medicina y Laboratorio*, 24(3), 183-205. <https://doi.org/10.36384/01232576.268>
- [19]. Ebhohimen, I. E., Edemhanria, L., Awojide, S., Onyijen, O. H., & Anywar, G. (2019). Advances in computer-aided drug discovery. In *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817890-4.00003-2>
- [20]. El-hachem, N., Haibe-kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H., & Nemer, G. (2017).

AutoDock and AutoDockTools for Protein-Ligand Docking: Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1(BACE1) as a Case Study. 1598, 391-403.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4>

- [21]. Filipe, H. A. L., & Loura, L. M. S. (2022). Molecular Dynamics Simulations: Advances and Applications. *Molecules*, 27(7), 4-6. <https://doi.org/10.3390/molecules27072105>
- [22]. Fina, B. L., Lombarte, M., & Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actualizaciones En Osteología*, 9(3), 294-299.
- [23]. Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., ... Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177-6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
- [24]. Garza-Lopez, R., Kozak, J., & Gray, H. (2020). Copper(II) Inhibition of the SARS-CoV-2 Main Protease. *ChemRxiv: The Preprint Server for Chemistry*, (II), 1-13. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12673436>
- [25]. Glide, version 6.7, Schrödinger, LLC, New York, N. (2015). *Glide 6.9*.
- [26]. Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., ... Zhong, N. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708-1720. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
- [27]. hjkgrp.mit.edu | Kulik group at MIT. (n.d.). Retrieved July 3, 2021, from <http://hjkgrp.mit.edu/>
- [28]. Huayhuaz, J. A. A., Vitorino, H. A., Campos, O. S., Serrano, S. H. P., Kaneko, T. M., & Espósito, B. P. (2017). Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 41, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.01.006>
- [29]. Hussein, R. K., & Elkhair, H. M. (2021). Molecular docking identification for the efficacy of some zinc complexes with chloroquine and hydroxychloroquine against main protease of COVID-19. *Journal of Molecular Structure*, 1231. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129979>
- [30]. Ibrahim, M. A. A., Abdeljawaad, K. A. A., Abdelrahman, A. H. M., & Hegazy, M. E. F. (2020). Natural-like products as potential SARS-CoV-2 Mpro inhibitors: in-silico drug discovery. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), 1-13. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1790037>

- [31]. Ibrahim, M. A. A., Abdelrahman, A. H. M., Allemailem, K. S., Almatroudi, A., Moustafa, M. F., & Hegazy, M. E. F. (2021). In Silico Evaluation of Prospective Anti-COVID-19 Drug Candidates as Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *Protein Journal*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09945-6>
- [32]. liap, M. D. E. L., Y, I. O., & C, A. S. (2018). *SUPERCOMPUTADORA*.
- [33]. IAP, P. (2021). Introducción al uso de la supercomputadora "MANATI" - YouTube. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=iKjBsJMmS9c&t=20s>
- [34]. International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). (n.d.). Retrieved July 28, 2021, from <https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform>
- [35]. Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., ... Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811), 289-293. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
- [36]. Jourdan, J. P., Bureau, R., Rochais, C., & Dallemagne, P. (2020). Drug repositioning: a brief overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(9), 1145-1151. <https://doi.org/10.1111/jphp.13273>
- [37]. Kandanapitiye, M. S., Gott, M. D., Sharits, A., Jurisson, S. S., Woodward, P. M., & Huang, S. D. (2016). Incorporation of gallium-68 into the crystal structure of Prussian blue to form K68Ga: XFe1- x[Fe(CN)6] nanoparticles: Toward a novel bimodal PET/MRI imaging agent. *Dalton Transactions*, 45(22), 9174-9181. <https://doi.org/10.1039/c6dt00962j>
- [38]. Khan, S., Siddique, R., Shereen, M. A., Ali, A., Liu, J., Bai, Q., ... Xue, M. (2020). Emergence of a novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: Biology and therapeutic options. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(5), 1-22. <https://doi.org/10.1128/JCM.00187-20>
- [39]. Kircheva, N., & Dudev, T. (2021). Competition between abiogenic and biogenic metal cations in biological systems: Mechanisms of gallium's anticancer and antibacterial effect. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 214, 111309. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111309>
- [40]. Kumar, B. K., Faheem, Sekhar, K. V. G. C., Ojha, R., Prajapati, V. K., Pai, A., & Murugesan, S. (2020). Pharmacophore based virtual screening, molecular docking, molecular dynamics and MM-GBSA approach for identification of prospective SARS-CoV-2 inhibitor from natural product databases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), 1-24. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1824814>

- [41]. Li, F., Liu, F., Huang, K., & Yang, S. (2022). Advancement of Gallium and Gallium-Based Compounds as Antimicrobial Agents. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(February), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.827960>
- [42]. Macalino, S. J. Y., Basith, S., Clavio, N. A. B., Chang, H., Kang, S., & Choi, S. (2018). Evolution of in silico strategies for protein-protein interaction drug discovery. *Molecules*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23081963>
- [43]. Maestro | Schrödinger. (n.d.). Retrieved July 3, 2021, from <https://www.schrodinger.com/products/maestro>
- [44]. Menor, C. (2018). Introducción a la biología molecular del coronavirus SARS-CoV-2 - ChemEvol. Retrieved June 13, 2021, from <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/introduccion-a-la-biologia-molecular-del-coronavirus-sars-cov-2/>
- [45]. Mesecar, A. D. (2020). Structure of COVID-19 main protease bound to potent broad-spectrum non-covalent inhibitor X77. 7(July), 1-23.
- [46]. Milenković, D. A., Dimić, D. S., Avdović, E. H., & Marković, Z. S. (2020). Several coumarin derivatives and their Pd(ii) complexes as potential inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2, an in silico approach. *RSC Advances*, 10(58), 35099-35108. <https://doi.org/10.1039/d0ra07062a>
- [47]. Mirdita, M., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2021). ColabFold - Making protein folding accessible to all. *BioRxiv*, 2021.08.15.456425. Retrieved from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.15.456425v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.15.456425v1.abstract>
- [48]. molSimplify Tutorial 10: Adding ligands to molSimplify | hjkgrp.mit.edu. (n.d.). Retrieved July 3, 2021, from <http://hjkgrp.mit.edu/content/molsimplify-tutorial-10-adding-ligands-molsimplify>
- [49]. Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, 443, 365-382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- [50]. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- [51]. Prieto-Martínez, F., & Medina-Franco, J. (2018). Computer-aided drug design: when informatics, chemistry and art meets. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-*

Biológicas, 21(2), 124-134. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.6>

- [52]. Raj, R. (2021). Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 25, 100847. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100847>
- [53]. Rodriguez, M. (2017). *Usos de cisplatino y derivados de platino en quimioterapia*. Retrieved from [https://eprints.ucm.es/id/eprint/55244/1/MARTA RODRIGUEZ GOMEZ.pdf](https://eprints.ucm.es/id/eprint/55244/1/MARTA_RODRIGUEZ_GOMEZ.pdf)
- [54]. Roe, M. K., Junod, N. A., Young, A. R., Beachboard, D. C., & Stobart, C. C. (2021). Targeting novel structural and functional features of coronavirus protease nsp5 (3CLpro, Mpro) in the age of COVID-19. *Journal of General Virology*, 102(3). <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001558>
- [55]. Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>
- [56]. Schüller, A., & Haehnke, V. (2006). *SMILIB - Rapid Assembly of Combinatorial Libraries*.
- [57]. Schüller, A., Hähnke, V., & Schneider, G. (2007). SmiLib v2.0: A Java-based tool for rapid combinatorial library enumeration. *QSAR and Combinatorial Science*, 26(3), 407-410. <https://doi.org/10.1002/qsar.200630101>
- [58]. Scior, T., Abdallah, H. H., Mustafa, S. F. Z., Guevara-García, J. A., & Rehder, D. (2021). Are vanadium complexes druggable against the main protease Mpro of SARS-CoV-2? – A computational approach. *Inorganica Chimica Acta*, 519(February). <https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120287>
- [59]. Serafin, M. B., Bottega, A., Foletto, V. S., da Rosa, T. F., Hörner, A., & Hörner, R. (2020). Drug repositioning is an alternative for the treatment of coronavirus COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(6), 105969. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105969>
- [60]. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
- [61]. Síntomas del COVID-19 | CDC. (2021). Retrieved June 17, 2021, from <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>
- [62]. Stobart, C. C., Sexton, N. R., Munjal, H., Lu, X., Molland, K. L., Tomar, S., ... Denison, 153

- M. R. (2013). Chimeric Exchange of Coronavirus nsp5 Proteases (3CLpro) Identifies Common and Divergent Regulatory Determinants of Protease Activity. *Journal of Virology*, 87(23), 12611-12618. <https://doi.org/10.1128/jvi.02050-13>
- [63]. Teli, D. M., Shah, M. B., & Chhabria, M. T. (2021). *In silico* Screening of Natural Compounds as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease and Spike RBD : Targets for COVID-19. 7(January), 1-25. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.599079>
- [64]. UCSF Chimera Home Page. (n.d.). Retrieved July 3, 2021, from <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>
- [65]. Ullrich, S., & Nitsche, C. (2020). The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 30(17), 127377. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>
- [66]. Van Cuong, L., Giang, H. T. N., Linh, L. K., Shah, J., Van Sy, L., Hung, T. H., ... Huy, N. T. (2020). The first Vietnamese case of COVID-19 acquired from China. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(4), 408-409. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30111-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30111-0)
- [67]. Vega Hidalgo, C. I. (2018). *Ludificación de docking molecular para acelerar el diseño de fármacos*.
- [68]. Velázquez, O. (2017). *Análisis in silico: Modelado de Proteínas*.
- [69]. WHO. (2020). Situation Report - 31. 20 february 2020. *Coronavirus Disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and Weekly Operational Update*, 2019(February), 1-19. Retrieved from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
- [70]. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. (n.d.). Retrieved June 7, 2021, from <https://covid19.who.int/>
- [71]. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. (n.d.). Retrieved June 17, 2021, from <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>
- [72]. Wirth, M., Zoete, V., Michielin, O., & Sauer, W. H. B. (2013). SwissBioisostere: A database of molecular replacements for ligand design. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 1137-1143. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1059>
- [73]. Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *Jama*, 323(13), 1239. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>

- [74]. Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., ... Handu, S. (2021). Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, 10(4), 1-16.
<https://doi.org/10.3390/cells10040821>
- [75]. Yao, Z. J., Dong, J., Che, Y. J., Zhu, M. F., Wen, M., Wang, N. N., ... Cao, D. S. (2016). TargetNet: a web service for predicting potential drug-target interaction profiling via multi-target SAR models. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 30(5), 413-424.
<https://doi.org/10.1007/s10822-016-9915-2>
- [76]. Ye, W. L., Shen, C., Xiong, G. L., Ding, J. J., Lu, A. P., Hou, T. J., & Cao, D. S. (2020). Improving docking-based virtual screening ability by integrating multiple energy auxiliary terms from molecular docking scoring. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(9), 4216-4230. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00977>
- [77]. Yoshimoto, F. K. (2021). A Biochemical Perspective of the Nonstructural Proteins (NSPs) and the Spike Protein of SARS CoV-2. In *Protein Journal*.
<https://doi.org/10.1007/s10930-021-09967-8>
- [78]. Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., ... Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 368(6489), 409-412.
<https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
- [79]. Zhang, S., Krumberger, M., Morris, M. A., Parrocha, C. M. T., Kreutzer, A. G., & Nowick, J. S. (2021). Structure-based drug design of an inhibitor of the SARS-CoV-2 (COVID-19) main protease using free software: A tutorial for students and scientists. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 218, 1-17.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113390>
- [80]. Zhu, K., Borrelli, K. W., Greenwood, J. R., Day, T., Abel, R., Farid, R. S., & Harder, E. (2014). Docking covalent inhibitors: A parameter free approach to pose prediction and scoring. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 1932-1940.
<https://doi.org/10.1021/ci500118s>

Anexos

Anexo 1: Cronograma de Actividades	1
Anexo 2: Presupuesto	2
Anexo 3: Interacciones Ligando-Receptor	6

ANEXO 1

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6	Mes 7	Mes 8	Mes 9	Mes10	Mes11	Mes12
Revisión de base de datos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Con base en la literatura encontrada se planteará una problemática actual y se propondrá un tema de estudio	X											
Instalación de programas computacionales	X	X										
Capacitación del empleo de los programas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Planteamiento de la metodología del proyecto	X	X										
Estado del arte y marco teórico		X	X									
Plan de Riesgos, presupuesto, diagrama de Gantt, manejo de residuos y normas de seguridad.				X								
Generación de biblioteca virtual de ligandos					X							
Preparación de ligandos en Google Colaboratory y preparación de Mpro en Chimera 1.15 y AutoDock					X	X						
Ejecución del virtual screening en MANATI y obtención de ligandos con mejor docking score							X					
Ejecución virtual screening covalente y no covalente en Schrödinger								X				
Metalado de ligandos con Ga									X			
Evaluar regla de Lipinski y ejecución de docking molecular									X	X	X	
Análisis de complejos de Ga y discusiones										X	X	X
Redacción y presentación del informe final		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ANEXO 2

PRESUPUESTO

Rubro o Actividad	Semestre de planificación del gasto	Descripción del Rubro o Actividad	Unid.	Cant.	CONTRAPARTIDA				Solicitud o IGI S/.	Total S/.
					S/.					
					Fac. Ejecutora	Fac. partic. 1	Inst. partic. 2	Inst. partic. 3		
4.3.1 Compra o arrendamiento de equipos, instrumentos y software de investigación.										
Laptop	2021-1	ASUS ROG STRIX G512LI-BI7N10 15.6' INTEL CORE I7 512GB 8GB windows 10	Bien o equip duradero	1						10.159.00
Paquete de Software SCHRODINGER	2021-1	Paquete de Software Schrodinger incluye: <ul style="list-style-type: none"> • ConfGen Flotating License • Epik Floating License 	Equip o	1						23.835.00

		<ul style="list-style-type: none"> • Glide Floating License • LigPrep Floating License • MacroModel Floating License • PIPER Floating License • Prime Floating License • XP Visualizer Floating License • Maestro Access License • KNIME Access License • OPLS3 Force Field Access License 	duradero							
Unidad de procesamiento gráfico	2021-1	<p>Ryzen 9 5950X</p> <p>Núcleos/hilos: 16/32(núcleos:16, subprocesos: 32)</p> <p>Frec. Base/turbo: 3.4/4.9 GHz</p>	Equipo duradero	1						3.850.21

4.3.3 Contratación de servicios técnicos y de apoyo.										
Curso de Introducción a la Dinámica Molecular		Curso en línea de Dinámica Molecular	-	-	182.00					182.00

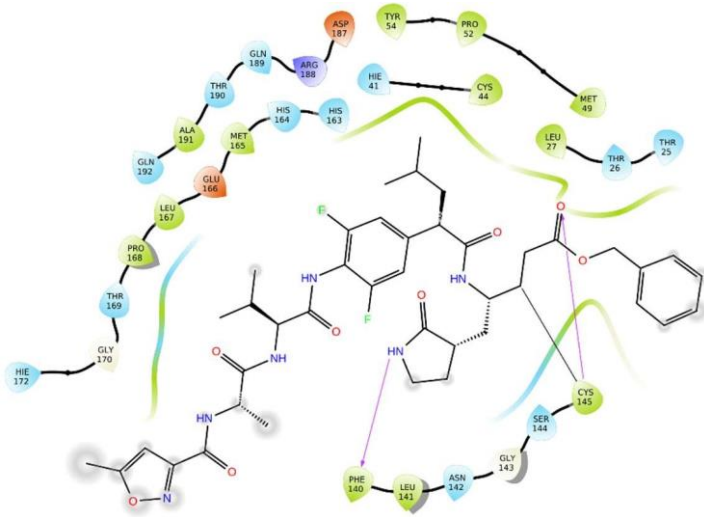
4.3.4 Gastos de viaje										
Pasaje aéreo	2022-1	Lima-Santiago de Chile Chile-Lima		1						2000.00

4.3.5 Financiamiento a Investigadores y asistentes de investigación.										
Investigador 1. Ana Cecilia Valderrama Negrón	-	Jefe de proyecto, a cargo de la parte científica y técnica del proyecto.								-
Investigador 2. Jesús Antonio Alvarado Huayhuaz		Co-asesor, a cargo de la enseñanza en la manipulación de softwares para el diseño de fármacos, <i>docking</i> molecular y dinámica molecular.								-

Tesisista 1. Kevin Ender Taype Huanca	-	<i>Docking</i> de metalofármacos, diseño de derivados, <i>docking</i> de los derivados, ejecución de la dinámica molecular								5000.00
---------------------------------------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	---------

* especificar el gasto

TOTAL DE LOS RUBROS Y/O ACTIVIDADES EN NUEVOS SOLES-					S/.	S/.	S/.	S/.	S/.	S/. 45.026.2 1
---	--	--	--	--	-----	-----	-----	-----	-----	----------------------



. Diagrama de interacciones Molécula 18-M^{pro}.

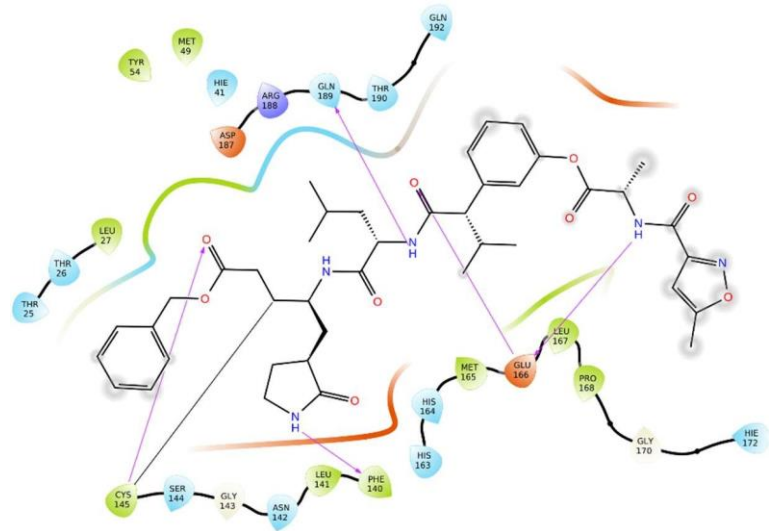


Diagrama de interacciones Molécula 4-M^{pro}.

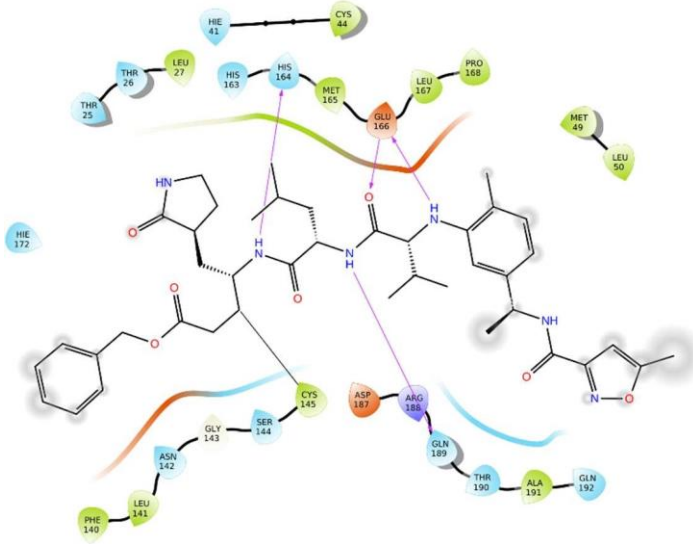


Diagrama de interacciones Molécula 10-M^{pro}.

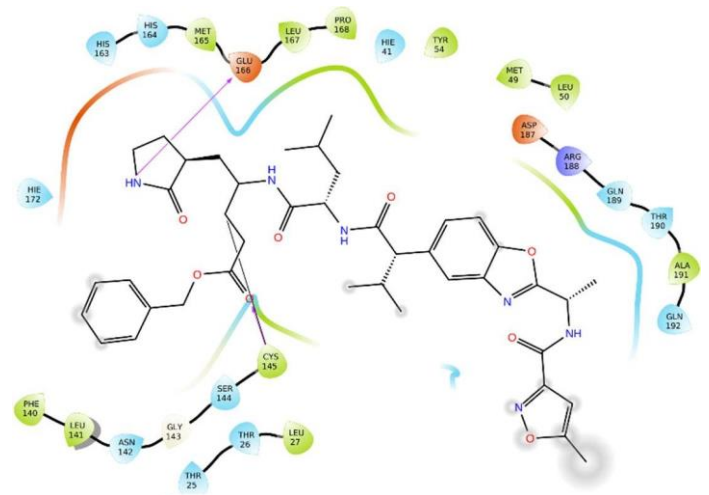


Diagrama de interacciones Molécula 9-M^{pro}.

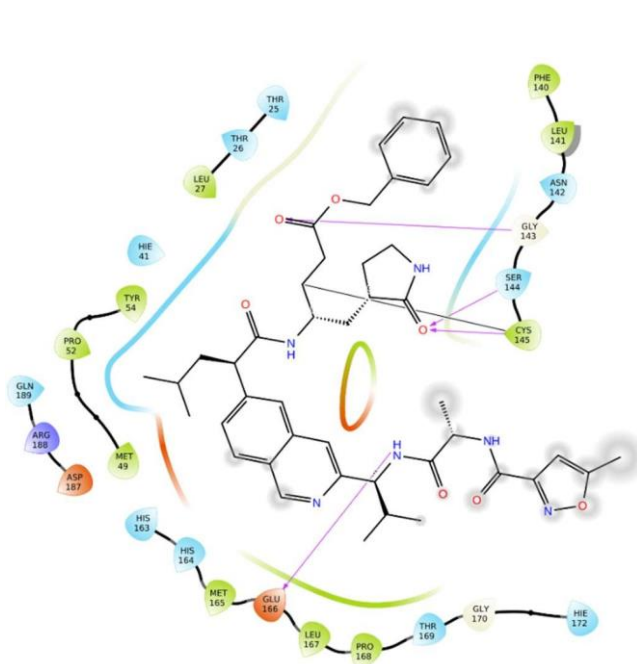


Diagrama de interacciones Molécula19-M^{pro}.

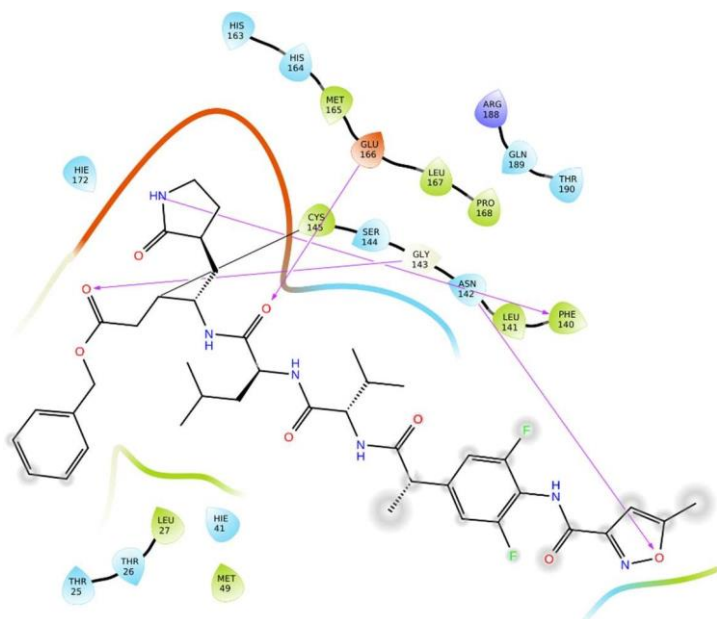


Diagrama de interacciones Molécula15-M^{pro}.

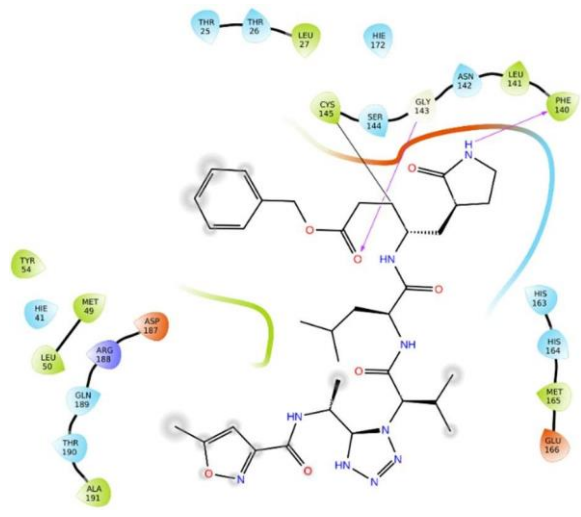


Diagrama de interacciones Molécula2-M^{pro}.

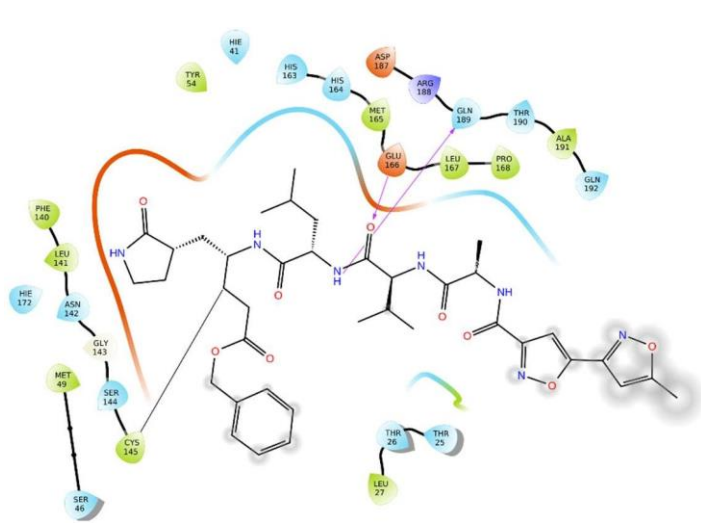


Diagrama de interacciones Molécula22-M^{pro}.

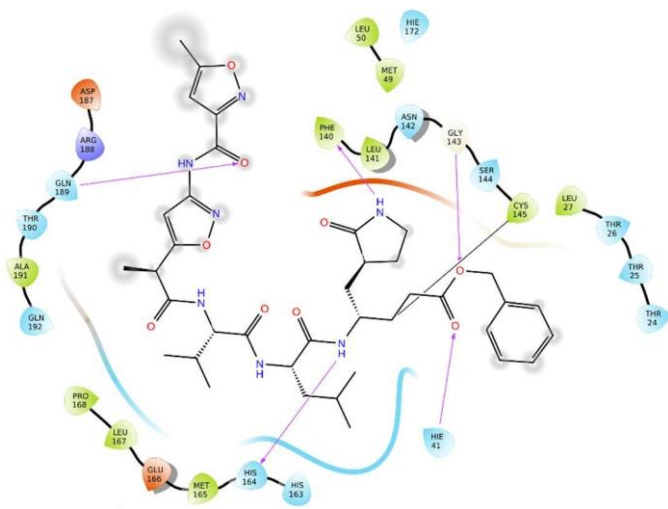


Diagrama de interacciones Molécula14-M^{pro}.

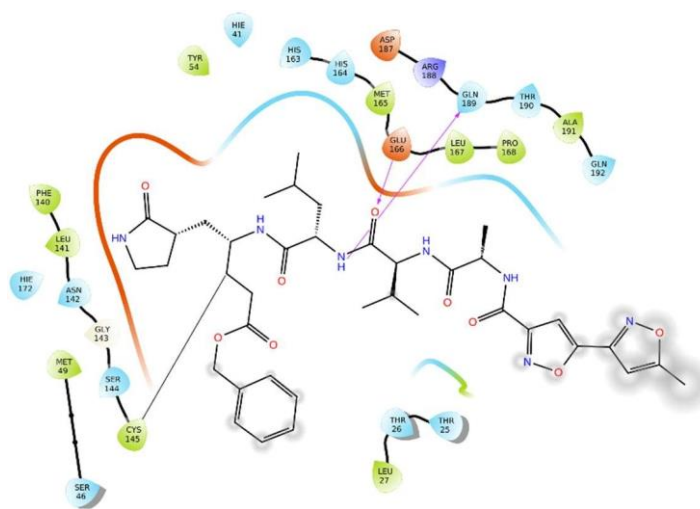


Diagrama de interacciones Molécula13-M^{pro}.

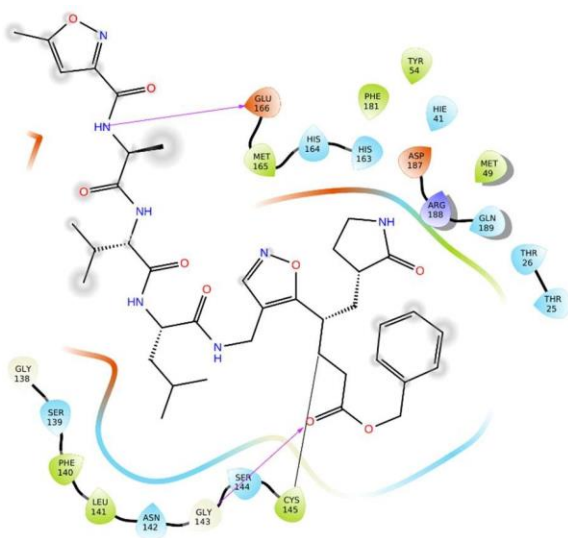


Diagrama de interacciones Molécula23-M^{pro}.

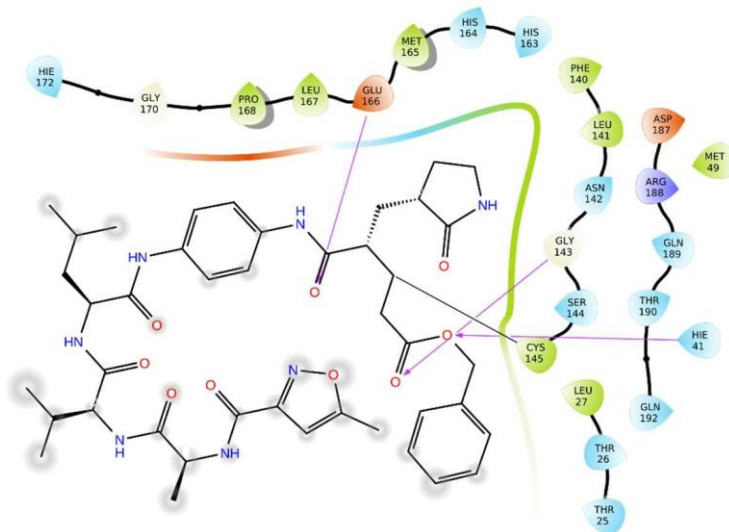


Diagrama de interacciones Molécula20-M^{pro}.

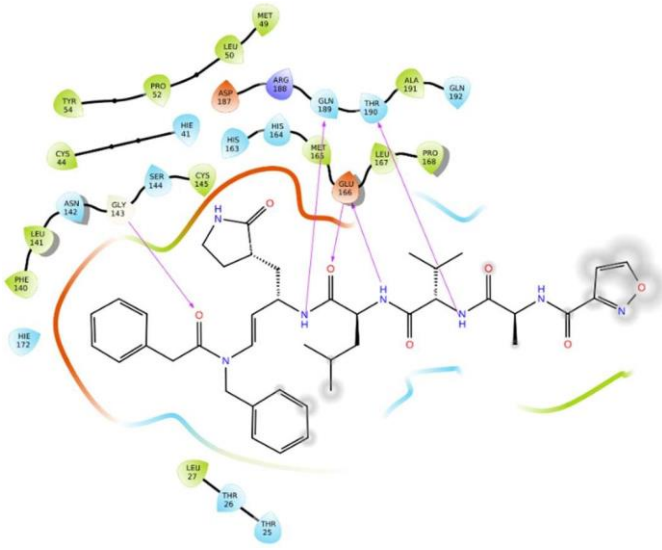


Diagrama de interacciones Molécula27-M^{pro}.

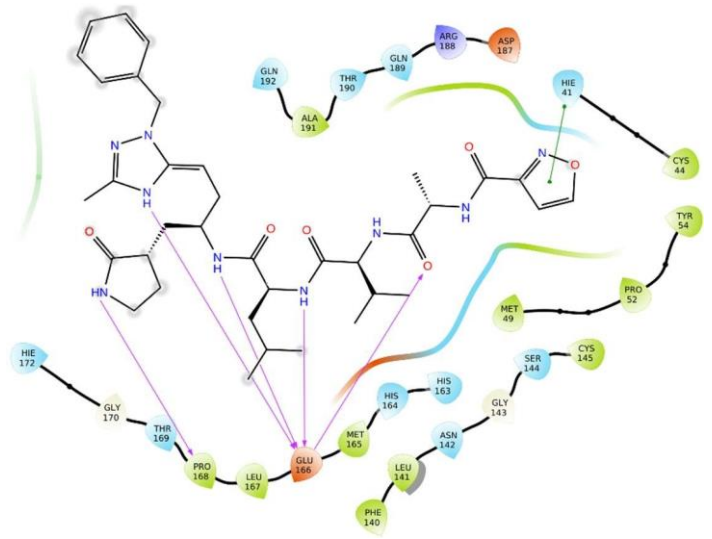


Diagrama de interacciones Molécula30-M^{pro}.

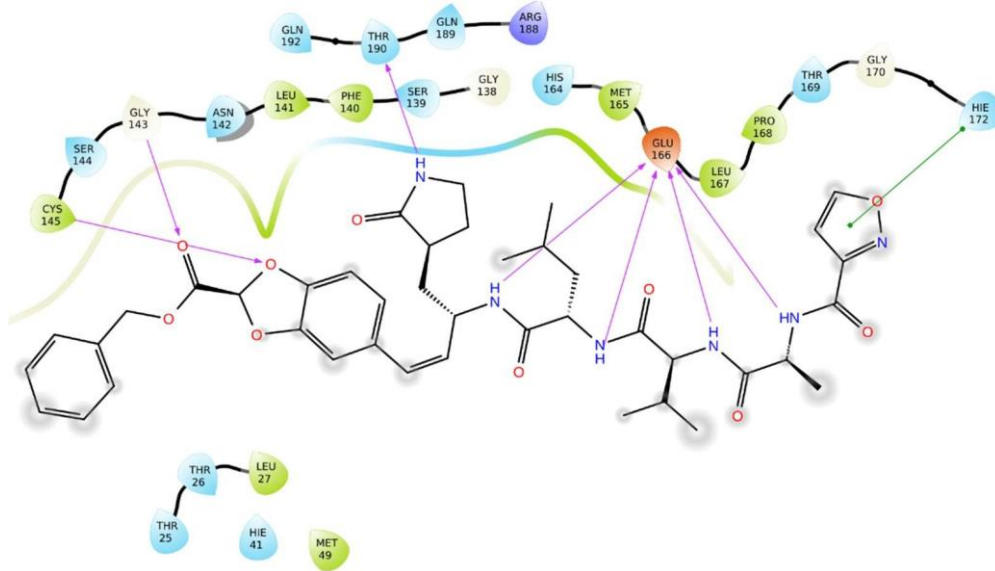


Diagrama de interacciones Molécula40-M^{pro}.

B.3 Interacciones de los complejos de Fe (III)-receptor Mpro

En esta sección se presentan las interacciones de los 10 complejos que obtuvieron mejores docking score al realizar el docking (Los 4 complejos iniciales ya se han mostrado previamente). Las siguientes figuras representan los diagramas de acoplamiento de tales complejos frente a M^{pro}.

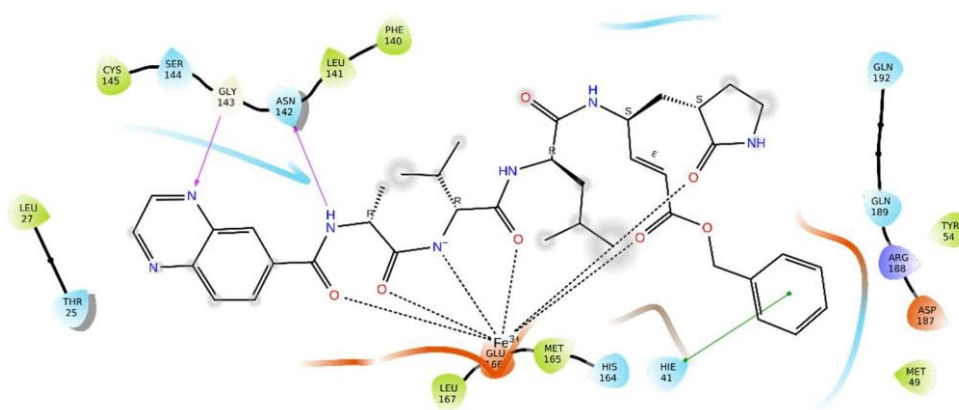


Diagrama de interacciones Complejo8*-M^{pro}.

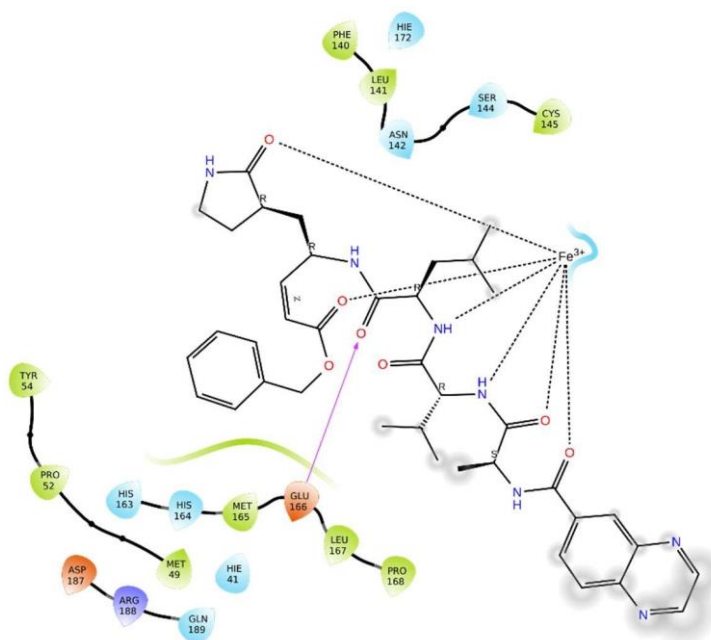


Diagrama de interacciones Complejo28-M^{pro}.

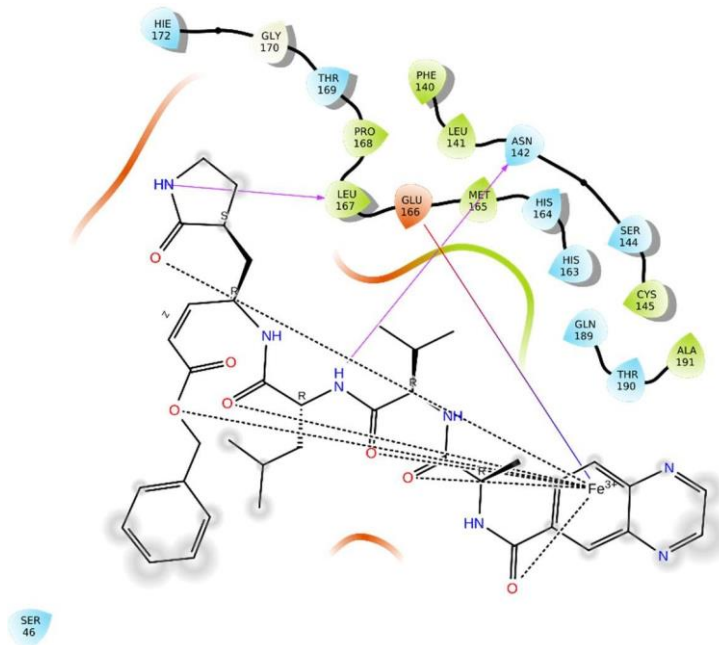


Diagrama de interacciones Complejo2- M^{Pro} .

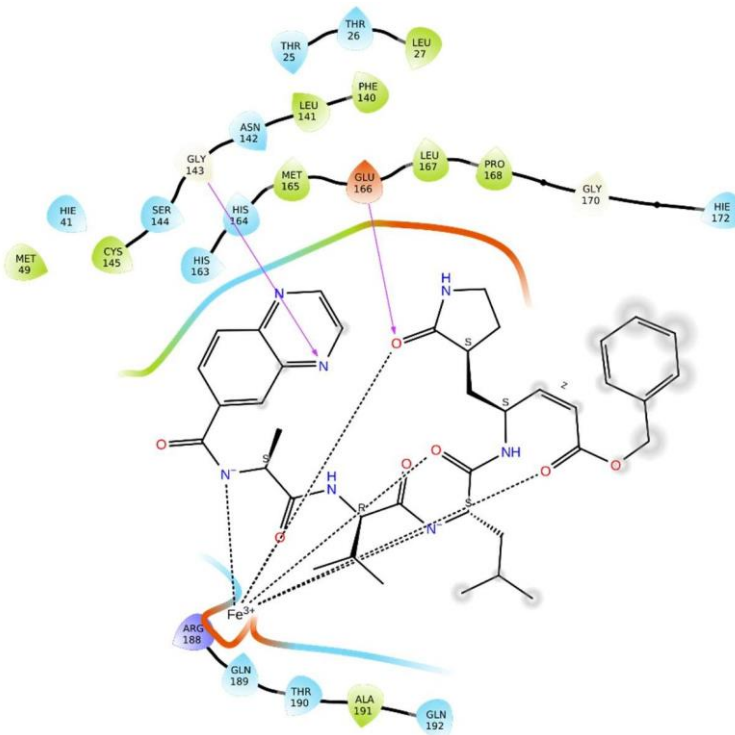


Diagrama de interacciones Complejo24*- M^{Pro} .

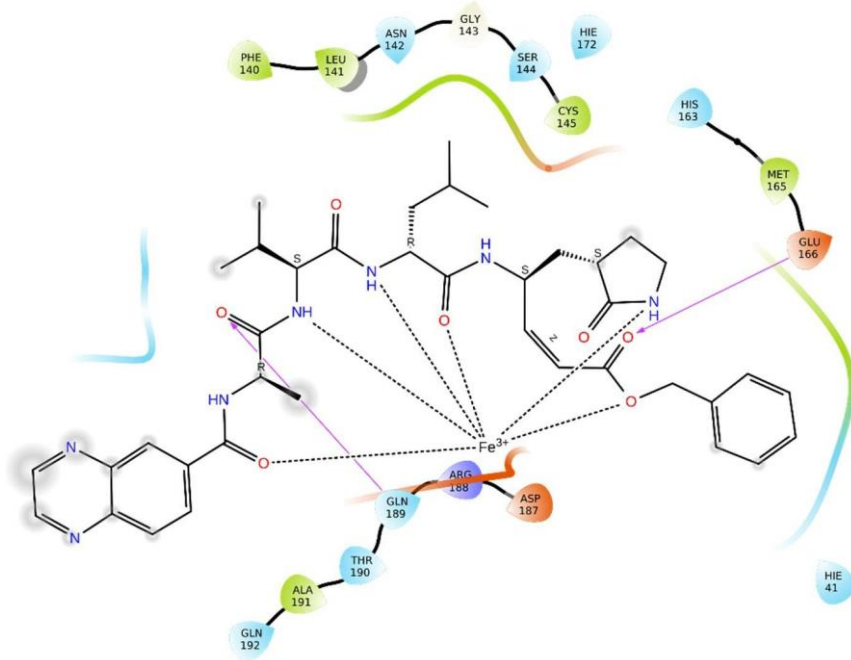


Diagrama de interacciones Complejo23-M^{pro}.

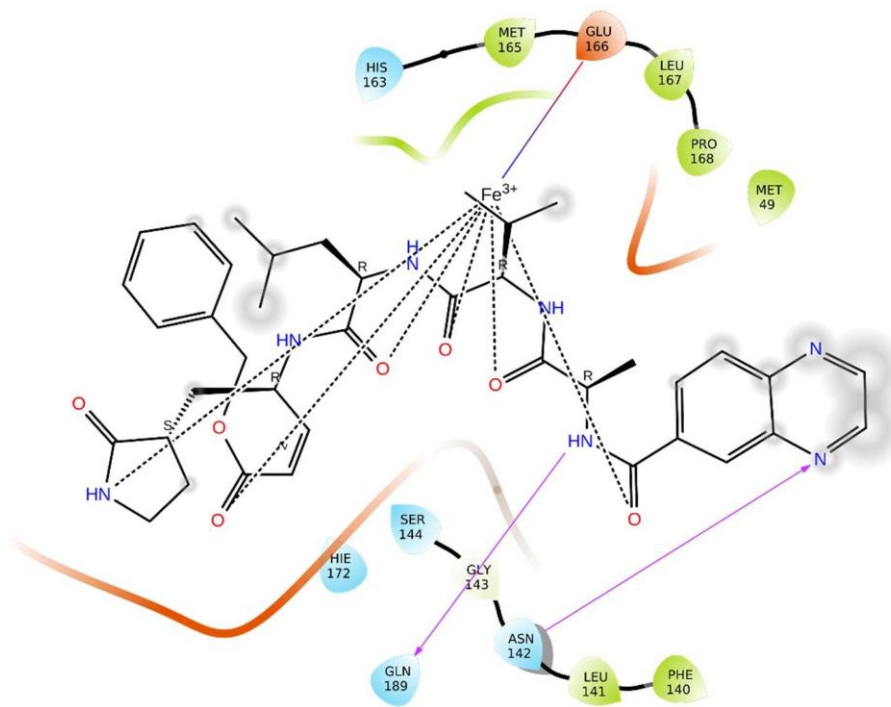
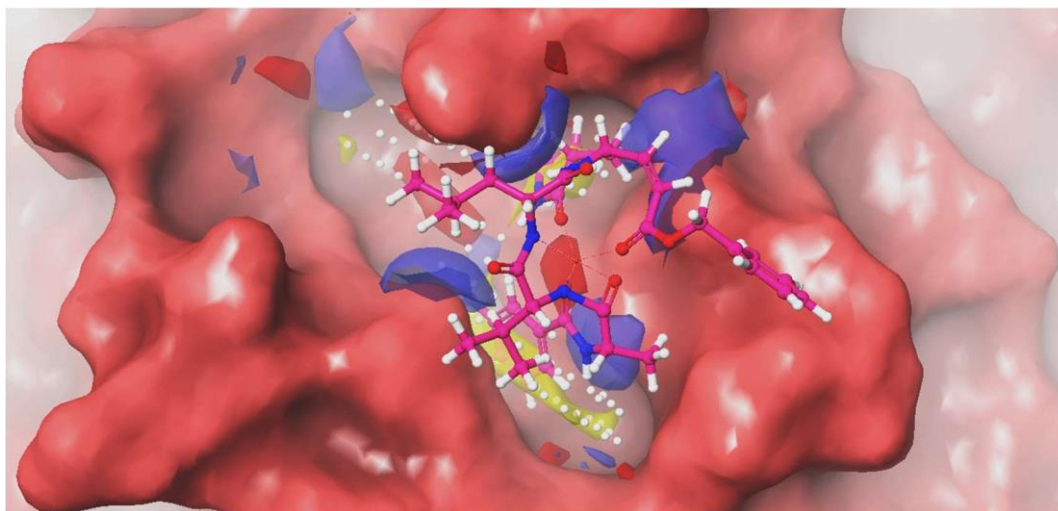


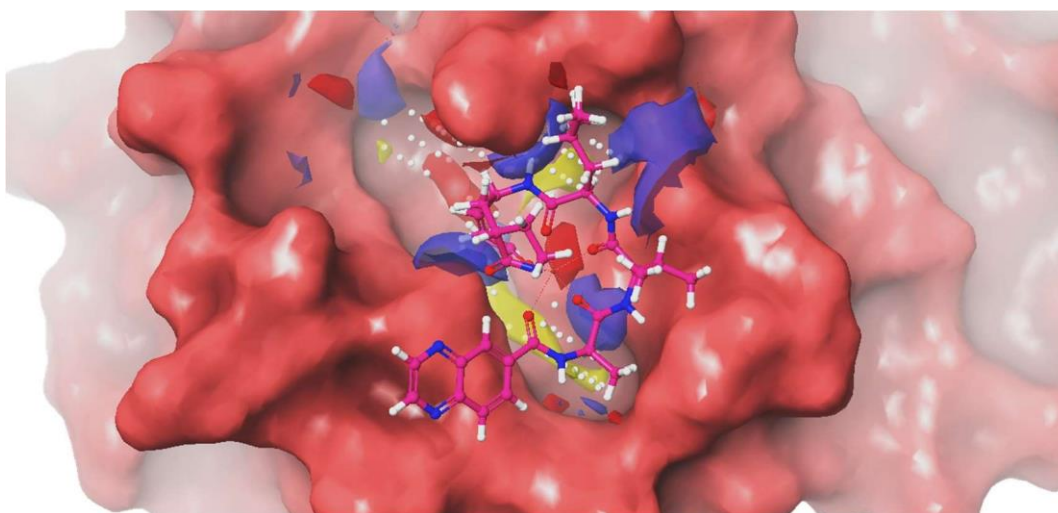
Diagrama de interacciones Complejo7-M^{pro}.

C.3 Interacciones de SiteMap con los complejos

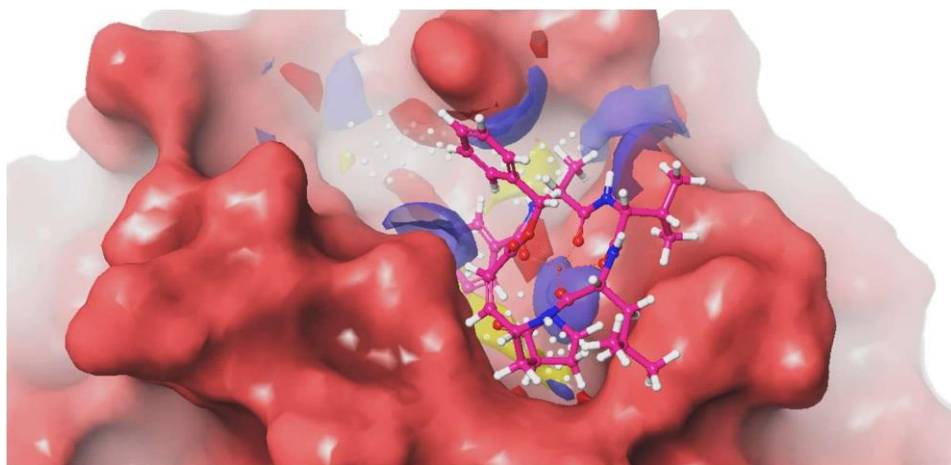
En esta sección se presentan a los 10 complejos que obtuvieron mejores docking score en presencia de los mapas de sitio que se obtuvieron empleando SiteMap (El Complejo30* ya se ha presentado previamente). Las siguientes figuras representan dichos complejos en presencia de M^{PRO}.



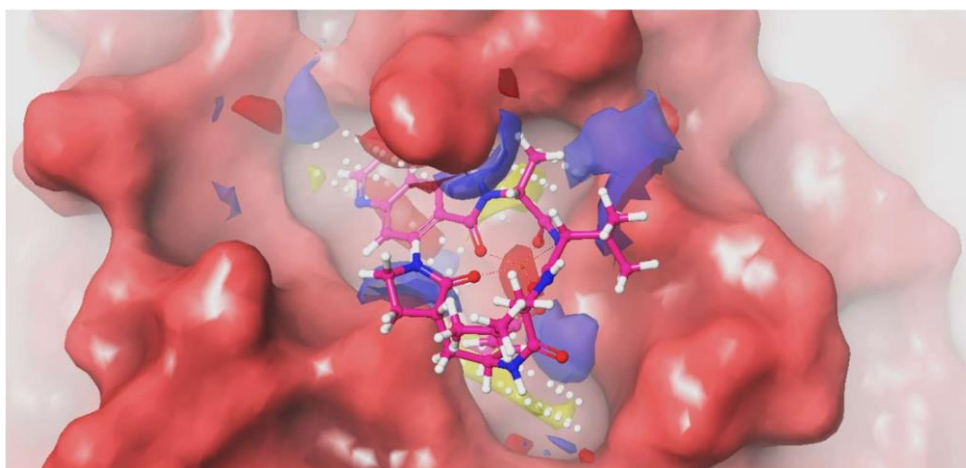
Complejo28 acoplado en el pocket Sitemap_1.*



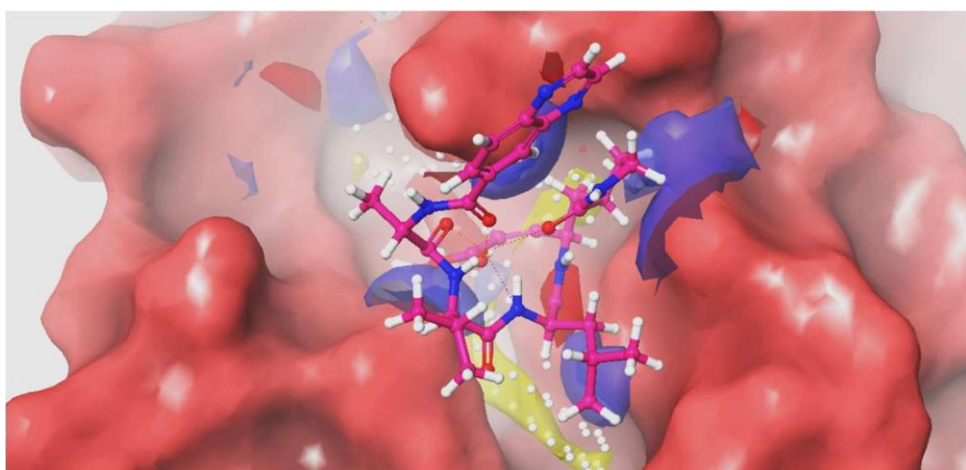
Complejo7 acoplado en el pocket Sitemap_1.*



Complejo1 acoplado en el pocket Sitemap_1.*



Complejo8 acoplado en el pocket Sitemap_1.*



Complejo28 acoplado en el pocket Sitemap_1.