



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Predicción de las cavidades medicables de la proteína S del SARS-CoV-2

TESIS

Presenta:

QFBT. Alonso Torres Hatem

Para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias en la Especialidad de Farmacología

Directora de tesis:

Dra. Martha Sonia Morales Ríos

Ciudad de México, marzo de 2022

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 30 del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. Martha Sonia Morales Ríos (smorales@cinvestav.mx), en el marco del Programa de Posgrado de Farmacología, con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro: CVU 1028558.

La tesis se enmarca en el proyecto Investigación Científica Básica 2016 283980-CB-2016, CONACyT.

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en un simposio y un congreso nacional:

Biocinves Virtual, Cinvestav, Departamento de Farmacología, 7 de abril de 2021

“Uso de métodos computacionales en el descubrimiento de fármacos COVID-19”

Alonso Torres Hatem, Martha S. Morales-Ríos

Segundo Congreso Virtual, LIV Nacional y IX Internacional de Ciencias Farmacéuticas, 18 al 22 de octubre de 2021

“Predicción de las cavidades medicables de la proteína S del SARS-CoV-2”

Alonso Torres-Hatem, Gelacio Martínez-Gudiño, Nadia A. Pérez-Rojas, Joel J. Trujillo-Serrato, Martha S. Morales-Ríos
Número de trabajo QMD005

“La lógica te llevará de la A a la Z, la imaginación te llevará a cualquier lugar”

-Albert Einstein-

Dedicatoria

Dedico esta tesis de todo cariño y corazón a mi centro familiar, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por llenar mi vida con sus valiosos consejos, por tenerme paciencia y confianza para lograr un objetivo profesional más.

A mis padres Alonso y Adriana, estoy eternamente agradecido por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, perseverancia, valentía, responsabilidad, de no temer las adversidades y siempre salir adelante.

A mi hermano Aldo, por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuesto a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi tutora de tesis la Dra. Martha Sonia Morales Ríos que gracias a su guía y consejos hoy puedo concretar este gran proyecto de investigación, por haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente, seguir cultivando mis valores y haberme apoyado a lo largo del desarrollo de mi proyecto de tesis.

A todos los integrantes del laboratorio 30 del departamento de química, en donde forme vínculos de compañerismo, ya que es un excelente grupo de trabajo y de investigación. A Nadia Azucena Pérez Rojas por su apoyo en la parte computacional, a Joel de Jesús Trujillo Serrato por su apoyo y paciencia en las primeras etapas de síntesis química, a mi compañero de laboratorio Gelacio Martínez Gudiño por sus consejos y compartirme sus conocimientos.

A mis sinodales. Al Dr. Gilberto Castañeda Hernández y al Dr. Humberto Mendoza Figueroa por sus valiosos consejos y aportes hacia mi tesis.

A todos mis compañeros de generación, por compartir logros a lo largo del posgrado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Abstract	XII
1.1 Resumen	XIII
2. Introducción	1
2.1 Generalidades de los virus	1
2.2 COVID-19 y SARS-CoV-2	4
2.2.1 Características virales y genoma	5
2.2.2 Potenciales blancos terapéuticos.....	6
2.2.3 Estructura y función de la glicoproteína S.....	6
2.3 Proteínas medicables	10
2.4 Enfoques terapéuticos contra la COVID-19.....	12
2.4.1. Antivirales disponibles.....	13
2.4.2 Inmunomoduladores y terapias adyuvantes.....	15
2.5 Importancia farmacológica de los indoles.....	16
2.6 Diseño de fármacos.....	18
2.6.1 Estudios computacionales	19
3. Justificación	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	20
6. Objetivos específicos	20
7. Metodología	21
7.1 Ligando.....	21
7.2 Proteína.....	22
8. Resultados y discusión	22

8.1 Predicción de propiedades fisicoquímicas, lipofilia, farmacocinética, similitud con los fármacos y química medicinal	22
8.1.1 Propiedades fisicoquímicas y gráfico de biodisponibilidad.....	23
8.1.2 Propiedades farmacocinéticas	29
8.1.3 Lipofilia, «BOILED-Egg» o gráfica del huevo cocido.....	31
8.1.4 Similitud con los fármacos y alertas de interferencia estructural.....	33
8.2 Análisis conformacional de las indol-2-carboxamidas 2a-2d	34
8.2.1 Confórmeros de mínima energía	35
8.2.2 Optimización conformacional	38
8.3 Predicción de sitios medicables.....	41
8.4 Acoplamiento de moléculas pequeñas basado en la estructura.....	43
8.4.1 Docking molecular.....	43
8.4.1.1 Análisis selecto de las interacciones proteína-ligando	54
8.4.1.2 Conformación bioactiva.....	59
9. Conclusiones y perspectivas	64
10. Referencias	65
11. ANEXO	71
11.1 Tablas y Figuras	71

Lista de abreviaturas

3CLpro	Proteasa principal
Å	Angstrom
A H1N1	Virus de la influenza tipo A
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina tipo 2
ACTIV	Aceleración de Intervenciones Terapéuticas y Vacunas
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
B3LYP	Correlación funcional de Lee, Yang y Parr
ba	Bases nitrogenadas
CD	Dominio conector
cal/mol	Calorías por mol
CoV	Coronavirus
COVID-19	Enfermedad por el nuevo coronavirus 2019
CYP450	Citocromo P450
Cys	Cisteína
da	Dalton
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FNIH	Fundación para los Institutos Nacionales de Salud
FP	Péptido de fusión
g/mol	Gramos por mol
GI	Gastrointestinal
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
H1N1	Virus de la influenza
HBA	Grupos aceptores de puentes de hidrógeno
HBD	Grupos donadores de puentes de hidrógeno

His	Histidina
HR	Heptapéptido repetido de fusión
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
LGA	Algoritmo genético lamarckiano
Lys	Lisina
MERS	Síndrome respiratorio de oriente medio
Met	Metionina
MM	Modelado molecular
MMFFaq	Campo de fuerza de mecánica molecular en fase acuosa
NMR	Resonancia magnética nuclear
nsp	Proteína no estructural
NTD	Dominio de amino terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
p	Población
PAINS	Ensayos de interferencia estructural
PDB	Banco de datos de proteínas
P-gp	Glicoproteína P
Phe	Fenilalanina
PLpro	Proteasa de tipo papaína
Pro	Prolina
QSAR	Relación cuantitativa estructura actividad
RBD	Dominio de unión a receptor
RdRp	Replicasa dependiente de RNA
RMSD	Desviación cuadrática media
RNA	Ácido ribonucleico
S	Proteína Spike
S1	Subunidad 1
S2	Subunidad 2
SARS	Síndrome respiratorio agudo grave
Ser	Serina

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Thr	Treonina
TM	Región transmembranal
TMPRSS2	Proteasa transmembranal de tipo serina 2
TPSA	Área topológica de superficie polar
Trp	Triptófano
Val	Valina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WlogP	Coefficiente de partición octanol-agua
ΔG	Energía libre de Gibbs/ Energía de unión
σ	Sigma

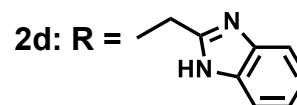
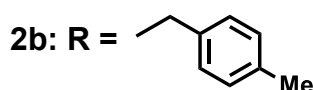
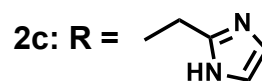
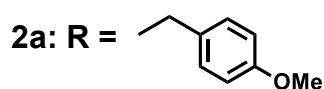
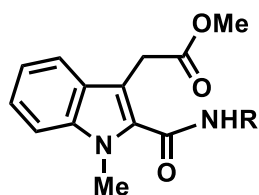
1. Abstract

Coronaviruses represent global health threat. In this century, they have already caused two epidemics and one serious pandemic. In 2019, the appearance of SARS-CoV-2 virus that causes COVID-19 triggered a pandemic that is still active today. SARS-CoV-2 penetrates the host cell via binding its spike (S) protein to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor. Considering that this attachment is required for the initiation of pathogenesis, virus S glycoprotein is a good target for drug discovery.

This study aimed at the bioinformatic analysis of the possible druggable cavities of the SARS-CoV-2 S glycoprotein, as well as to investigate the binding affinity of drug-likeness indole-2-carboxamides **2a-2d** for anti-viral drug discovery.

Druggable cavities were searched through Proteins Plus IT platform. Only one cavity with the highest score at the binding site was selected for affinity studies. Indole-2-carboxamides **2a-2d** were used to identify residues within the viral glycoprotein and AutoDock software was used to evaluate the affinities.

This study provides a druggable region within viral SARS-CoV-2 S glycoprotein and two candidate compounds **2b** and **2d** to block viral entry. Currently, the synthesis of **2a-2d** is being undertaken to subsequently determine the effectiveness of these compounds in viral modulation *in vitro*.



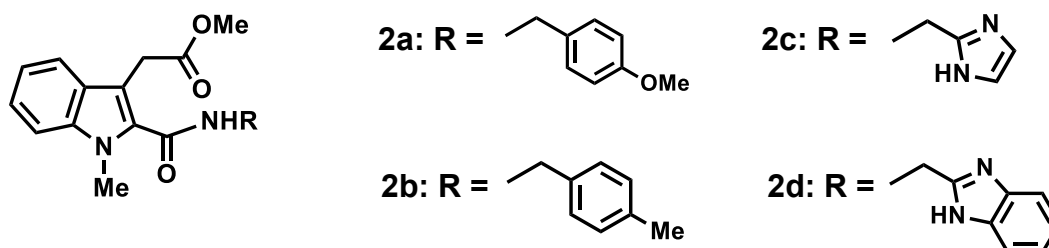
1.1 Resumen

Los coronavirus representan una amenaza para la salud mundial. En este siglo ya han causado dos epidemias y una grave pandemia. En 2019, la aparición del virus SARS-CoV-2 que causa la COVID-19 desencadenó una pandemia que aún hoy sigue activa. El SARS-CoV-2 penetra en la célula huésped uniéndose a su proteína espiga (S) al receptor, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2). Teniendo en cuenta que esta unión es necesaria para el inicio de la patogénesis, la glicoproteína S del virus es una diana farmacológica para el descubrimiento de fármacos.

Este estudio tuvo como objetivo el análisis bioinformático de las posibles cavidades medicables de la glicoproteína S del SARS-CoV-2, así como investigar la afinidad de unión de las <<drug-likeness>> indol-2-carboxamidas **2a-2d** para descubrir fármacos antivirales.

Las cavidades medicables se buscaron a través de la plataforma informática Proteins Plus. Para los estudios de afinidad, solo se seleccionó una cavidad con la puntuación más alta en el sitio de unión de la proteína S. Se usaron las indol-2-carboxamidas **2a-2d** para identificar residuos dentro de la glicoproteína viral y el software AutoDock para evaluar las afinidades.

Este estudio permite reconocer una región medicable dentro de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 y a dos potenciales compuestos **2b** y **2d** como bloqueadores de la entrada viral. Actualmente, se está llevando a cabo la síntesis de **2a-2d** para posteriormente determinar la eficacia de estos compuestos en la modulación viral *in vitro*.



Palabras clave: SARS-CoV-2, glicoproteína S, cavidades medicables, bioinformática.

2. Introducción

2.1 Generalidades de los virus

Los virus son un amplio grupo de agentes infecciosos, en los que cada partícula viral o virión consiste en material genético, ya sea DNA o RNA concentrados en moléculas proteicas y lipídicas (Figura 1). Los virus no se replican por sí solos, necesitan de la maquinaria celular para llevar a cabo su replicación, lo que los hace parásitos intracelulares obligados. Por lo tanto, los virus se diferencian totalmente de las células en poseer una organización estructuralmente simple, carecer de metabolismo y en su impedimento de replicarse de manera independiente (Pellet et al., 2014; Willey et al., 2008).

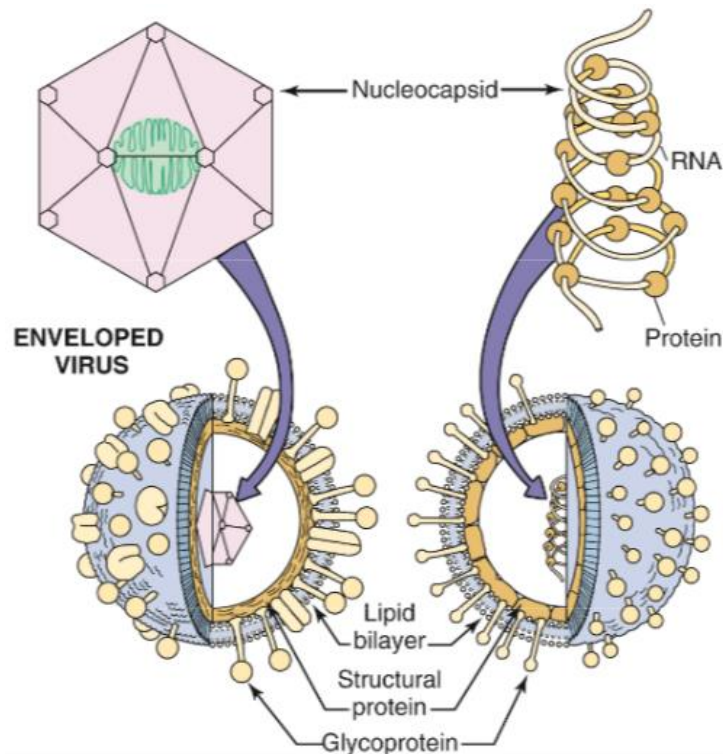


Figura 1. Representación general de la estructura de los virus.

Tomado de: Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología Médica (Octava edición)* Elsevier.

En general, los virus pueden variar genéticamente y/o estructuralmente, es decir cada virión posee una estructura única. Existen virus que tienen DNA, el cual

puede ser monocatenario, bicatenario, lineal o circular. Por otro lado, los viriones que poseen RNA, éste puede ser de sentido positivo, sentido negativo o de doble cadena. En cuestiones estructurales, el material genético está rodeado por una cubierta proteica denominada nucleocápside, y ésta a su vez está envuelta por un complejo proteico llamado cápside. Así mismo, algunos virus poseen una membrana lipídica llamada envoltura, a este tipo de virus se les llama “virus envueltos”, en contra parte existen virus sin envoltura lipídica, o bien “virus desnudos” (Figura 1).

Anteriormente los virus se clasificaban basándose en la enfermedad que provocan. En la actualidad los virus se clasifican de acuerdo con sus propiedades físicas o bioquímicas (Figura 2) (Murray et al., 2017; Willey et al., 2008).

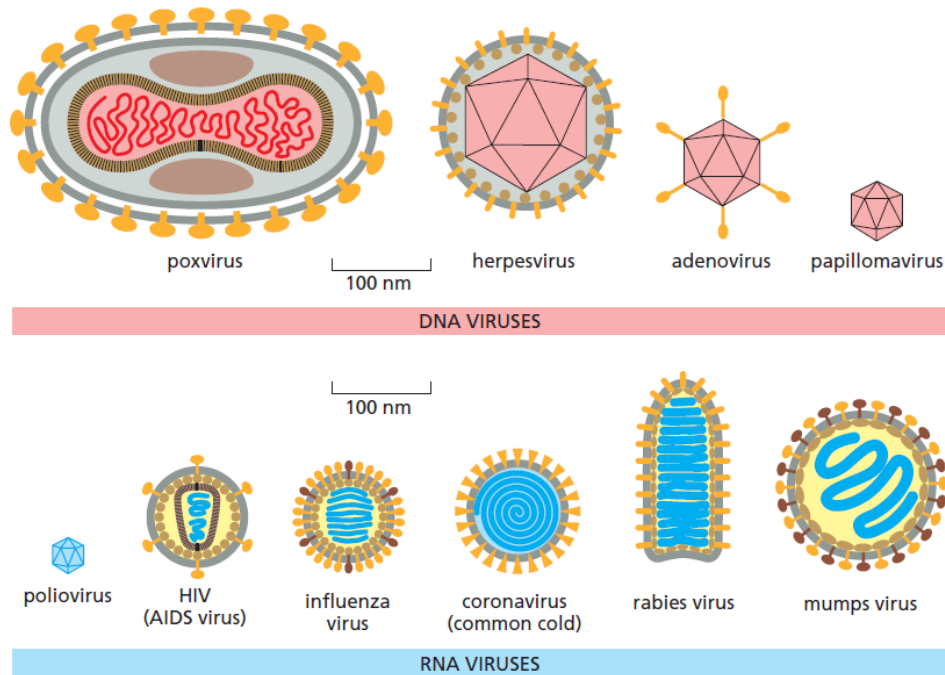


Figura 2. Morfología y clasificación de los virus, de acuerdo con el tipo de material genético de cada virión.

Tomado de: *Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Molecular Biology of The Cell. Garland Science.*

Una propiedad importante de los virus es que se diseminan con facilidad debido a que pueden penetrar barreras biológicas, sobreviven en condiciones extremas y algunos son resistentes a detergentes. Por ello, los virus son capaces de crear

grandes cadenas de contagio entre poblaciones mundiales, así mismo los virus tiene una alta tasa de mutación debido a su replicación acelerada. A través de la historia los virus han provocado diversas epidemias de gran impacto a nivel mundial (Tabla 1).

Tabla 1. Enfermedades emergentes provocadas por virus.^a

Año	Nombre de la enfermedad	Agente etiológico	Muertes
1520	Viruela o “Hueyahuatl”	Virus de la viruela	3.5 millones
1793-1798	Fiebre amarilla o “La plaga americana”	Virus de la fiebre amarilla	~25,000
1918	Gripe española	A H1N1	~50 millones
1976	Ebola	Virus del Ebola	15,258
1981	Conjuntivitis aguda hemorrágica	Adenovirus	No es mortal
1981	SIDA	VIH	~37 millones
2002	Síndrome respiratorio agudo grave	SARS-CoV-1	813
2009	Gripe porcina	H1N1	284,000
2014	Chinkungunia	Virus del Chinkungunia	No es mortal
2019 ^b	COVID-19	SARS-CoV-2	5,5 millones

^a Tomado de: *Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2020). Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. Cell, 182(5), 1077–1092.*

^b Dato actualizado según la OMS al 23 de enero de 2022.

Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas provocadas por el surgimiento de nuevos virus. Normalmente estas enfermedades surgen por la transmisión de animal a humano (zoonosis), es el caso del virus del VIH, de la gripe porcina (H1N1) y del SARS-CoV-2. Las enfermedades emergentes prevalecen gracias a estrategias de supervivencia de los virus a largo plazo, de este modo, las enfermedades virales pueden ser incontrolables al grado de comprometer la salud mundial (Morens & Fauci, 2020).

2.2 COVID-19 y SARS-CoV-2

El brote de COVID-19 (Coronavirus Disease-2019), enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2, inició en China en el estado de Wuhan en diciembre del 2019 (Duan, 2020). En marzo de 2020 la propagación acelerada de la enfermedad, con más de 381,000 personas infectadas y más de 160,000 muertes a nivel mundial, condujo a la OMS a declarar a la COVID-19 como pandemia, generando la necesidad urgente de crear vacunas y terapias farmacológicas.

La COVID-19 se considera como un tipo de enfermedad infecciosa autolimitante, ya que en la mayoría de los casos de los pacientes con síntomas leves pueden recuperarse en 2 semanas aproximadamente. Entre los síntomas más comunes que pueden desarrollar los pacientes con COVID-19 son; fiebre, tos y/o fatiga. Por otro lado, los síntomas menos comunes son; la producción de esputo, dolor de cabeza, sangrado pulmonar y diarrea (Duan, 2020).

La tasa de mortalidad del SARS-CoV-2 es de 3.8%, la cual es menor que el SARS-CoV-1 con un 10% y/o que el MERS-CoV con un 37.1%. Sin embargo, el número de casos de infección relativa del SARS-CoV-2 es 10 veces mayor, datos epidemiológicos de varios países reportaron que el SARS-CoV-2 puede transmitirse de personas asintomáticas o con síntomas leves (Ahn et al., 2020). Estas características en particular pueden explicar la repentina propagación del virus a nivel mundial.

2.2.1 Características virales y genoma

El SARS-CoV-2 pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*, que se subdivide en cuatro géneros; *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, y *Deltacoronavirus*. En general, los coronavirus poseen un RNA genómico con una cadena de Poly(A), es decir un RNA codificante, que contiene 8 marcos de lectura abiertos (ORF), estos fragmentos codifican proteínas estructurales, no estructurales y proteínas accesorias.

El virus SARS-CoV-2 posee un 82% de similitud con los virus MERS y SARS CoV. El material genético del virus SARS-CoV-2 contiene una cadena positiva de RNA tipo monocatenario de 26-32 Kba, que codifica para las proteínas estructurales Spike (S), de envoltura (E), de membrana (M) y nucleocápside (N) (Figura 3) (Asselah et al., 2021). El genoma del virus también codifica para proteínas no estructurales como la 3-quimiotripsina, la proteasa de tipo papaína y la polimerasa RNA dependiente (Samudrala et al., 2020; Xiu et al., 2020). Tanto las proteínas estructurales y no estructurales pueden ser blancos terapéuticos para desarrollar nuevos antivirales.

Los genomas y subgenomas de los coronavirus codifican seis ORF, los fragmentos ORF 1a/b codifican 16 proteínas no estructurales (nsp) (Figura 3). Entre ellas están las proteasas, quienes cumplen la función de escindir a las poliproteínas recién codificadas, de esta manera el virus obtiene proteínas funcionales y puede formar el complejo de replicación del virus (Dhama et al., 2020).

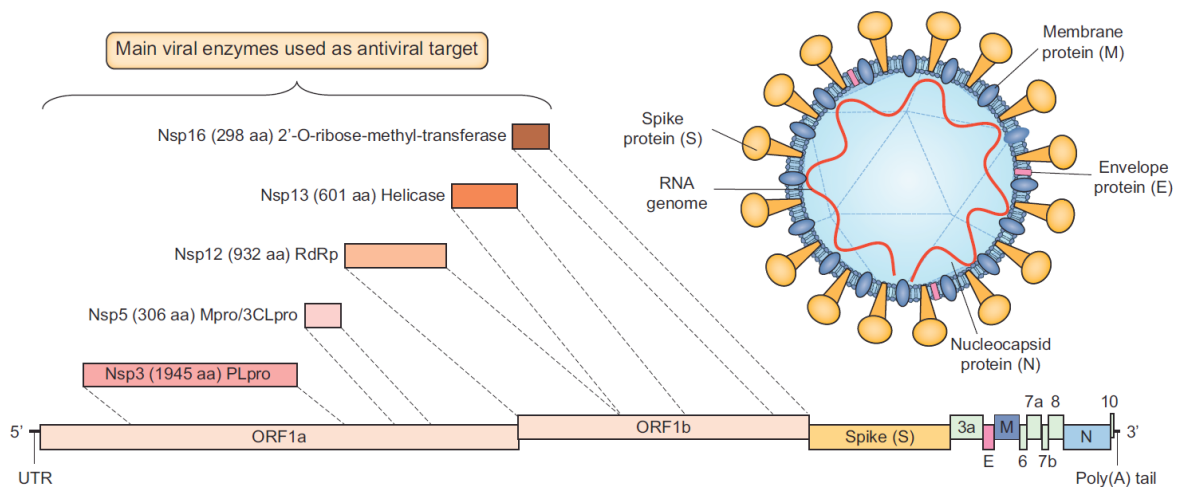


Figura 3. Genoma y estructura del virión SARS-CoV-2.

Tomado de: Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G., & Schinazi, R. F. (2021). COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *Journal of Hepatology*, 74(1), 168–184. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.031>

2.2.2 Potenciales blancos terapéuticos

A pesar de su diversidad genómica, los pasos del ciclo de replicación de los CoV comparten elementos biológicos clave, con una cierta homología entre diferentes cepas de CoV, que pueden explotarse para el diseño y desarrollo de fármacos antivirales. Los elementos biológicos prometedores incluyen: ARN polimerasa dependiente de ARN, las dos proteasas virales 3CLpro y PLpro, la glicoproteína S y, finalmente, las proteasas celulares involucradas en la entrada viral, como TMPRSS2 y catépsinas (Zumla et al., 2016).

2.2.3 Estructura y función de la glicoproteína S

La glicoproteína S, localizada en la superficie del virus SARS-CoV-2, es la más conservada en la mayoría de los virus de la familia *coronaviridae*. Es un homotrímero de 180-200 kDa, con 1273 aminoácidos por protómero. La proteína S contiene un amino terminal extracelular, un dominio transmembranal (TM) anclado en la envoltura viral y un carboxilo intracelular (Huang et al., 2020; Xiu et al., 2020).

La proteína S está dividida en dos regiones funcionales S1 de fijación y S2 de fusión (Figura 4A-C). La región S1 tiene un tamaño de 14-685 residuos y la región S2 consiste en 685-1273 residuos; dentro de la región S1 se encuentra un dominio de amino terminal (NTD) y un dominio de unión a receptor (RBD). Por otro lado, la región S2 se compone de un péptido de fusión (FP), dos heptapéptidos repetidos de fusión (HR1 y HR2), un dominio conector (CD), un dominio transmembranal (TM) y una cola citoplasmática.

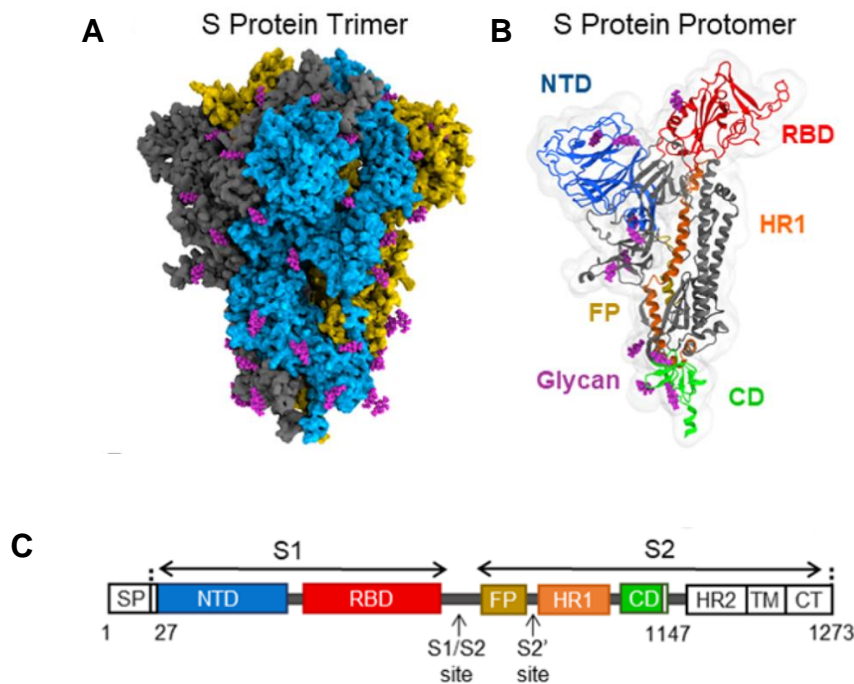


Figura 4. Estructura cristalizada de la proteína S del SARS-CoV-2. **A)** Complejo trimérico formado por tres cadenas idénticas en color amarillo, azul y gris. **B)** Representación de las regiones en un monómero de la proteína S: NTD (azul), RBD (rojo), HR1 (naranja), FP (amarillo), CD (verde) y glicanos (morado). **C)** Dominios de la proteína S. Tomado y modificado de: Gur, M., Taka, E., Yilmaz, S. Z., Kilinc, C., Aktas, U., & Golcuk, M. (2020). Conformational transition of SARS-CoV-2 spike glycoprotein between its closed and open states. *Journal of Chemical Physics*, 153(7).

La región S2 es responsable de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped. El péptido de fusión es un segmento corto de 15-20 aminoácidos conservados de la familia *Coronaviridae*, compuesta principalmente por residuos hidrofóbicos, como la glicina (Gly) o alanina (Ala), dichos aminoácidos se anclan en la membrana celular cuando la región S2 queda

expuesta. Se ha demostrado que el péptido de fusión juega un papel esencial en la fusión membranal al conectar ambas bicapas lipídicas (Tang et al., 2020).

La región S1 reconoce al receptor enzima convertidora de angiotensina (ACE2) de las células pulmonares hospederas y se une a ACE2, como una llave que se inserta en una cerradura, antes de la entrada e infección de las células por el virus (Figura 5). Por lo tanto, ACE2 actúa como una puerta celular, un receptor, para el virus que causa COVID-19 (Huang et al., 2020; Tang et al., 2020).

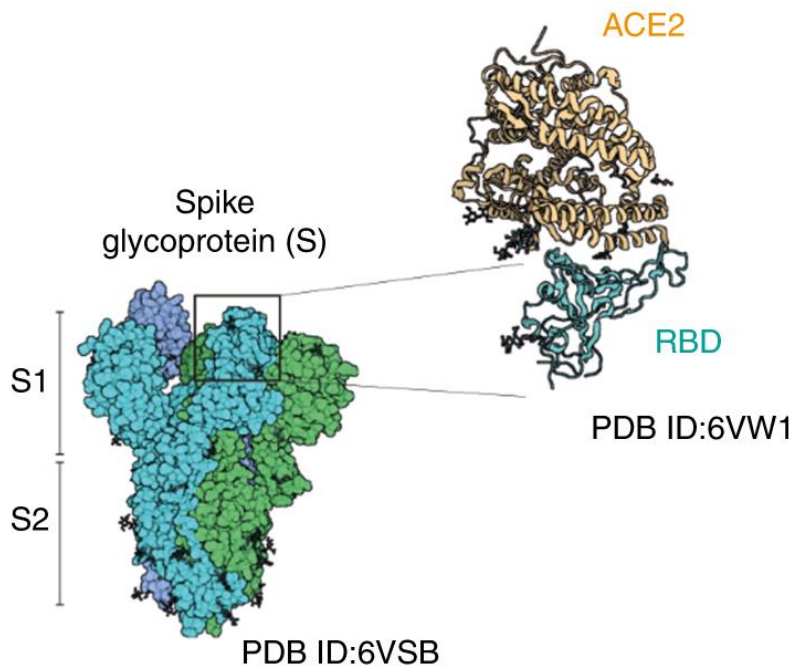


Figura 5. Unión de la proteína S con el receptor ACE2.

Tomado y modificado de: Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W., & Liu, S. wen. (2020). *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. Acta Pharmacologica Sinica, 41(9), 1141–1149.*

La proteína S se considera como una proteína de fusión de clase I, dicho con otras palabras, la proteína S sufre un cambio conformacional en el proceso de fusionar la envoltura viral con la membrana de la célula huésped. Este proceso se activa cuando la región S1 se une al receptor ACE2 de la célula huésped (Gur et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Por consiguiente, la unión entre el receptor de la célula huésped y la proteína S desestabiliza el trímero de prefusión, lo que resulta en el desprendimiento de la región S1 y la exposición de la región S2 en una conformación posfusión más estable. Cabe mencionar que el

desprendimiento de la región S1 se lleva a cabo en presencia de proteasas celulares (Walls et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Por lo tanto, la proteína S tiene dos conformaciones una “abierta” y una “cerrada”, la conformación cerrada se caracteriza por no tener expuesto el dominio RBD del complejo trimétrico, lo que hace que esta conformación sea más estable y menos infectiva. En cambio, la conformación abierta, que es menos estable, tiene mayor infectividad debido a que el dominio RBD está expuesto (Figura 6), facilitando la unión entre el receptor ACE2 y el dominio RBD (Berger & Schaffitzel, 2020).

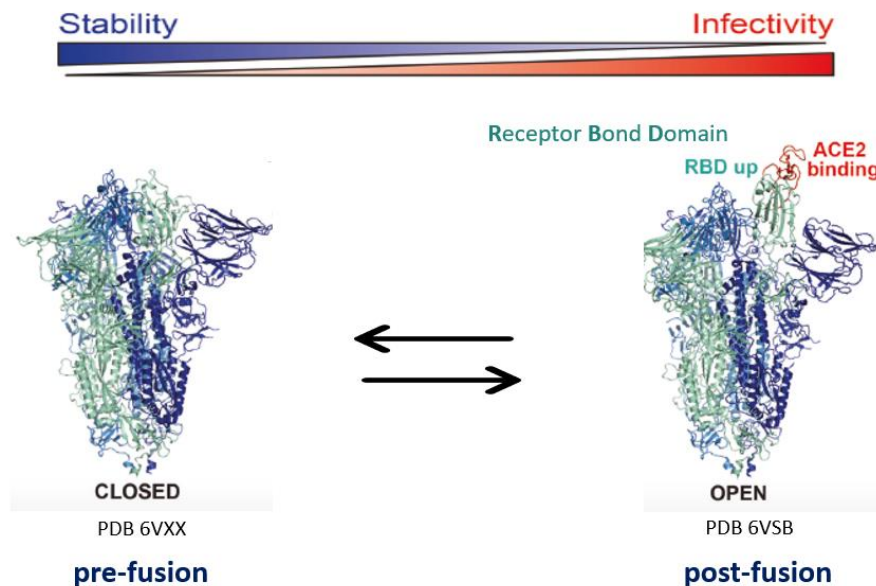


Figura 6. Equilibrio entre conformaciones “cerrada” y “abierta” de la proteína S. Tomado y modificado de: Berger, I., & Schaffitzel, C. (2020). *The SARS-CoV-2 spike protein: balancing stability and infectivity*. *Cell Research*, 30(12), 1059–1060.

En conjunto, las conformaciones de la proteína S forman el motivo mediante el cual el virus SARS-CoV-2 se une al receptor ACE2 de las células pulmonares de los mamíferos, lo que provoca la liberación de material genético de RNA viral endógeno en la célula huésped. La región S2 es altamente hidrofóbica, y por ello, esta región es responsable de la fusión con la membrana de la célula hospedera. En términos terapéuticos, la proteína viral S es potencialmente susceptible de ser bloqueada por fármacos *ad-hoc*.

2.3 Proteínas medicables

Aproximadamente el 10% del genoma humano representa a dianas farmacológicas para agentes terapéuticos, sólo la mitad de ellas han sido caracterizadas como importantes en el desarrollo de alguna enfermedad (Agoni et al., 2020; Hopkins & Groom, 2002). Las dianas terapéuticas más comunes se indican en la Figura 7.

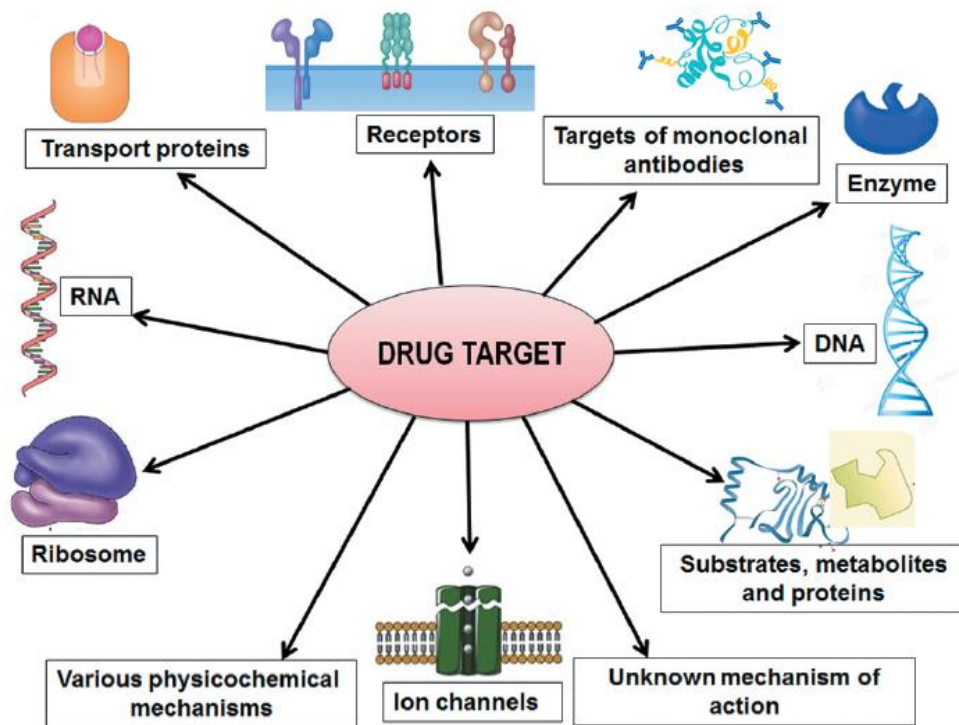


Figura 7. Dianas terapéuticas más comunes.

Tomado de: Chakraborty, C., Bhattacharya, M., Mallick, B., Sharma, A. R., Lee, S. S., & Agoramorthy, G. (2021). SARS-CoV-2 protein drug targets landscape: a potential pharmacological insight view for the new drug development. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 14(2), 225–238.

A principios de los años 2000's, el término "medicable" se empleó para identificar alrededor de 30,000 genes en el genoma humano que codifican para proteínas relacionadas con enfermedades las cuales se pueden modular mediante compuestos candidatos a fármacos. El término "proteína medicable" involucra conceptos experimentales y/o teóricos para entender la interacción fármaco-proteína (Hopkins & Groom, 2002). Gracias a este término novedoso se han

derivado términos relacionados a la medicabilidad de una proteína tales como; ligabilidad, sitio de unión medicable y sitios señuelo (Abi Hussein et al., 2017; Hajduk et al., 2005). Los términos mencionados tienen relación con la predicción e identificación de potenciales sitios de unión a fármacos de una proteína.

El término ligabilidad se refiere a la capacidad de un ligando o molécula pequeña para unirse a una proteína, independientemente si son o no candidatos a fármacos. El sitio de unión medicable se emplea para referirse a un “bolsillo” en donde se une una molécula candidata a fármaco con gran afinidad, este sitio también se caracteriza por tener actividad reguladora de una proteína. Finalmente, el sitio señuelo se ha identificado mediante algún algoritmo computacional, este término aplica para proteínas que tienen más de un sitio alostérico (Hajduk et al., 2005).

En pocas palabras, la medicabilidad de una proteína es la capacidad de una diana farmacológica para unirse a una molécula exógena de bajo peso molecular con alta afinidad. Por lo tanto, esta propiedad es importante para el reconocimiento molecular y las propiedades del sitio de unión de la diana terapéutica (Yuan et al., 2013). La medicabilidad es una medida útil, porque puede contribuir como un estudio predictivo en el descubrimiento de nuevos fármacos (Vukovic & Huggins, 2018).

Generalmente las proteínas medicables contienen más de un sitio de unión en su superficie, es decir, sitios reguladores (sitios alostéricos) por lo que es importante identificarlos. Estos sitios se caracterizan por ser cavidades cóncavas ubicadas en la superficie de la proteína, dentro de estas cavidades, en su mayoría, se encuentran aminoácidos de tipo no polar creando un ambiente hidrofóbico, o bien aminoácidos aceptores y/o donadores de puente de hidrógeno, lo que ayuda a la estabilización del ligando en el sitio de unión (Surade & Blundell, 2012; Yuan et al., 2013).

Los sitios medicables se pueden determinar experimentalmente por resonancia magnética nuclear (NMR), por difracción de rayos X y/o criomicroscopía electrónica (Figura 8).

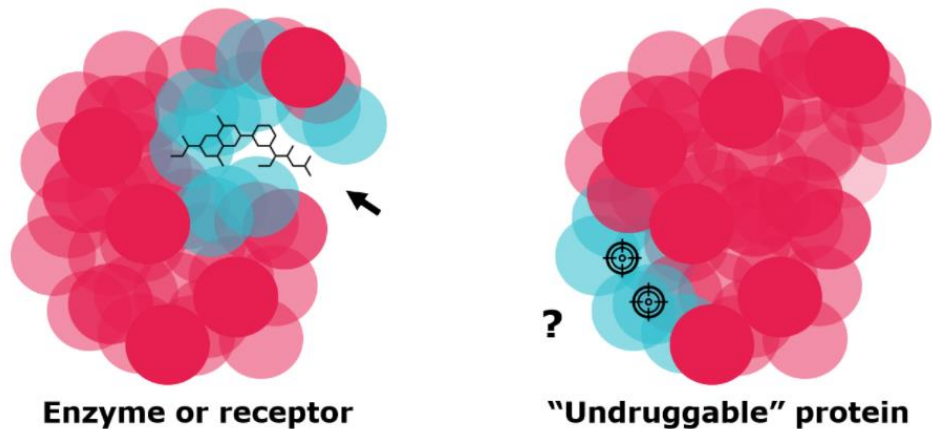


Figura 8. Proteínas medicables y no medicables.

Tomado de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/pharmacology-and-drug-discovery-research/ligandability>.

Para evaluar la medicabilidad de una diana terapéutica se han desarrollado varias herramientas computacionales basadas en la estructura 3D de dicha diana. Estas herramientas se basan en algoritmos informáticos que consideran las características estructurales de una proteína previamente determinadas por rayos X y/o criomicroscopía electrónica. Entre los algoritmos más utilizados están: DOGSiteScorer, Metapocket, PockDrugServidor, SiteMap, Sitehound y Open Targets (Abi Hussein et al., 2017; Hajduk et al., 2005).

La predicción de sitios medicables se emplea fundamentalmente en el estudio de proteínas reguladoras de alguna enfermedad, o bien en proteínas que no cuentan con un sitio de unión definido. Estos estudios son aplicables para el desarrollo de inhibidores enzimáticos o agonistas/antagonistas de receptores, también tienen el propósito de diseñar nuevos fármacos y minimizar efectos secundarios de los fármacos.

2.4 Enfoques terapéuticos contra la COVID-19

A diferencia de las vacunas que pueden prevenir infecciones, los antivirales actúan como una segunda línea de defensa, ralentizando y, finalmente, deteniendo la progresión de una enfermedad cuando se producen infecciones.

También son importantes cuando no se dispone de vacunas eficaces contra las enfermedades virales, como es el caso del VIH, la hepatitis C y el herpes.

Desarrollar antivirales es una tarea costosa y difícil. Eso es especialmente cierto para las enfermedades respiratorias agudas, para las que la ventana de tratamiento es corta. En el caso del SARS-CoV-2, el coronavirus que ha desencadenado la devastadora pandemia COVID-19, los investigadores han recurrido a la reutilización de fármacos antivirales existentes, con perfiles de seguridad conocidos, inmunomoduladores y terapias adyuvantes.

2.4.1. Antivirales disponibles

Estudios preclínicos y clínicos indican que cloroquina, nafamostat, lopinavir/ritonavir, remdesivir, umifenovir (Arbidol®) y Favipiravir todos ellos interaccionan con algunas proteínas del virus SARS-CoV-2 y/o de la célula hospedera (Figura 9) (Sahebnasagh et al., 2020; Shyr et al., 2020).

La cloroquina o hidroxicloroquina se utiliza contra la malaria y para enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico (Sahebnasagh et al., 2020). La cloroquina impide la acidificación endosomal necesaria para la fusión de virus con la membrana celular. Recientemente se ha reportado que la cloroquina puede inhibir el flujo autofágico (Figura 9), de esta forma puede impedir la replicación viral (Sahebnasagh et al., 2020; Shyr et al., 2020).

El Nafamostat es un ejemplo de inhibidor de la TMPRSS2. El nafamostat puede impedir la entrada del virus SARS-CoV-2 antes de la fusión membranal (Figura 9), éste fármaco se utiliza como tratamiento de la pancreatitis sin efectos adversos importantes, también puede tener propiedades antiinflamatorias que podrían ayudar a los pacientes con COVID-19 grave (Sahebnasagh et al., 2020; Shyr et al., 2020).

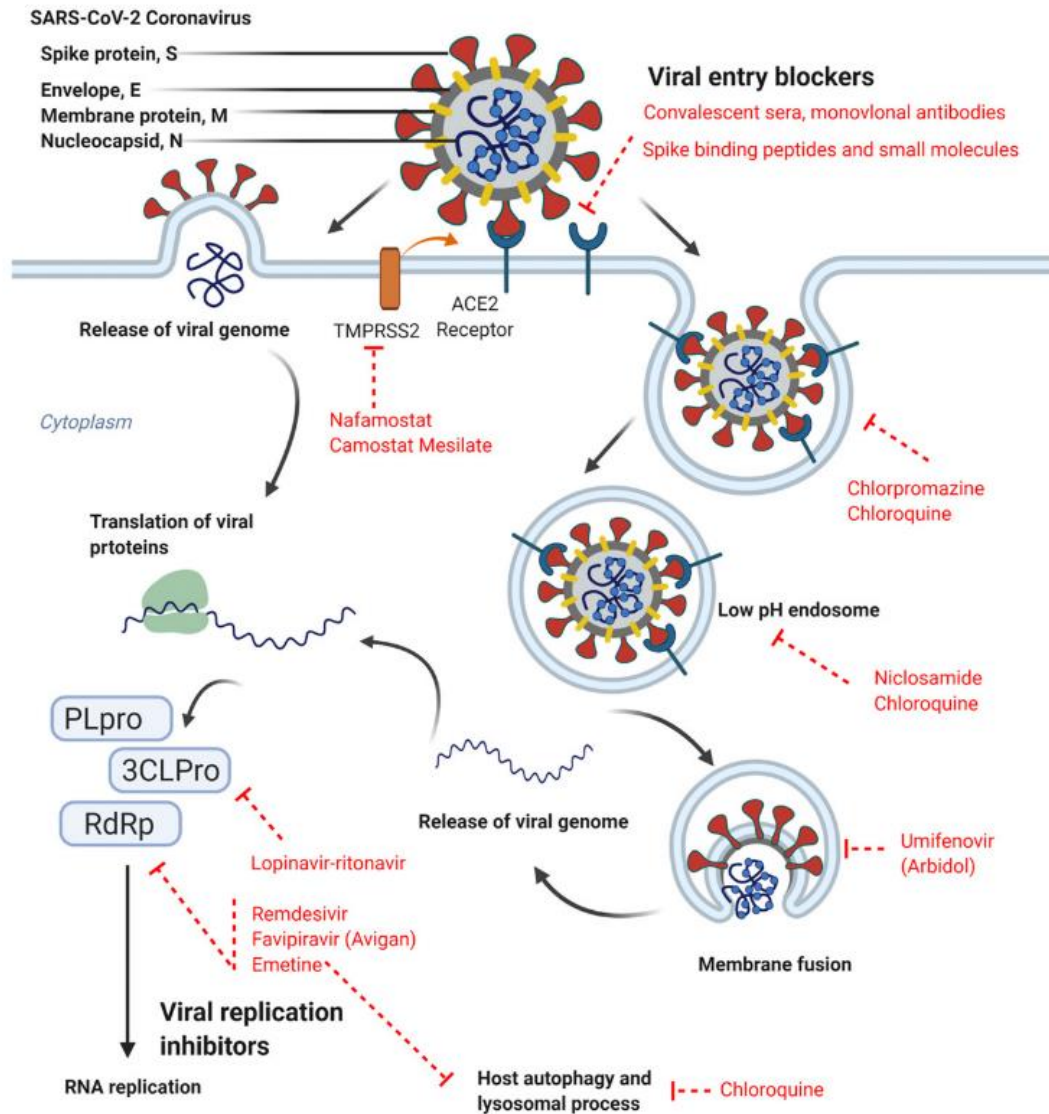


Figura 9. Blancos farmacológicos del virus SARS-CoV-2.

Tomado de: Shyr, Z. A., Gorshkov, K., Chen, C. Z., & Zheng, W. (2020). Drug discovery strategies for sars-cov-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 375(1), 127–138.

El caso del remdesivir es un profármaco análogo de nucleósido de adenosina. La forma activa del remdesivir puede inhibir la replicación del ARN viral actuando sobre la ARN polimerasa viral (Figura 9). Inicialmente fue desarrollado para el tratamiento de la infección por el virus del Ébola, pero también se utiliza para tratar el virus de Marburg, el MERS y el SARS-CoV-1 (Lamb, 2020; Sahebnaasagh et al., 2020).

La combinación Lopinavir/Ritonavir se utiliza principalmente para tratar la infección por VIH. Ambos fármacos son inhibidores de la 3CLpro (Figura 9). Sin embargo, el mecanismo del Lopinavir/Ritonavir para el tratamiento de la COVID-19 aun no es claro. Dado que los coronavirus, incluido el SARS-CoV-2, sintetizan poliproteínas de hidrólisis para mantener sus proteínas funcionales, se sugiere que el Lopinavir/Ritonavir puede bloquear el ciclo de multiplicación viral al inhibir las proteasas (Gil et al., 2020; Sahebnaasagh et al., 2020; Shyr et al., 2020).

Finalmente, el Umifenovir (Arbidol) es una molécula con un núcleo indólico de bajo peso molecular que tiene una actividad antiviral de amplio espectro contra los virus de ADN y ARN. Se ha demostrado que el Arbidol puede inhibir la entrada de los virus a la célula (Vankadari, 2020). El Arbidol se emplea para tratar las enfermedades ocasionadas por los virus de la influenza A y B, de la hepatitis C, y los virus del Zika y Dengue, bloqueando directamente la fusión membranal (Boriskin et al., 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que el Arbidol es eficaz contra el SARS-CoV-1 (Boriskin et al., 2008; Teissier et al., 2011).

El Arbidol puede inhibir de manera eficiente la replicación del SARS-CoV-2 por lo que se ha sugerido como un antiviral de elección para el tratamiento de la Covid-19 (Gil et al., 2020; Sahebnaasagh et al., 2020; Wang et al., 2020). Recientemente se han realizado estudios de modelado molecular, en donde se demuestra que algunas proteínas del SARS-CoV-2, como la proteína S, la proteína E, el complejo Nsp7-Nsp8, Nsp14 y Nsp15 pueden interactuar con el Arbidol (Sahebnaasagh et al., 2020).

2.4.2 Inmunomoduladores y terapias adyuvantes

Las terapias con inmunomoduladores tienen como objetivo eliminar la propia reacción inmunitaria del paciente al virus, en los casos en que la reacción del cuerpo básicamente se excede y comienza a atacar los propios órganos del paciente. Las terapias con anticuerpos neutralizantes pueden ayudar a las personas a combatir el virus e incluyen anticuerpos fabricados, terapias con anticuerpos de origen animal y productos derivados de la sangre, como plasma

de convalecencia y globulina hiperinmune, que contienen anticuerpos extraídos de personas que previamente han tenido COVID-19 (Shyr et al., 2020).

Los productos de terapia celular incluyen inmunoterapias celulares y otros tipos de células autólogas y alogénicas, como células madre y productos relacionados. Finalmente, los productos de terapia genética buscan modificar o manipular la expresión de un gen o alterar las propiedades biológicas de las células vivas para uso terapéutico.

La importancia de la diversidad de enfoques terapéuticos que se están investigando actualmente se debe a la posibilidad de ampliar rápidamente la comprensión del efecto de diferentes categorías de tratamientos potenciales. La asociación Aceleración de Intervenciones Terapéuticas y Vacunas COVID-19 (ACTIV), coordinada por la Fundación para los Institutos Nacionales de Salud (FNIH), proporciona experiencia en la materia y/o financiación para identificar, priorizar y facilitar la entrada de algunos de los candidatos más prometedores en ensayos clínicos.

2.5 Importancia farmacológica de los indoles

El núcleo indólico es un farmacóforo versátil, un andamio privilegiado y un compuesto heterocíclico destacado con un amplio rango de actividades farmacológicas debido a sus diferentes mecanismos de acción. En los últimos años se han realizado numerosas investigaciones para sintetizar y explorar las diversas perspectivas terapéuticas de esta molécula (Kumari & Singh, 2019).

El indol es una molécula bicíclica plana que contiene 10 electrones π (8 electrones en los carbonos del sistema aromático y 2 en el par de electrones del nitrógeno del pirrol), por lo que es un compuesto aromático de acuerdo con la regla de Hückel (Chadha & Silakari, 2017). El indol se puede encontrar en hormonas como la serotonina y la melatonina o como en el aminoácido esencial el triptófano (Figura 10).

Actualmente existe una amplia gama de fármacos que poseen un núcleo indólico,

ya sea de origen natural o sintético para el tratamiento de diversas enfermedades (Kumari & Singh, 2019). Sin embargo, a pesar de la información existente del indol y sus derivados, su importancia en el diseño de fármacos y en la farmacología, aún no se ha desarrollado el potencial de las moléculas basadas en indol.



Figura 10. Estructura química del triptófano, serotonina y melatonina.

Tomado de: Chadha, N., & Silakari, O. (2017). *Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. European Journal of Medicinal Chemistry, 134*, 159–184.

Las moléculas que contienen un núcleo indólico se usan ampliamente en el desarrollo de fármacos antivirales. Algunos ejemplos de medicamentos antivirales con núcleo indólico que actualmente se utilizan o están en fases experimentales incluyen; Arbidol, Delavirdina, Ateviridina, Panobinostat, Golotimod y Fosdevirina (Figura 11) (Zhang et al., 2015).

El propósito del diseño de fármacos antivirales es identificar proteínas virales con potencial medicable o bien que sean claves durante la replicación viral. Las proteínas con potencial medicable pueden ser comunes en otros virus, o incluso entre diferentes especies de virus de la misma familia, en otra palabras, un solo fármaco podría ser de amplio espectro al tener una amplia eficacia (Dorababu, 2020).

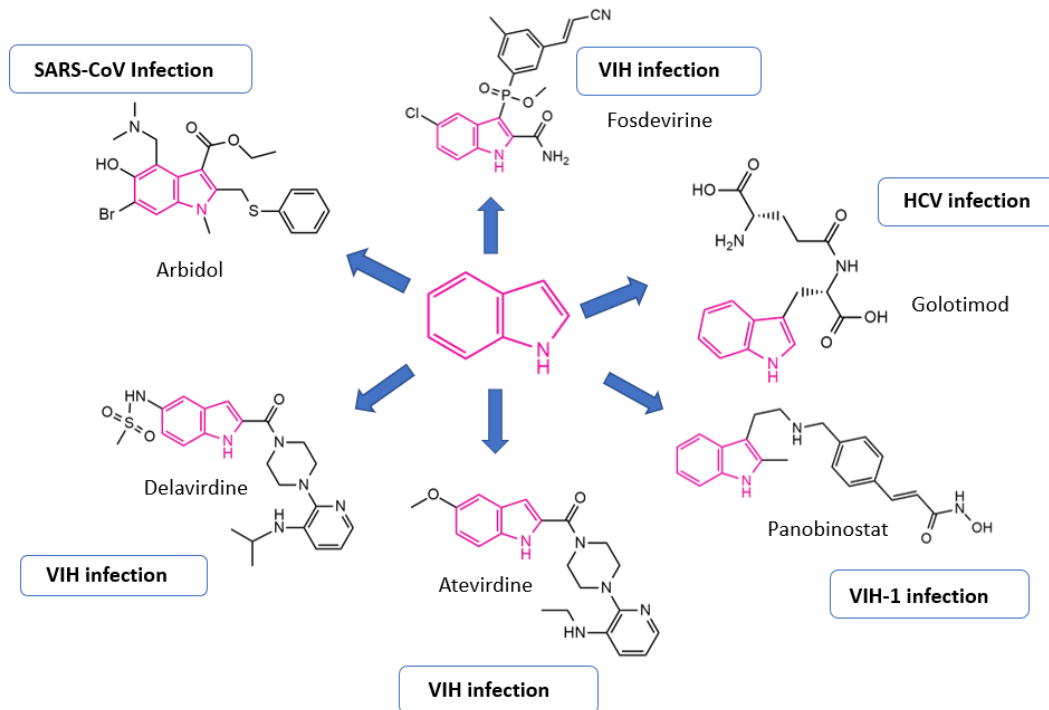


Figura 11. Algunos antivirales con núcleo indólico en su estructura.

Tomado y modificado de: Zhang, M. Z., Chen, Q., & Yang, G. F. (2015). A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 421–441.

2.6 Diseño de fármacos

El descubrimiento de fármacos modernos involucra a la química medicinal mediante la identificación de moléculas líderes, el objetivo principal de ésta rama de la farmacología es la optimización estructural de fármacos, lo que conlleva un aumento de su afinidad, selectividad (reducción del potencial de efectos secundarios), eficacia/potencia, estabilidad metabólica (aumento de la vida media) y biodisponibilidad (Zhou & Zhong, 2017).

El descubrimiento de fármacos es el proceso inventivo de encontrar nuevos medicamentos basados en el conocimiento de un objetivo biológico. En el sentido más básico, el diseño de fármacos implica el diseño de moléculas que son complementarias a la diana molecular con la que interactúan. El diseño de fármacos se basa en técnicas de modelado informático y enfoques bioinformáticos.

2.6.1 Estudios computacionales

El diseño de fármacos asistido por computadora es una herramienta que se basa en programas informáticos y bases de datos, es útil para el almacenamiento, análisis y modelado de compuestos novedosos, el objetivo principal de esta herramienta es evaluar sistemáticamente a compuestos candidatos a fármacos. Las herramientas computacionales abarcan desde la identificación y validación de la diana terapéutica hasta la predicción de estudios preclínicos (Figura 12), los estudios computacionales podrían reducir el costo del desarrollo de medicamentos hasta un 50% (Ou-Yang et al., 2012).

Los estudios computacionales se pueden clasificar en dos grandes categorías; métodos basados en la estructura de la diana terapéutica o bien, basados en el ligando o sustrato. Uno de los métodos basados en la diana terapéutica es el acoplamiento molecular (docking molecular) este método consiste en evaluar la interacción o acoplamiento de dos moléculas de interés, es útil para predecir como una enzima o receptor interaccionan con un sustrato o ligando respectivamente (Lin et al., 2020; Mikhailov et al., 2016).

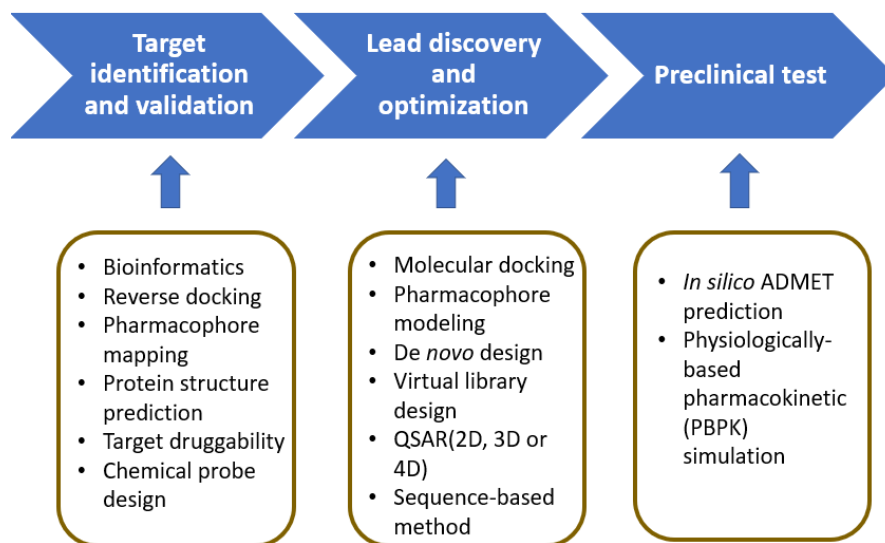


Figura 12. Métodos computacionales.

Tomado y modificado de: Ou-Yang, S. S., Lu, J. Y., Kong, X. Q., Liang, Z. J., Luo, C., & Jiang, H. (2012). *Computational drug discovery*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(9), 1131–1140.

En cuanto a los métodos basados en los ligandos, se encuentran los estudios de relación cuantitativa estructura actividad (QSAR) y modelado farmacofórico. Estos estudios pueden proporcionar información fundamental sobre la naturaleza de las interacciones entre las dianas terapéuticas y compuestos candidatos a fármacos, lo que permite una predicción de modelos adecuados para el descubrimiento y la optimización de compuestos candidatos a fármacos (Lin et al., 2020; Ou-Yang et al., 2012).

3. Justificación

La proteína S del SARS-CoV-2 es una diana terapéutica prometedora, por lo que resulta importante analizar su capacidad medicable mediante la predicción de sus potenciales sitios de unión y la aptitud para reconocer moléculas pequeñas capaces de bloquear la unión de esta proteína con su receptor.

4. Hipótesis

La predicción de sitios medicables y la elaboración de perfiles energéticos de la proteína S del SARS-CoV-2 con una familia de indol-2-carboxamidas proporcionará información sobre las propiedades estructurales y fisicoquímicas que afectan la unión de dichos indoles con la proteína S, orientando los cambios estructurales necesarios para su optimización e integración como candidatos a fármacos contra la COVID-19.

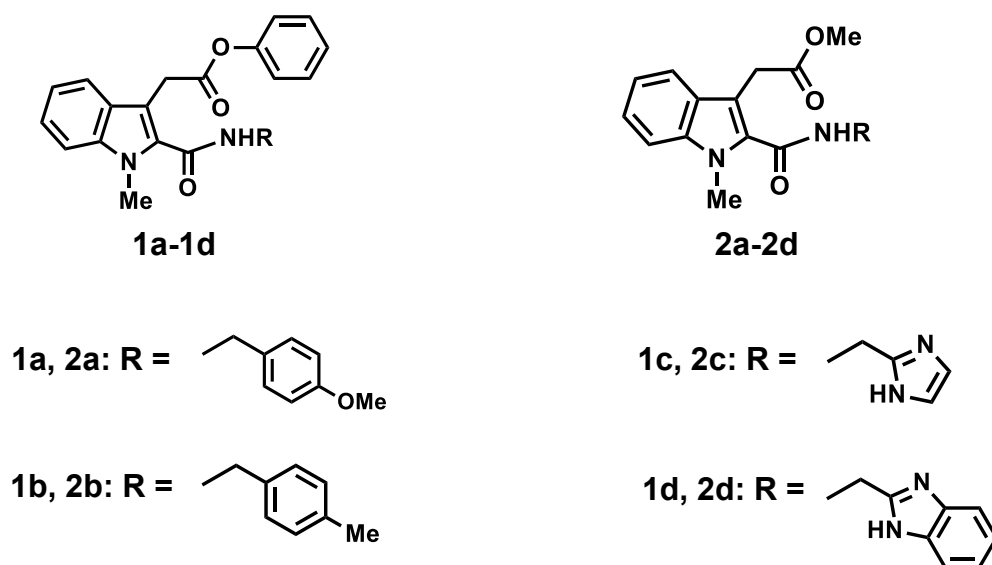
5. Objetivo general

Examinar el potencial medicable de la proteína S mediante la predicción de sus sitios de unión y su disponibilidad para unirse a las indol-2-carboxamidas.

6. Objetivos específicos

- Estimar *in silico* las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de química medicinal de las indol-2-carboxamidas.

- Predecir la conformación de mínima energía global de las indol-2-carboxamidas.
- Predecir los sitios de unión con potencial medicable de la proteína S.
- Estimar la energía de unión de los complejos indol-2-carboxamida/proteína S formados y analizar las interacciones relevantes entre los ligandos y los residuos de aminoácidos.
- Seleccionar las mejores estructuras que serán sintetizadas.



Esquema 1. Estructura de las indol-2-carboxamidas.

7. Metodología

7.1 Ligando

El análisis de los parámetros fisicoquímicos, farmacocinéticos y de química medicinal para las indol-2-carboxamidas se realizó utilizando la plataforma informática SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina et al., 2017).

La búsqueda conformacional se realizó mediante el programa Spartan '14, empleando el algoritmo de Monte Carlo con el método campo de fuerza mecánica molecular en fase acuosa (MMFFaq), seguido del método Single Point Energy, empleando el nivel de cálculo B3LYP/6-31G* en fase acuosa. La selección de los

confórmeros se realizó por comparación geométrica, valor energético y su contribución a la distribución de Boltzmann. Finalmente, la optimización geométrica de los confórmeros seleccionados de mínima energía se llevó a cabo mediante el programa Gaussian '09 empleando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) a nivel de cálculo B3LYP/6-31G+(d,p) en fase acuosa.

7.2 Proteína

Se utilizó la estructura tridimensional de la proteína S descrita en el Banco de Datos de Proteínas con el código PDB:6VXX (conformación cerrada). La predicción de los potenciales sitios de unión P a fármacos de la proteína S y su potencial medicable se llevó a cabo mediante el uso de la plataforma informática Proteins Plus (<https://proteins.plus/>) (Volkamer et al., 2012). El estudio docking dirigido, manteniendo el ligando flexible (**2a-2d**) y el receptor rígido (proteína S), se realizó utilizando el programa AutoDock4. Finalmente, para generar representaciones en 2D de la orientación de las indol-2-carboxamidas en las cavidades de la proteína S y su interacción con los residuos de aminoácidos se utilizó el visualizador Ligplot.

8. Resultados y discusión

8.1 Predicción de propiedades fisicoquímicas, lipofilia, farmacocinética, similitud con los fármacos y química medicinal

El desarrollo de nuevos candidatos a fármacos es realmente un proceso muy caro que consume tiempo y esfuerzo. Por tanto, el uso de métodos que sean capaces de predecir las importantes propiedades fisicoquímicas, y farmacocinéticas de los fármacos de manera rápida y precisa, antes de ser sintetizados, es muy relevante. En ese contexto, los modelos informáticos constituyen alternativas válidas a los experimentos.

El modelo informático SwissADME, que hace uso de modelos predictivos rápidos pero robustos, genera aproximaciones de parámetros fisicoquímicos, lipofilia,

farmacocinéticos y de similitud con fármacos, que caracterizan a aquellos fármacos que se administran por vía oral y que influyen en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).

El programa SwissADME hace uso de gráficas tipo radar para describir la biodisponibilidad oral de un potencial fármaco, en tanto que para describir la absorción gastrointestinal y la penetración de la barrera hematoencefálica usa gráficas conocidas como «BOILED-Egg». El transporte activo de fármacos se predice mediante la determinación *in silico* de la interacción con la glicoproteína P (P-gp) y/o con enzimas CYP450 (Daina et al., 2017; Daina & Zoete, 2016).

8.1.1 Propiedades fisicoquímicas y gráfico de biodisponibilidad

Con base en la estimación de seis propiedades fisicoquímicas de una molécula candidata a fármaco, la plataforma SwissADME construye un gráfico de tipo radar (Figura 13) que predice la biodisponibilidad oral de dicha molécula (Daina et al., 2017).

- La lipofilicidad, que influye en la absorción y penetración de barreras biológicas y se determina mediante el coeficiente de partición o logP.
- El tamaño molecular, que se determina mediante el peso molecular.
- La polaridad, que influye en la disolución de fluidos corporales y se determina mediante el área topológica de superficie polar o TPSA.
- La solubilidad en agua, que al igual que la polaridad, determina la disolución del fármaco en el organismo.
- La saturación, que se determina mediante el número de carbonos con hibridación sp³.
- La flexibilidad, que está dada por el número de enlaces rotables.

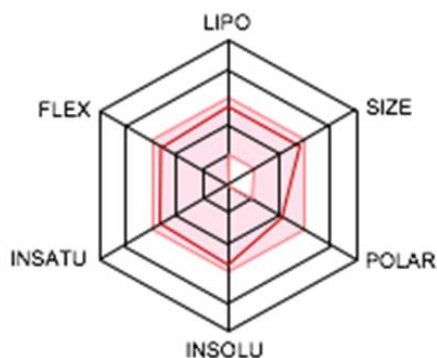
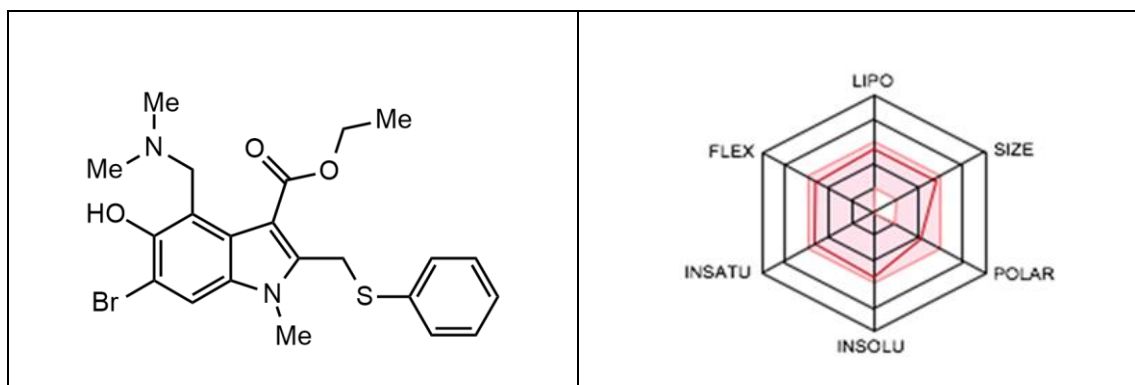


Figura 13. Gráfico de biodisponibilidad tipo radar. El área rosa indica el límite que puede tener cada propiedad de la molécula.

Tomado de: *Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Scientific Reports, 7(January), 1–13.*

A continuación, se presentan los resultados de la estimación de la biodisponibilidad oral de las indol-2-carboxamidas **1a-1d**, **2a-2d** y del compuesto de referencia Arbidol®, haciendo uso del gráfico de biodisponibilidad tipo radar (Tablas 2-4). En tanto que los parámetros fisicoquímicos que permiten construir los gráficos se indican en las Tablas 5 y 6.

Tabla 2. Gráfico de biodisponibilidad del Arbidol®



Como puede observarse en los gráficos de biodisponibilidad respectivos, el Arbidol® cumple con todos los parámetros analizados (Tabla 2), en tanto que las carboxamidas **1a-1d** (Tabla 3) y **2a-2d** (Tabla 4) cumplen con al menos cinco de los seis parámetros fisicoquímicos. En estos casos, el parámetro de índice de insaturación se encuentra por debajo del límite establecido de 0.25 (Tablas 5 y 6).

Tabla 3. Gráfico de biodisponibilidad de las indol-2-carboxamidas **1a-1d**.

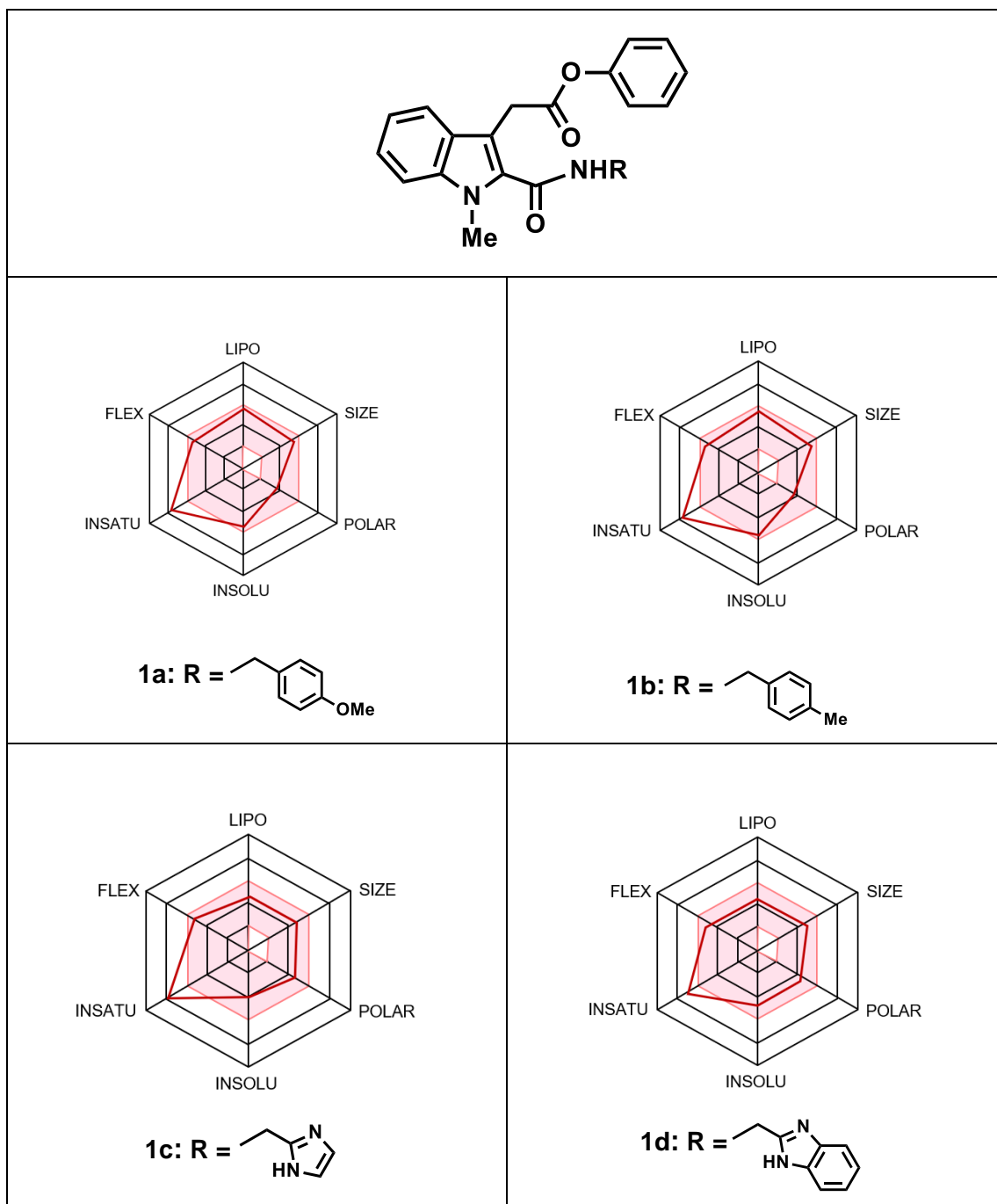


Tabla 4. Gráfico de biodisponibilidad de las indol-2-carboxamidas **2a-2d**.

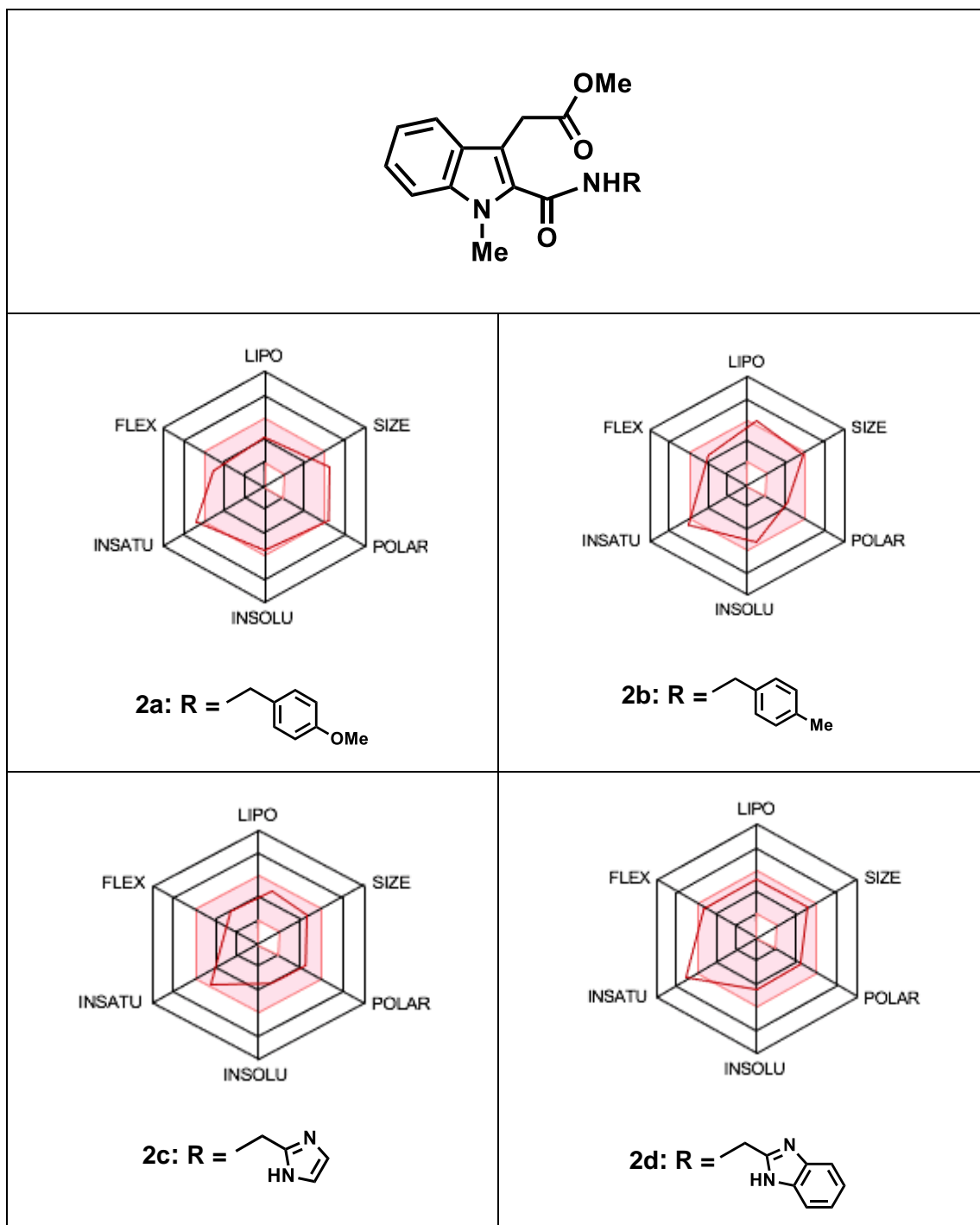


Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del Arbidol® y las indol-2-carboxamidas **1a-1d**

Propiedades fisicoquímicas	Arbidol®	1a	1b	1c	1d
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₂₅ BrN ₂ O ₃ S	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₄	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₃	C ₂₂ H ₂₀ N ₄ O ₃	C ₂₆ H ₂₂ N ₄ O ₃
Peso molecular, g/mol	477.41	428.48	412.48	388.42	438.48
Átomos aromáticos	15	21	21	20	24
Fracción Csp ³	0.32	0.15	0.15	0.14	0.12
Enlaces rotables	8	9	8	8	8
Aceptores de puentes de H (HBA)	4	4	3	4	4
Donadores de puentes de H (HBD)	1	1	1	2	2
Log P _{o/w}	4.87	4.11	4.41	2.83	3.98
TPSA, Å ²	80.00	69.56	60.33	89.01	89.01
Accesibilidad sintética	3.57	3.17	3.12	2.90	3.13

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las indol-2-carboxamidas **2a-2d**

Propiedades fisicoquímicas	2a	2b	2c	2d
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₃	C ₂₁ H ₂₀ N ₄ O ₃
Peso molecular g/mol	366.41	350.41	326.35	376.41
Átomos aromáticos	15	15	14	18
Fracción Csp ³	0.24	0.24	0.24	0.19
Enlaces rotables	8	7	7	7
Aceptores de puentes de H (HBA)	4	3	4	4
Donadores de puentes de H (HBD)	1	1	2	2
Log P _{o/w}	2.68	2.98	1.39	2.55
TPSA, Å ²	69.56	60.33	89.01	89.01
Accesibilidad sintética	2.81	2.79	2.58	2.80

8.1.2 Propiedades farmacocinéticas

Alrededor de una docena de isoenzimas CYP450 son principalmente responsables de la oxidación y metabolismo de una gran cantidad de xenobióticos y compuestos endógenos. En tanto que la glicoproteína P (P-gp) es uno de los transportadores que determina la captación y la salida de fármacos. Se cree que junto con la familia de enzimas CYP, la expresión concomitante de P-gp es una adaptación evolutiva importante contra sustancias potencialmente tóxicas, logrando procesar moléculas pequeñas de forma sinérgica para mejorar la protección del organismo (Daina et al., 2017; Ferreira & Andricopulo, 2019).

Se estima que entre el 50-90% de los fármacos son sustratos de cinco principales isoformas del CYP450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). La inhibición de dichas isoenzimas puede inducir interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco, que son una de las causas más comunes de las reacciones adversas de los medicamentos, y provocar así efectos tóxicos por acumulación del fármaco o sus metabolitos en el organismo (Burton et al., 2012; Daina et al., 2017).

Mediante el uso de la plataforma SwissADME se realizó la construcción de modelos predictivos de algunas propiedades farmacocinéticas de las indol-2-carboxamidas **1a-1d**, **2a-2d** y del compuesto de referencia Arbidol® como son la absorción gastrointestinal, la interacción con P-gp y/o con enzimas CYP450.

El análisis de resultados indicó que la absorción gastrointestinal (GI) y la biodisponibilidad de **1a**, **1b**, **1d** y el Arbidol® es alta. Sin embargo, los compuestos **1a-1d** y **2a-2d** son metabolizados por al menos una isoforma del CYP450, por lo que su biodisponibilidad podría verse comprometida. Así mismo, **1c**, **1d**, **2c** y **2d** son sustratos de la P-gp por lo que su distribución al compartimiento intracelular podría estar limitado (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Propiedades farmacocinéticas del Arbidol® y de **1a-1d**

Propiedades farmacocinéticas	Arbidol	1a	1b	1c	1d
Absorción GI	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Sustrato de la P-gp	No	No	No	Si	Si
Inhibidor de CYP1A2	No	No	No	Si	Si
Inhibidor de CYP2C9	Si	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP2C19	Si	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP2D6	Si	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP3A4	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla 8. Propiedades farmacocinéticas de **2a-2d**

Propiedades farmacocinéticas	2a	2b	2c	2d
Absorción GI	Alta	Alta	Alta	Alta
Sustrato de la P-gp	No	No	Si	Si
Inhibidor de CYP1A2	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de CYP2C9	Si	Si	No	Si
Inhibidor de CYP2C19	Si	Si	No	Si
Inhibidor de CYP2D6	Si	Si	No	Si
Inhibidor de CYP3A4	Si	Si	No	Si

8.1.3 Lipofilia, «BOILED-Egg» o gráfica del huevo cocido

Aparte de la eficacia y la toxicidad, muchos fracasos en el desarrollo de fármacos son imputables a una farmacocinética y biodisponibilidad deficientes. La absorción gastrointestinal y el acceso al cerebro son dos comportamientos farmacocinéticos cruciales para ser estimados en varias etapas de los procesos de descubrimiento de fármacos. Con este fin, se propone el método de permeación de estimulación cerebral o intestinal (Brain Or Intestinal Estimated: BOILED-Egg) como un modelo predictivo preciso que funciona calculando la lipofilia y la polaridad de moléculas pequeñas (Topological Polar Surface Area: TPSA). El descriptor molecular TPSA ha sido ampliamente utilizado en el estudio de las propiedades de transporte de fármacos y consiste en la suma de las contribuciones al área de superficie molecular (generalmente de van der Waals) de átomos polares como el oxígeno, el nitrógeno y sus hidrógenos adjuntos. El modelo BOILED-Egg se puede aplicar en una variedad de entornos, desde el filtrado de bibliotecas químicas en los primeros pasos del descubrimiento de fármacos, hasta la evaluación de fármacos candidatos para el desarrollo (Daina & Zoete, 2016).

Este gráfico predice y analiza las propiedades de absorción de un potencial fármaco al relacionar dos propiedades fisicoquímicas como son el coeficiente de partición entre *n*-octanol y agua dado como WlogP (descriptor clásico de lipofilia) y la polaridad dada como TPSA (Daina et al., 2017; Daina & Zoete, 2016).

La región blanca del gráfico es el espacio fisicoquímico de moléculas con mayor probabilidad de ser absorbidas por el tracto gastrointestinal, y la región amarilla (yema) es el espacio fisicoquímico de moléculas con mayor probabilidad de penetrar al cerebro (Figura 14).

Las indol-2-carboxamidas **1a-1d**, **2a-2d** y el Arbidol® se mapearon en el gráfico del huevo cocido (Figura 14). El análisis del gráfico predice que todas las carboxamidas y el Arbidol® son absorbidos a nivel gastrointestinal al encontrarse localizados dentro de la elipse blanca. Las carboxamidas **1a**, **1b**, **2a** y **2b** también se encuentran dentro de la yema de huevo cocido, estas carboxamidas

igualmente penetran potencialmente la barrera hematoencefálica, ya que las áreas de yema y clara no se excluyen mutuamente. Cabe señalar que las indol-2-carboxamidas **1a-1d** y **2a-2d** van dirigidas hacia la región pulmonar por lo que el transporte a través de la barrera hematoencefálica no es esencial.

Adicionalmente, cada compuesto mapeado está representado por un círculo y aquellos coloreados en azul indican que pueden ser objeto activo de eflujo por P-gp+ en la membrana GI, en cambio los coloreados en rojo indican que no son sustratos de P-gp- por lo que no se predice su eflujo. Los compuestos **1a**, **2a**, **2b** y el Arbidol® no son sustratos de P-gp al estar representados en color rojo, en cambio los compuestos **1b**, **1c**, **1d**, **2c** y **2d** representados de color azul, pueden ser objeto de eflujo por la P-gp.

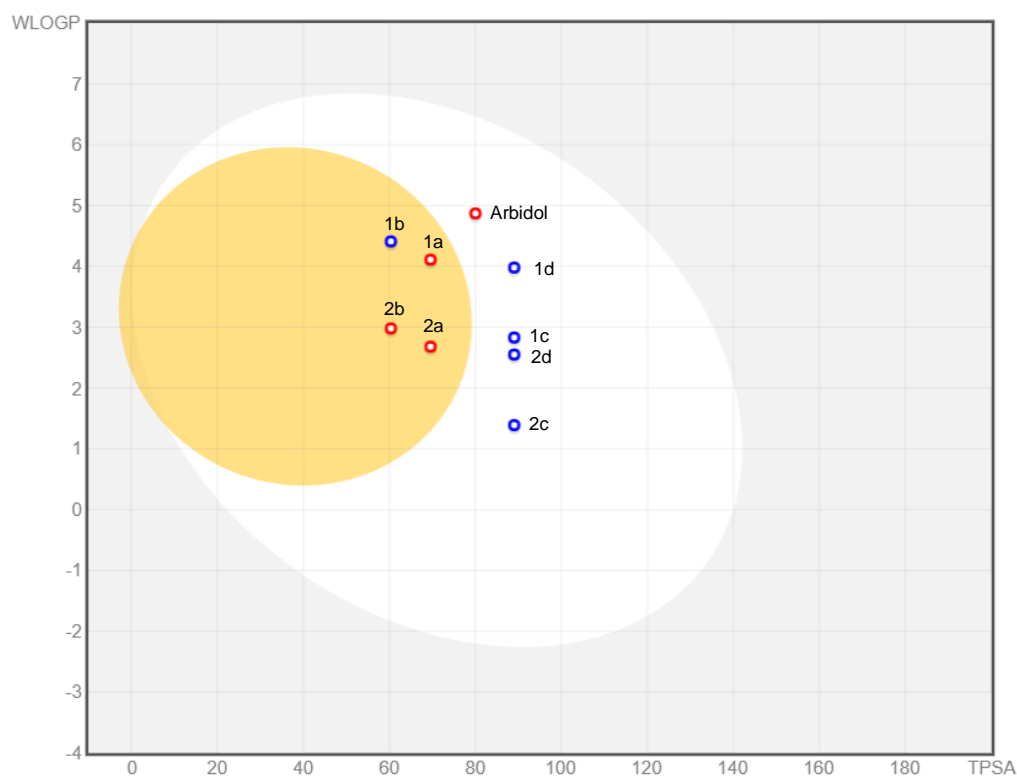


Figura 14. Gráfico tipo Huevo Cocido de las indol-2-carboxamidas **1a-1d**, **2a-2d** y del compuesto de referencia Arbidol®.

8.1.4 Similitud con los fármacos y alertas de interferencia estructural

La relación entre los parámetros farmacocinéticos y fisicoquímicos que caracteriza a los fármacos está delineada por la llamada regla de cinco establecida por Lipinski, Ghose, Veber, Egan y Muegge. La regla de cinco permite una identificación sencilla de los parámetros fisicoquímicos que debe cumplir el fármaco ideal, fuera de los cuales la probabilidad de que una molécula se convierta en un fármaco oral es baja (Daina et al., 2017; Ferreira & Andricopulo, 2019). El filtro Lipinski (Pfizer) es la regla pionera implementada en SwissADME y se centra en la búsqueda rápida en bibliotecas químicas para seleccionar las mejores moléculas que se comprarán, sintetizarán o promoverán en una etapa posterior de un proyecto de química médica.

Mientras que los parámetros fisicoquímicos dan una descripción global de la estructura, las moléculas pueden describirse directamente mediante búsquedas de subestructura. Los filtros Brenk y PAINS (Pan Assay Interference Compounds) son aplicados para limpiar bibliotecas químicas de fragmentos que se han identificado potencialmente como metabólicamente inestables, químicamente reactivos, tóxicos, farmacocinéticamente deficientes (propensos a interferir con los ensayos biológicos). La alerta de incompatibilidad con la química medicinal consiste en una lista de 105 fragmentos recurrentes (Brenk et al., 2008; Daina et al., 2017). SwissADME emite alertas si dichos restos o fragmentos se encuentran en una molécula bajo escrutinio.

El análisis de los resultados obtenidos indica que tanto el Arbidol® como las indol-2-carboxamidas **1a-1d** y **2a-2d** cumplen con los parámetros fisicoquímicos que debe guardar el fármaco ideal (filtro Lipinski). Adicionalmente, la búsqueda de subestructuras indicó que las indol-2-carboxamidas **2a-2d** son compatibles con la química medicinal. En tanto que el análisis de fragmentos de las carboxamidas **1b-1d** indicó que son susceptible a esterasas, ya que el éster fenílico del ácido acético en la posición 3 del núcleo indólico puede ser hidrolizado, generándose metabolitos potencialmente tóxicos. Tomando en cuenta estos resultados, las carboxamidas **1a-1d**, que contienen el éster fenílico, resultaron incompatibles con

la química medicinal y fueron descartadas. La serie constituida por las indol-2-carboxamidas **2a-2d** cumplió con las propiedades moleculares, farmacocinéticas, de similitud con fármacos y de química medicinal, por lo que se procedió a su optimización conformacional y a la realización de estudios de docking molecular.

8.2 Análisis conformacional de las indol-2-carboxamidas 2a-2d

El conocimiento de las preferencias conformacionales o conformaciones de mínima energía de un ligando constituye un paso fundamental para explorar el proceso de acoplamiento molecular ligando-receptor. En el entendido de que cuanto más flexible es un ligando la probabilidad de coincidencia con la conformación bioactiva será menor. Por ello, la afinidad entre un ligando y el receptor está modulada no sólo por el grado de complementariedad, sino también por el coste energético de reorganización conformacional del ligando asociado a la adopción de la conformación bioactiva (Perola & Charifson, 2004).

Con el fin de determinar las conformaciones de mínima energía, así como el confórmero de mínima energía global para cada una de las carboxamidas **2a-2d** y del Arbidol® se realizó un análisis conformacional basado en los posibles enlaces sencillos (σ) rotables presentes en cada compuesto. Un enlace rotatable se define como cualquier enlace σ que no es miembro de un sistema de anillo y conecta átomos pesados no terminales (por ejemplo, un enlace a un grupo metilo o cloro no se considera rotatable).

Se usaron programas de cálculo de modelado molecular (MM) basados en la mecánica clásica (i.e. Spartan'14), que utilizan campos de fuerza que proporcionan una descripción del comportamiento dinámico de los átomos, así como programas de cálculos cuánticos (i.e. Gaussian '09) que estudia la dinámica electrónica, pero con un costo computacional superior al MM.

El programa Gaussian 09 (Frisch et al., 2009) ofrece algoritmos de mecánica cuántica con campos de fuerza que integran la teoría funcional de la densidad que incluyen correcciones de largo alcance, como es el modelo químico utilizado en este trabajo y que está caracterizado por una combinación de un

procedimiento teórico B3LYP y conjuntos de bases, ej: 6-31G+(d,p). En muchas ocasiones, el éxito del cálculo radica en la elección correcta de la base a utilizar. El conjunto de bases es una representación matemática de los orbitales moleculares dentro de una molécula. Utilizan una combinación de funciones gaussianas para formar los orbitales, permitiendo así su clasificación de acuerdo con el número y tipo de funciones de base que contenga (Andersson & Uvdal, 2005).

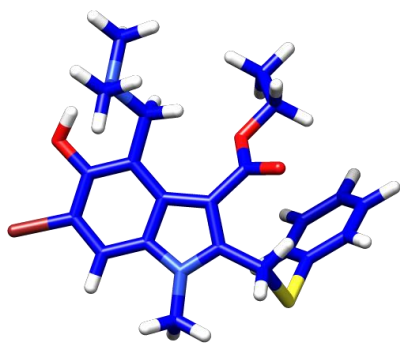
8.2.1 Confórmeros de mínima energía

La búsqueda de los confórmeros de mínima energía de **2a-2d** y el Arbidol® se realizó con el programa Spartan 14', empleando inicialmente el algoritmo de Monte Carlo con el método campo de fuerza de mecánica molecular en fase acuosa (MMFFaq), seguido del método Single Point Energy con el nivel de cálculo B3LYP/6-31G* en fase acuosa (Tabla 9). El análisis de la Tabla 9 muestra que las carboxamidas **2a-2d** presentan una libertad conformacional restringida, generando un número reducido de confórmeos que varían entre 2 (en **2d**) y 6 (en **2c**). El confórmero que corresponden al mínimo energético global (M1) en **2b-2d** contribuye con más del 50% a la distribución de Boltzmann. Este porcentaje disminuye hasta el 35.9% para M1 en **2a**.

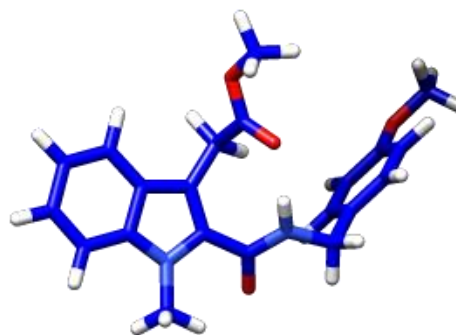
El Arbidol® presenta únicamente dos confórmeros de mínima energía, en donde M1 contribuye con el 73.4% de la población. En la Figura 15 se muestran los confórmeros de mínima energía para el Arbidol® y las indol-2-carboxamidas **2a-2d**.

Tabla 9. Confórmeros de mínima energía del Arbidol® y las carboxamidas **2a-2d** obtenidos usando la base 6-31G* a nivel de cálculo B3LYP

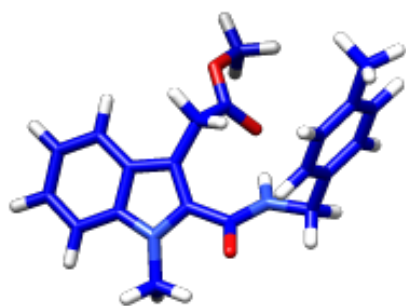
Ligando	Conf. de mínima energía	Conf. selectos	Distribución de Boltzman	E (Kcal/mol)	E rel
Arbidol®	2	M1	0.869	-2610890.17	0.00
		M2	0.131	-2610889.05	1.12
2a	5	M1	0.359	-768058.41	0.00
		M2	0.285	-768058.27	0.14
		M3	0.184	-768058.01	0.40
		M4	0.131	-768057.81	0.60
		M5	0.041	-768057.12	1.29
2b	4	M1	0.540	-720863.15	0.00
		M2	0.222	-720862.62	0.53
		M3	0.205	-720862.57	0.58
		M4	0.033	-720861.50	1.65
2c	6	M1	0.772	-692414.48	0.00
		M2	0.117	-692413.37	1.11
		M3	0.073	-692413.09	1.39
		M4	0.018	-692412.24	2.24
		M5	0.016	-692412.17	2.31
		M6	0.004	-692411.33	3.15
2d	2	M1	0.734	-788836.56	0.00
		M2	0.266	-788835.96	0.60



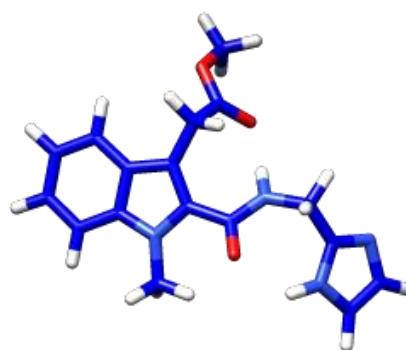
Arbidol®
E = -2610890.17 Kcal/mol



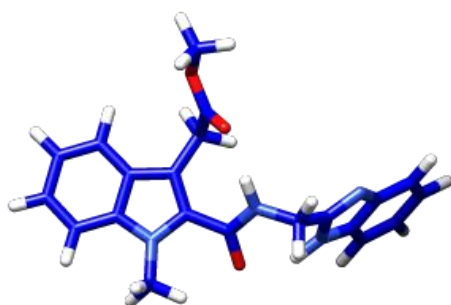
2a
E = -768058.41 Kcal/mol



2b
E = -720863.15 Kcal/mol



2c
E = -692414.48 Kcal/mol



2d
E = -788836.56 Kcal/mol

Figura 15. Confórmomero más estable (M1) para el Arbidol® y las indol-2-carboxamidas **2a-2d** obtenido usando la base 6-31G* a nivel de cálculo B3LYP.

8.2.2 Optimización conformacional

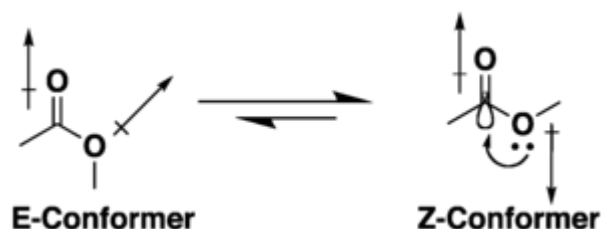
En el diseño racional de fármacos, un factor relevante es determinar las conformaciones de baja energía del ligando, con el objetivo de minimizar las penalizaciones energéticas asociadas con la flexibilidad no deseada del ligando, la disposición subóptima de los grupos funcionales que interactúan con el sitio de unión a la proteína o estabilización interna no deseada.

La optimización geométrica (minimización energética) de **2a-2d** y del Arbidol® se realizó usando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) en fase acuosa con el método teórico B3LYP y la base 6-31G+(d,p) que toma en cuenta aquellos cambios en la estructura electrónica de las carboxamidas que no son considerados por la base de cálculo 6-31G*, previamente ejecutada (Tabla 10).

El análisis de la Tabla 10 muestra que en el caso de los ligandos **2a-2d** el conformero que corresponden al mínimo energético global (M1) contribuye con el 80% o más a la distribución de Boltzmann, siendo con mucho el conformero más estable.

La exploración de la estructura 3D de los conformeros M1 de los ligandos **2a-2d** se realizó tomando en consideración el arreglo anti periplanar del grupo amida y la existencia de tres enlaces rotables, C2-C12, N13-C14 y C14-C15, en la cadena en C2 del núcleo indólico. Los cambios conformacionales más destacables ocurren por el giro del enlace σ que une el átomo de nitrógeno N13 del grupo amida y el átomo C14 del metileno (Figura 16).

Adicionalmente y en concordancia con la literatura, la exploración de las conformaciones M1 muestran que la energía mínima del grupo carboalcoxi de la cadena metilacetato en C3 del núcleo indólico corresponde a una conformación trans (Z) planar, con los dipolos del grupo éster orientados de manera opuesta.



Se sabe que la rotación alrededor del enlace C(=O)-O está obstaculizada por una barrera del orden de 10 kcal/mol. Adicionalmente, la conformación *trans* es varias kcal/mol más estable que la *cis* (Allinger et al., 1966). En la Figura 16 se muestra la sobreposición de los conformeros M1 de **2a-2d** obtenidos usando las bases 6-31G* y 6-31G+(d,p) a nivel de cálculo B3LYP.

Tabla 10. Optimización geométrica del Arbidol® y las carboxamidas **2a-2d** obtenida usando la base 6-31G+(d,p) a nivel de cálculo B3LYP

Ligando	Conf. de		Distribución de Boltzman	E(Kcal/mol)	E rel
	mínima energía	Conf. selectos			
Arbidol®	4	M1	0.720	-2609529.66	0.00
		M2	0.143	-2609529.42	0.24
		M3	0.117	-2609529.29	0.37
		M4	0.020	-2609528.25	1.41
2a	4	M1	0.799	-768068.80	0.00
		M2	0.094	-768068.66	0.14
		M3	0.091	-768068.64	0.16
		M4	0.016	-768067.60	1.20
2b	4	M1	0.887	-720874.30	0.00
		M2	0.098	-720874.25	0.05
		M3	0.008	-720872.73	1.57
		M4	0.007	-720872.71	1.59
2c	3	M1	0.886	-692423.44	0.00
		M2	0.103	-692423.14	0.30
		M3	0.011	-692421.81	1.63
2d	2	M1	0.819	-788844.88	0.00
		M2	0.181	-788844.58	0.30

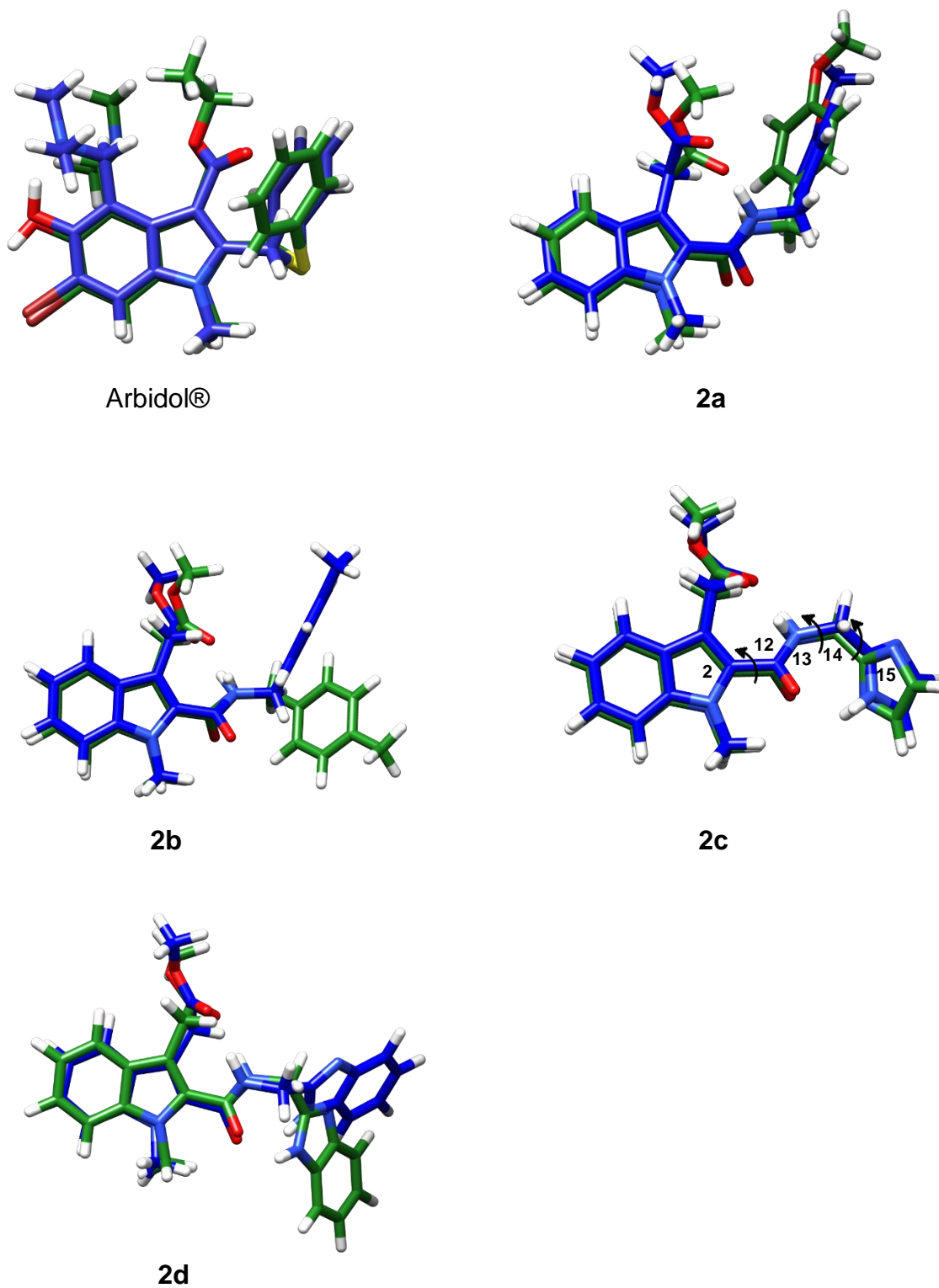


Figura 16. Sobreposición de los conformeros M1 obtenidos usando las bases 6-31G* (azul) y 6-31G+(d,p) (verde) a nivel de cálculo B3LYP para el Arbidol® y los ligandos **2a-2d**.

8.3 Predicción de sitios medicables

La predicción y priorización de los sitios de unión o cavidades medicables *P* de la proteína *S* se realizó usando la plataforma informática Proteins Plus que toma en cuenta el volumen, superficie y tipo de aminoácidos: donadores de puentes de hidrógeno (HBD), aceptores de puentes de hidrógeno (HBA) y aminoácidos no polares presentes en una cavidad dada (Tabla 11). El puntaje medicable, que resulta de la caracterización de los sitios de unión *P* de la proteína, se indica mediante una escala que varía entre 0.00 a 1.00, donde 1.00 es el mejor sitio a unión a fármacos (Volkamer et al., 2012).

El análisis de la proteína *S* homotrimérica predijo 106 posibles sitios de unión (*P*) distribuidos entre los tres protómeros A (rojo), B (ámbar) y C (azul), con puntajes entre 0.16-0.87. Se seleccionaron aquellos sitios *P* que obtuvieron un puntaje igual o mayor a 0.80. En total se reconocieron 3 sitios de unión *P* por protómero, identificados como *P1*, *P2* y *P3*, localizados en las regiones S1 (*P1*), S1/S2 (*P2*) y S2 (*P3*). Los sitios de unión *P* del homotrímero están conformados por una cavidad en la que participan dos protómeros: *AB*, *BC* y *AC* (Figura 17).

Tabla 11. Propiedades de los sitios de unión de la proteína *S*

Sitio de unión	Volumen Å ³	Superficie Å ²	Puntaje medicable	HBD	HBA	AA no polares
<i>P1 AB</i>	1713.4	1960.2	0.80	44	101	84
<i>P1 BC</i>	1814.0	1845.7	0.81	41	77	99
<i>P1 AC</i>	1207.0	1339.9	0.81	28	71	54
<i>P2 AB</i>	845.0	1104.8	0.84	16	61	38
<i>P2 BC</i>	741.5	1057.6	0.84	15	38	52
<i>P2 AC</i>	1297.6	1373.3	0.81	26	80	49
<i>P3 AB</i>	1221.0	1416.1	0.80	34	88	56
<i>P3 BC/AC</i>	1964.9	2012.7	0.80	46	138	73

Cabe señalar que las cavidades *AC* y *BC* del sitio *P3* se encuentran parcialmente sobrepuestas y por lo tanto indefinidas, su deslinde se realizó tomando como modelo la cavidad *AB* cuyos límites fueron claramente definidos por el programa Proteins Plus. Para ello, se realizó un reconocimiento de los residuos de aminoácidos que conforman la cavidad *AB* y se extrapolaron e identificaron en las correspondientes cavidades *AC* y *BC* del sitio *P3*.

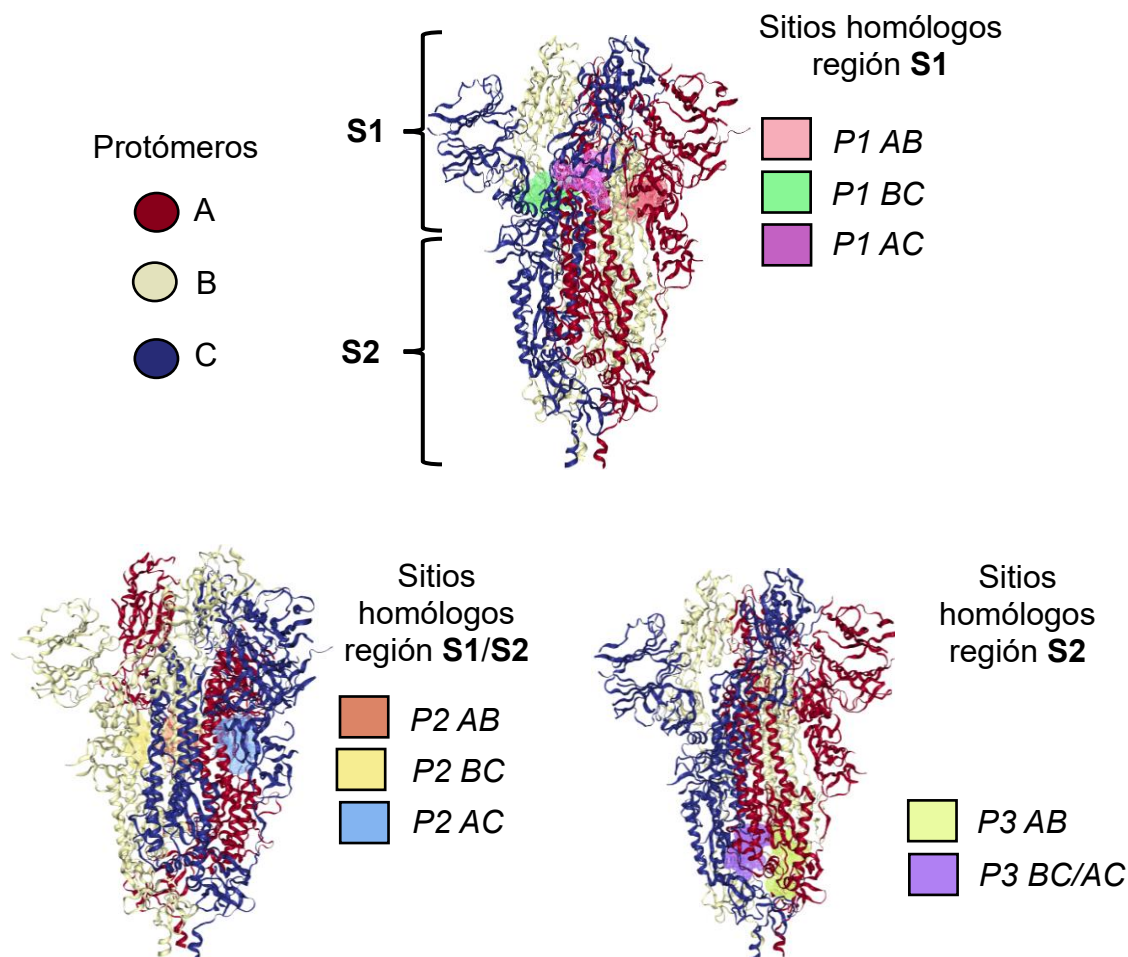


Figura 17. Sitios de unión *P* de la proteína *S*, vista lateral.

De la Tabla 11 se infiere que el sitio de unión de mayor volumen es *P1* y el más pequeño es *P2*. Los sitios *P1*, *P2* y *P3* se caracterizan por contener significativamente un mayor número de residuos de aminoácidos de tipo HBA que de tipo HBD, en tanto que el sitio *P1* contiene un mayor número de aminoácidos no polares que sus contrapartes *P2* y *P3*.

8.4 Acoplamiento de moléculas pequeñas basado en la estructura

El método más popular en el diseño de fármacos basado en la estructura es el docking molecular. El método consiste en alinear una pequeña molécula de ligando dentro de la cavidad de unión de la proteína objetivo y la posición de acoplamiento resultante se evalúa mediante una función de puntuación específica. La función de puntuación consta de una serie de métodos matemáticos utilizados para predecir la fuerza de la interacción no covalente denominada afinidad de unión. La afinidad de unión es el cambio en la energía libre (ΔG) asociada con un proceso de unión.

8.4.1 Docking molecular

El principal objetivo del acoplamiento molecular es identificar un complejo ligando-receptor con una conformación optimizada que posea la menor energía libre de unión (ΔG). La magnitud de la afinidad de unión es una medida de cuán fuerte es la interacción entre el ligando y la proteína, por ello la afinidad se relaciona directamente con la potencia del ligando (Pagadala et al., 2017).

En este trabajo, los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron utilizando el programa AutoDock, que utiliza un algoritmo genético lamarckiano (LGA) que calcula y clasifica cada una de las poses o conformaciones como variación de energía libre y una función de campo de fuerza basada en el campo de fuerza AMBER. En el procedimiento de acoplamiento proteína-ligando se modeló la flexibilidad del ligando suponiendo que tiene un receptor de proteína rígido, considerando de este modo solo el espacio conformacional del ligando. Idealmente, sin embargo, también debería tenerse en cuenta la flexibilidad de las proteínas, por lo que se han desarrollado algunos enfoques a este respecto (Pagadala et al., 2017).

Con el propósito de determinar las posibles poses para los ligandos **2a-2d** y el Arbidol® en los tres sitios unión previamente identificados *P1*, *P2* y *P3* de la proteína S, y establecer la conformación optimizada del complejo

correspondiente (menor valor de ΔG), los ligandos **2a-2d** y el Arbidol® se analizaron y clasificaron mediante funciones de puntuación usando el programa AutoDockTools 1.5.6. Para tal efecto, se seleccionaron las cavidades AB del homotrímero localizadas en las regiones S1 (*P1*), S1/S2 (*P2*) y S2 (*P3*) (Figura 18).

El estudio docking inició con la selección de la estructura 3D de la proteína S descrita en la plataforma Protein Data Bank con el código 6VXX y el uso de las estructuras 3D de los correspondientes c nformeros M1 de **2a-2d** y del Arbidol® optimizados a nivel de cálculo B3LYP 6-31G+(d,p) (Tabla 10).

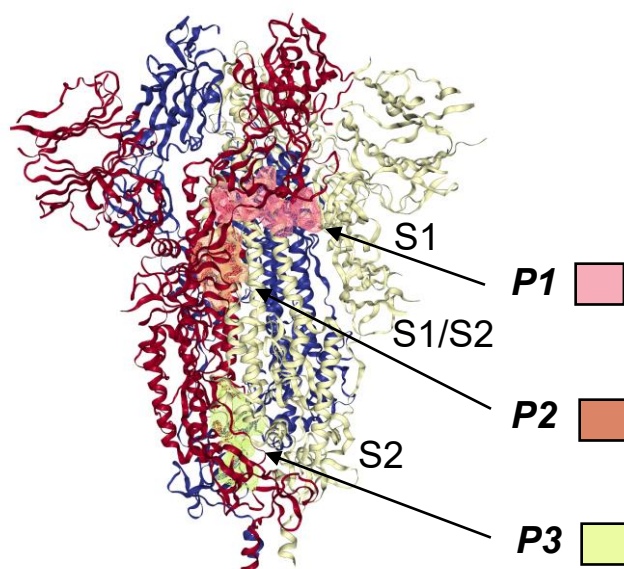


Figura 18. Cavidad AB en los sitios de unión *P* del homotrímero localizadas en las regiones S1 (*P1*), S1/S2 (*P2*) y S2 (*P3*).

En cada estudio docking se calcularon 100 c nformeros independientes, que se agruparon en clústers según el valor de RMSD de superposición entre c nformeros. En la Figura 19 se muestra la distribución de clústers del ligando **2d** en la cavidad AB (para BC y AC ver Anexo, Figuras I-III). En la Tabla 12 se indican la energía de unión de la conformación más estable y la más poblada del Arbidol® y **2a-2d** en la cavidad AB (para BC y AC ver Anexo, Tabla I) en los sitios de unión *P1*, *P2* y *P3* de la proteína S.

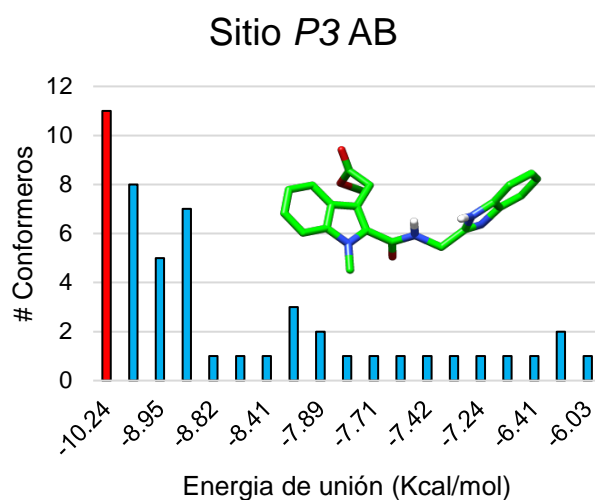
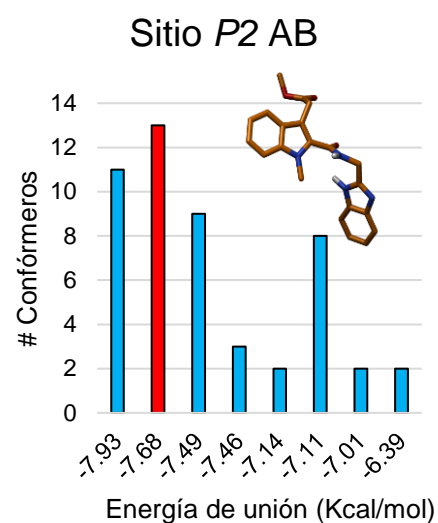
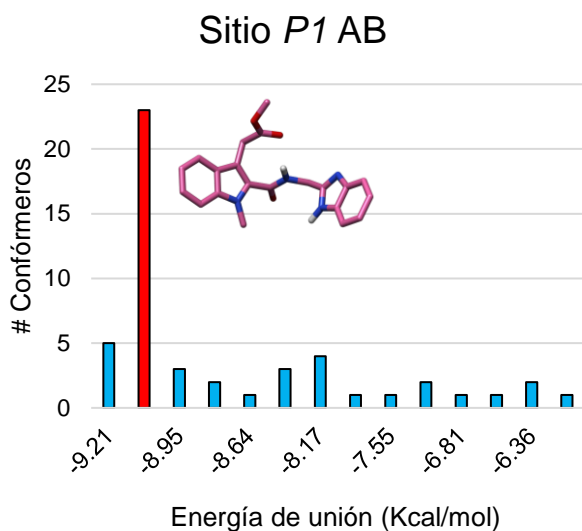


Figura 19. Distribución de clústers (RMSD 2.0 Å) del ligando **2d** en la cavidad AB en los sitios de unión *P1*, *P2* y *P3* de la proteína S. Clúster de la pose ilustrada, en rojo.

Tabla 12. Energía de unión de la pose más estable (menor energía) y de la más poblada de los ligandos **2a-2d** y del Arbidol® obtenida por docking molecular. Número de clústers (n), energía de unión (ΔG , kcal/mol) y población (p, %).

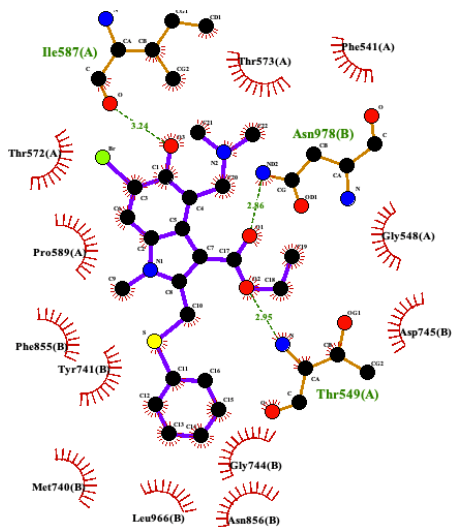
Sitio de unión	Ligando	Clúster ^a (n)	Pose más estable		Pose más poblada	
			ΔG	p	ΔG	p
<i>P1</i> AB	Arbidol®	28	-8.3	14.0	-8.3	14.0
	2a	14	-8.9	6.0	-8.6	50.0
	2b	7	-9.3	28.0	-9.0	38.0
	2c	16	-8.5	44.0	-8.5	44.0
	2d	14	-9.2	10.0	-9.0	46.0
<i>P2</i> AB	Arbidol®	21	-7.8	12.0	-6.5	16.0
	2a	13	-7.5	10.0	-7.3	26.0
	2b	8	-7.6	4.0	-7.3	40.0
	2c	11	-7.0	10.0	-6.6	28.0
	2d	8	-7.9	22.0	-7.7	26.0
<i>P3</i> AB	Arbidol®	21	-8.7	2.0	-7.8	36.0
	2a	16	-9.3	8.0	-9.1	20.0
	2b	14	-9.7	6.0	-9.3	22.0
	2c	16	-8.5	10.0	-8.0	24.0
	2d	19	-10.2	22.0	-10.2	22.0

^a Conjunto de conformaciones con un RMSD igual o menor a 2.0 Å.

Como se observa en la Tabla 12, en el sitio de unión *P1* del homotrímero la energía de unión para la pose más poblada coincide o es muy próxima a la pose más estable. Estos valores en los sitios *P2* y *P3* se encuentran más dispersos. Los ligandos **2b** y **2d** formaron complejos estables con una menor energía de unión y una buena probabilidad de unión, con un score aún superior que el encontrado para el Arbidol®.

El análisis de los resultados del acoplamiento molecular se realizó usando el visualizador Ligplot, considerando que la importancia relativa de las contribuciones de las interacciones no enlazantes electrostáticas y no electrostáticas depende de la complementariedad de carga y la estructura de las entidades que interactúan. En las Figuras 20, 21 y 22 se representan en 2D las conformaciones más pobladas del Arbidol®, **2b** y **2d**, respectivamente, en la cavidad AB (para BC y AC ver Anexo, Figuras IV-IX) en los tres sitios de unión *P* de la proteína S.

Cabe señalar que se observó similitud en las interacciones enlaces de hidrógeno de los compuestos acoplados Arbidol®, **2b** y **2d** cuando se usó el visualizador Discovery Studio. Con esta herramienta se identificaron además de la interacción no enlazante antes mencionada, las de tipo Van der Waals, pi-anión, pi-alquilo, pi-sigma, pi-par de electrones no compartido y halógeno, por lo que el uso de esta herramienta complementa el análisis de los estudios docking (Figuras 23, 24 y 25).



A

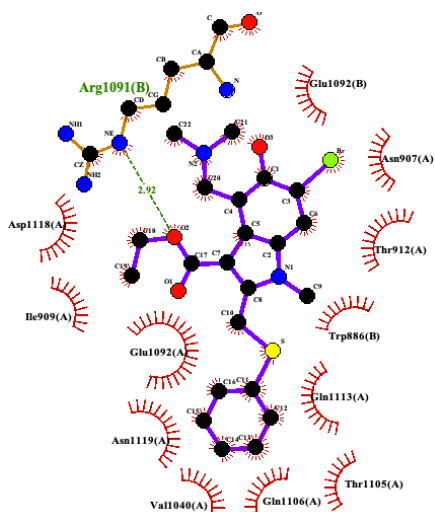
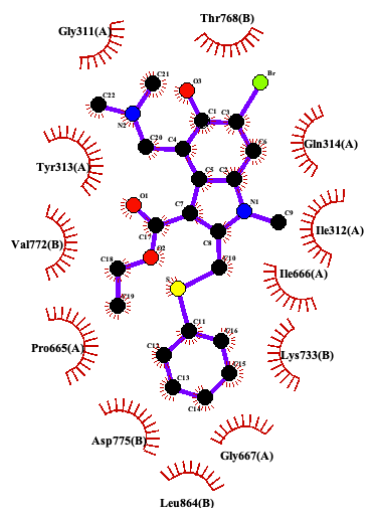
$\Delta G = -8.3$ Kcal/mol

$p = 14.0$

B

$\Delta G = -6.5$ Kcal/mol

$p = 16$

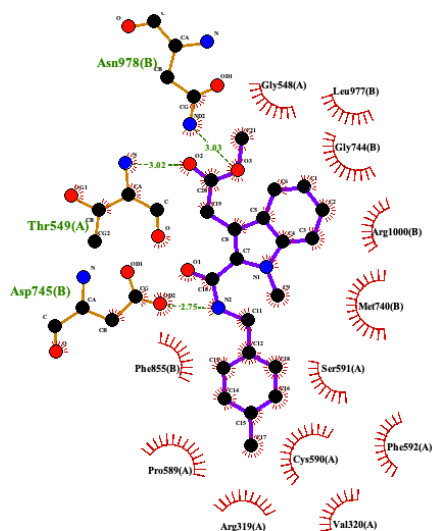


C

$\Delta G = -7.8$ Kcal/mol

$p = 36.0$

Figura 20. Interacciones del Arbidol® con aminoácidos en los sitios de unión *P1* (A) *P2* (B) y *P3* (C) de la proteína S, las líneas punteadas en verde representan los puentes de hidrógeno y los medios soles en rojo representan las interacciones hidrofóbicas (visualizador LigPlot).



A

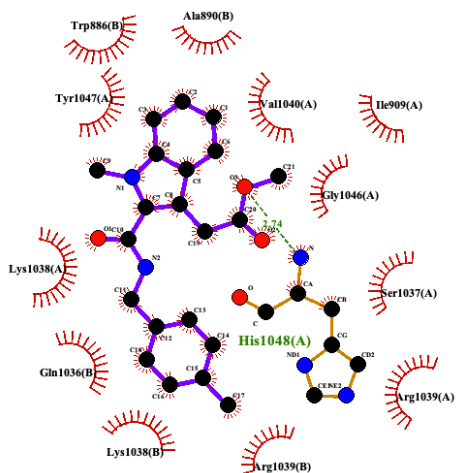
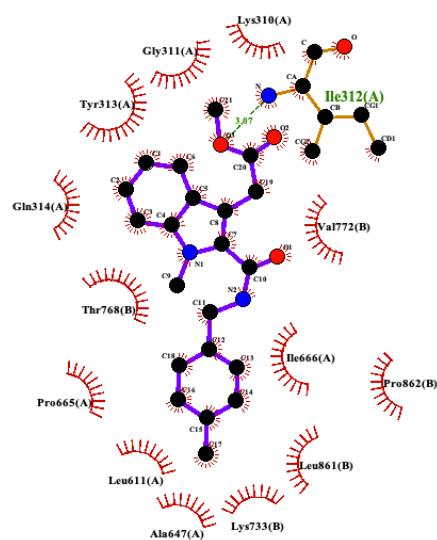
$\Delta G = -8.6$ Kcal/mol

$p = 50.0$

B

$\Delta G = -7.3$ Kcal/mol

$p = 26.0$

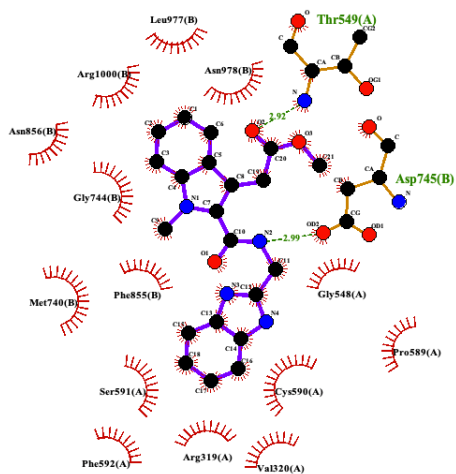


C

$\Delta G = -9.1$ Kcal/mol

$p = 20.0$

Figura 21. Interacciones del ligando **2b** con aminoácidos en los sitios de unión *P1* (**A**) *P2* (**B**) y *P3* (**C**) de la proteína *S*, las líneas punteadas en verde representan los puentes de hidrógeno y los medios soles en rojo representan las interacciones hidrofóbicas (visualizador LigPlot).



A

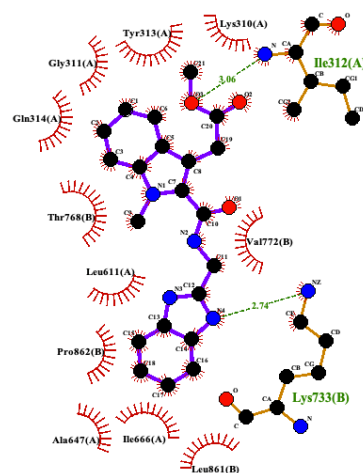
$$\Delta G = -9.0 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 46.0$$

B

$$\Delta G = -7.7 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 26.0$$



C

$$\Delta G = -10.2 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 22.0$$

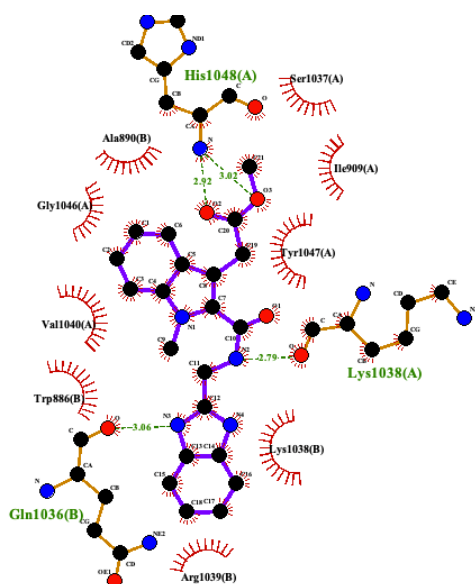


Figura 22. Interacciones del ligando **2d** con aminoácidos en los sitios de unión *P1* (**A**) *P2* (**B**) y *P3* (**C**) de la proteína *S*, las líneas punteadas en verde representan los puentes de hidrógeno y los medios soles en rojo representan las interacciones hidrofóbicas (visualizador LigPlot).

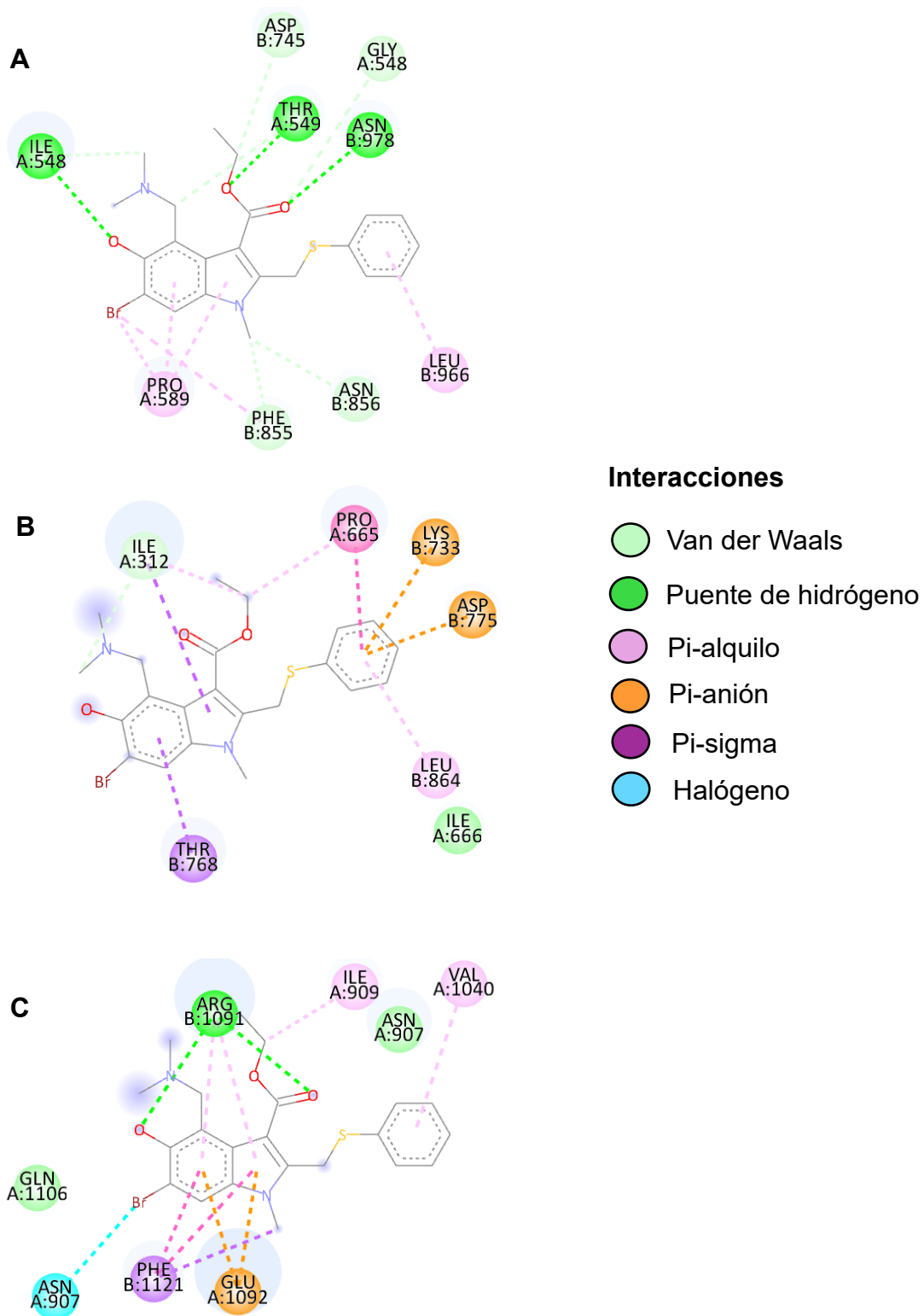


Figura 23. Interacciones del Arbidol® con aminoácidos en los sitios de unión *P1* (A) *P2* (B) y *P3* (C) de la proteína S (visualizador Discovery Studio).

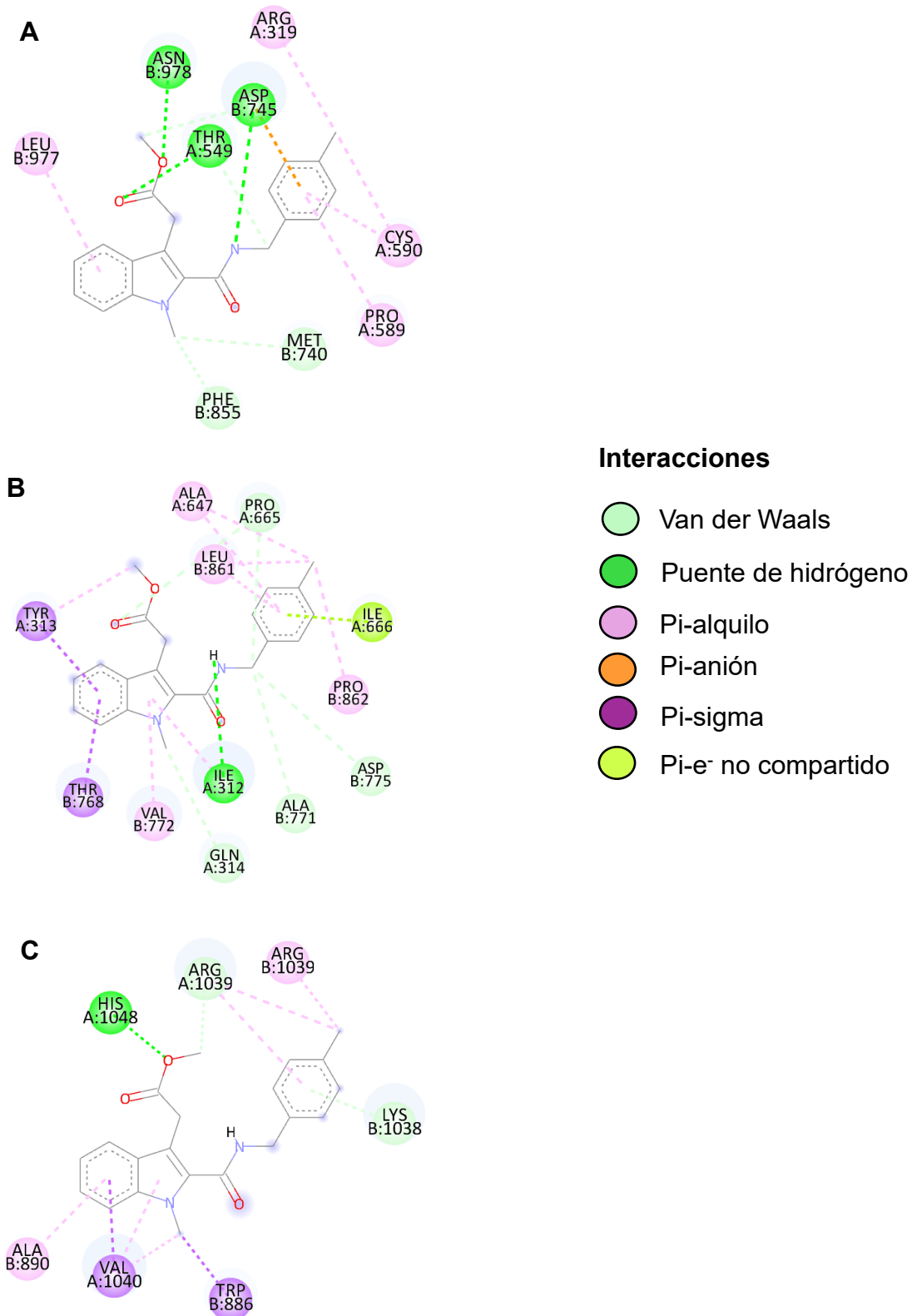


Figura 24. Interacciones del ligando **2b** con aminoácidos en los sitios de unión *P1* (**A**) *P2* (**B**) y *P3* (**C**) de la proteína S (visualizador Discovery Studio).

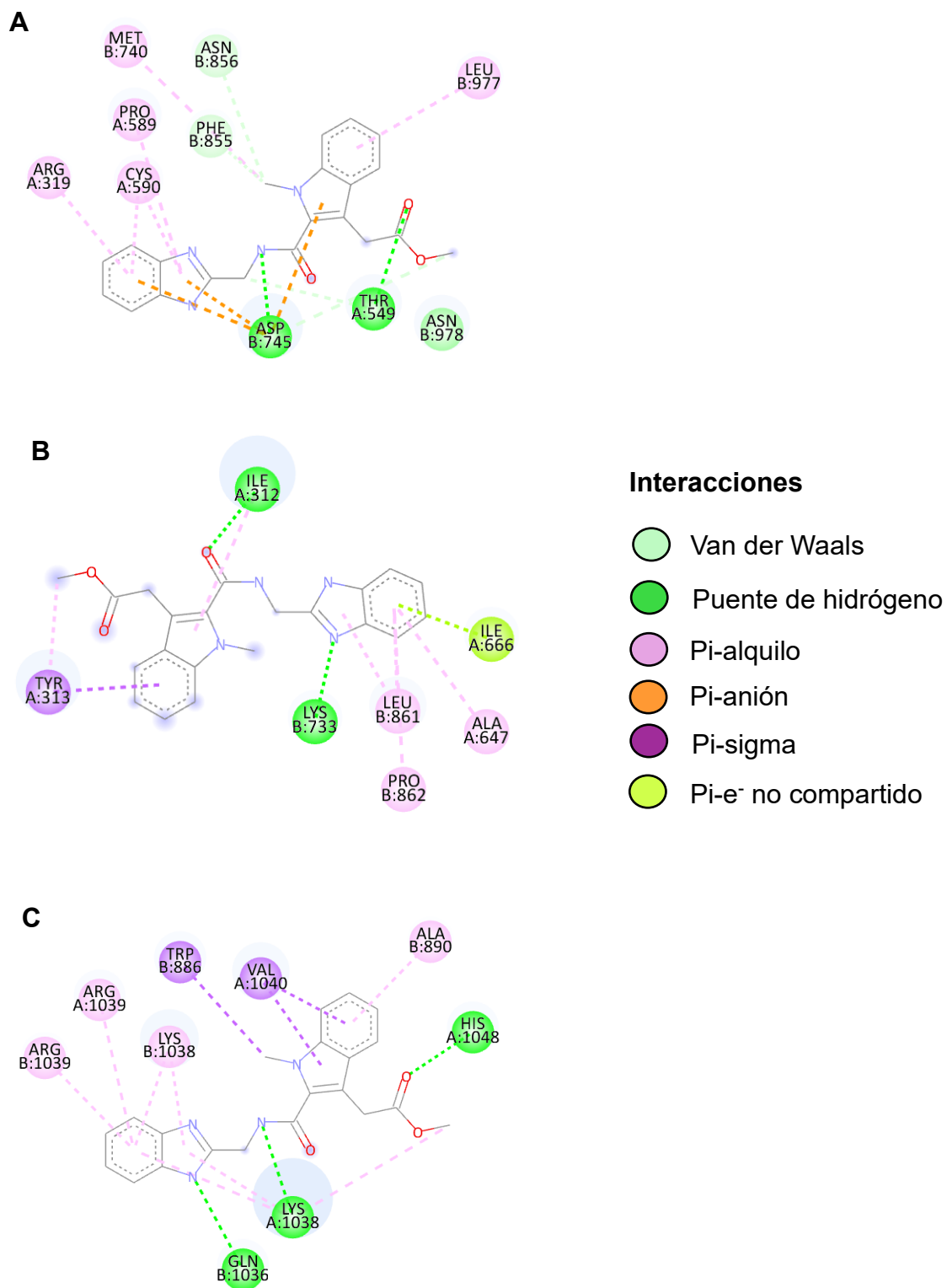


Figura 25. Interacciones del ligando **2d** con aminoácidos en los sitios de unión *P1* (A) *P2* (B) y *P3* (C) de la proteína S (visualizador Discovery Studio).

8.4.1.1 Análisis selecto de las interacciones proteína-ligando

Muchas fuerzas están involucradas en la asociación intermolecular, incluidas las interacciones hidrofóbicas, de van der Waals, de apilamiento entre aminoácidos aromáticos, enlaces de hidrógeno y fuerzas electrostáticas. En las Tablas 13, 14 y 15 se indican interacciones selectas en la cavidad AB (para BC y AC ver Anexo, Tablas II-IV) en los tres sitios de unión *P* de la proteína S con el Arbidol® y los ligandos **2a-2d** obtenidas utilizando el visualizador Ligplot.

En particular, en el sitio *P1* el Arbidol® presentó tres puentes de hidrógeno con la Thr549(A) Ile587(A) Asn978(B) con distancias (*d*) de 2.95 Å, 3.24 Å y 2.86 Å, respectivamente (Figura 20 **A**). En el sitio *P2* el Arbidol® no formó puentes de hidrógeno, lo que influye en la formación de un complejo menos estable que aquel observado en *P1* (Figura 20 **B**). En el sitio *P3* el Arbidol® mostró un puente de hidrógeno entre el átomo hidrógeno NH de guanidino de la Arg1091(B) y el átomo de oxígeno del grupo alcoxi éster en la cadena en C3 del núcleo indólico, con una *d* = 2.92 Å, así como varias interacciones hidrofóbicas (Figura 20 **C**).

El ligando **2b** mostró tres puentes de hidrógeno en el sitio *P1*, dos de ellos con los átomos de oxígeno del carbonilo y alcoxi de éster en C3 del indol y los residuos de aminoácidos Thr549(A) (*d* = 3.02 Å) y Asn978(B) (*d* = 3.03 Å), respectivamente y el tercero con el átomo de hidrógeno NH de amida en C2 y el Asp745(B) (*d* = 2.75 Å) (Figura 21 **A**). En los sitios *P2* y *P3* se observó en cada caso únicamente un puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno de alcoxi de éster en C3 del indol y el hidrógeno NH-Cα de la Ile312(A) (*d* = 3.07 Å) en *P2*, o bien el hidrógeno NH-Cα de la His1048(A) (*d* = 2.74 Å) en *P3* (Figura 21 **B, C**).

A diferencia de los ligandos **2a** y **2b** que contienen sólo un grupo HBD, los ligandos **2c** y **2d** contienen dos grupos HBD (Tabla 6, p. 28) que potencialmente pueden formar puentes de hidrógeno. El ligando **2d** en el sitio *P1* generó dos puentes de hidrógeno, uno de ellos entre el átomo de oxígeno del carbonilo del éster en C3 del indol y el átomo de hidrógeno NH-Cα de la Thr549(A) (*d* = 2.92 Å) y el segundo entre el átomo de hidrógeno NH de amida en C2 del indol y el átomo de oxígeno del carbonilo Cγ=O del Asp745(B) (*d* = 2.99 Å) (Figura 22 **A**).

En el sitio *P2*, **2d** presentó dos puentes de hidrógeno uno de ellos entre el átomo de oxígeno de alcoxilo de éster en C3 del indol y el átomo de hidrógeno NH-C α de la Ile312(A) ($d = 3.06 \text{ \AA}$) y el segundo entre el átomo de nitrógeno del anillo de bencimidazol y el átomo de hidrógeno NH $_2$ -C ϵ de la Lys 733(B) ($d = 2.74 \text{ \AA}$) (Figura 22 **B**). En el sitio *P3*, **2d** presentó cuatro puentes de hidrógeno en los que participan el hidrógeno NH del anillo de bencimidazol y el oxígeno C α -C=O de la Gln1036(B) ($d = 3.06 \text{ \AA}$), el hidrógeno NH de amida en la cadena en C2 del indol y el oxígeno C α -C=O de la Lys1038(A) ($d = 2.79 \text{ \AA}$) y finalmente un puente doble entre los oxígenos de alcoxilo y carbonilo de éster en C3 del indol y el hidrógeno NH-C α de la His1048(A) ($d = 3.02 \text{ \AA}$ y 2.92 \AA) respectivamente (Figura 22 **C**).

En congruencia con los resultados resumidos en la Tabla 12 (p 46), en la que se observa que el clúster más estable y poblado para el Arbidol® y los ligandos **2a-2d** se localiza en el sitio de unión *P1* de la proteína S, el análisis de las interacciones ligando-receptor derivado de los estudios docking indicó que los ligandos **2b** y **2d** generaron más interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno en el sitio *P1* en comparación con los sitios *P2* y *P3*.

En resumen, se puede destacar que el ligando **2d** obtuvo la mejor energía de unión que se atribuye a: *i*) una mayor restricción conformacional que favorece la unión con el receptor, *ii*) una región hidrofóbica importante conferida por el grupo de bencimidazol y *iii*) dos grupos HBD capaces de formar puentes de hidrógeno con los residuos de aminoácidos en los sitios de unión, formando complejos estabilizados por puentes de hidrógeno e hidrofóbicas.

Tabla 13. Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los residuos de aminoácidos del sitio *P1* de la proteína S con el Arbidol® y los ligandos **2a-2d**

Sitio de unión	Ligando	Tipo de interacción	Aminoácidos involucrados
<i>P1</i>	Arbidol®	Hidrofóbicas	Phe541(A) Gly548(A) Pro589(A) Met740(B) Gly744(B) Phe855(B) Leu966(B)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(A) Ile587(A) Asn978(B)
	2a	Hidrofóbicas	Val320(A) Gly548(A) Pro589(A) Cys590(A) Phe592(A) Met740(B) Gly744(B) Phe855(B) Leu977(B)
		Puentes de hidrógeno	Thr548(A) Asp745(B) Asn978(B)
	2b	Hidrofóbicas	Val320(A) Gly548(A) Cys590(A) Pro589(A) Phe592(A) Met740(B) Gly744(B) Phe855(B) Leu977(B)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(A) Asp745(B) Asn978(B)
	2c	Hidrofóbicas	Phe541(A) Gly548(A) Met740(B) Gly744(B) Phe855(B) Val976(B)
		Puentes de hidrógeno	Thr547(A) Thr573(A) Leu977(B) Arg1000(B)
	2d	Hidrofóbicas	Val320(A) Gly548(A) Pro589(A) Cys590(A) Phe592(A) Met740(B) Gly744(B) Phe855(B) Leu977(B)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(A) Asp745(B)

Tabla 14. Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los residuos de aminoácidos del sitio *P2* de la proteína S con el Arbidol® y los ligandos **2a-2d**

Sitio de unión	Ligando	Tipo de interacción	Aminoácidos involucrados
<i>P2</i>	Arbidol®	Hidrofóbicas	Gly311(A) Ile312(A) Pro665(A) Ile666(A) Gly667(A) Val772(B) Leu864(B)
		Puentes de hidrógeno	-
	2a	Hidrofóbicas	Ile312(A) Leu611(A) Ala647(A) Pro665(A) Ile666(A) Gly667(A) Leu861(B) Pro862(B) Leu864(B)
		Puentes de hidrógeno	Ser596(A) Gln613(A)
	2b	Hidrofóbicas	Gly311(A) Leu611(A) Ala647(A) Pro665(A) Ile666(A) Val772(B) Leu861(B) Pro862(B)
		Puentes de hidrógeno	Ile312(A)
	2c	Hidrofóbicas	Ile312(A) Ala647(A) Pro665(A) Gly667(A) Val772(B) Leu861(B) Pro862(B) Leu864(B)
		Puentes de hidrógeno	Ser596(A) Ile666(A) Lys733(B)
	2d	Hidrofóbicas	Gly311(A) Leu611(A) Ala647(A) Ile666(A) Val772(B) Leu861(B) Pro862(B)
		Puentes de hidrógeno	Ile312(A) Lys733(B)

Tabla 15. Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los residuos de aminoácidos del sitio *P3* de la proteína S con el Arbidol® y los ligandos **2a-2d**

Sitio de unión	Ligando	Tipo de interacción	Aminoácidos involucrados
<i>P3</i>	Arbidol®	Hidrofóbicas	Trp886(B) Ile909(A) Val1040(A)
		Puentes de hidrógeno	Arg1091(B)
	2a	Hidrofóbicas	Trp886(B) Gly889(B) Ile909(A) Ala890(B) Val1040(A) Gly1046(A)
		Puentes de hidrógeno	His1028(A)
	2b	Hidrofóbicas	Trp886(B) Ala890(B) Ile909(A) Val1040(A) Gly1046(A)
		Puentes de hidrógeno	His1048(A)
	2c	Hidrofóbicas	Trp886(B) Gly908(A) Ile909(A) Val1040(A) Gly1044(A) Gly1046(A)
		Puentes de hidrógeno	Lys1038(A)
	2d	Hidrofóbicas	Trp886(B) Ala890(B) Ile909(A) Val1040(A)
		Puentes de hidrógeno	Gln1036(B) Lys1038(A) His1048(A)

8.4.1.2 Conformación bioactiva

Una buena unión ligando-receptor es el resultado de un equilibrio sutil entre diferentes términos: una pequeña contribución a la desolvatación, términos favorables de interacción ligando-receptor y un pequeño coste energético para que el ligando adopte la conformación “bioactiva”, lo que significa que los fármacos con alta afinidad suelen ser aquellos cuya conformación preferida en solución es cercana a la bioactiva (Gürsoy & Smieško, 2017; Perola & Charifson, 2004).

En lo referente al coste energético, la selección acertada del campo de fuerza aplicado a la búsqueda de las conformaciones de baja energía del ligando es un requisito previo clave para garantizar que el grupo de conformeros resultante incluya la conformación bioactiva o una muy similar (Watts et al., 2010). El cálculo del RMSD es el parámetro más utilizado para describir la similitud entre conformeros.

La similitud de la conformación preferida de las carboxamidas **2a-2d** y del Arbidol® con respecto a la conformación adoptada en los complejos proteína-ligando en los diferentes sitios de unión *P*, obtenida por comparación de los RMSD, reveló que la mejor similitud se logró para el ligando **2b** en el sitio de unión *P1*, con un valor de RMSD de 4.09 Å (Figuras 26, 27 y 28).

En la Figura 29 se muestra la sobreposición de las conformaciones adoptadas en el complejo proteína-ligando para el Arbidol® y los ligandos **2a-2d** en el sitio *P1*, *P2* y *P3*.

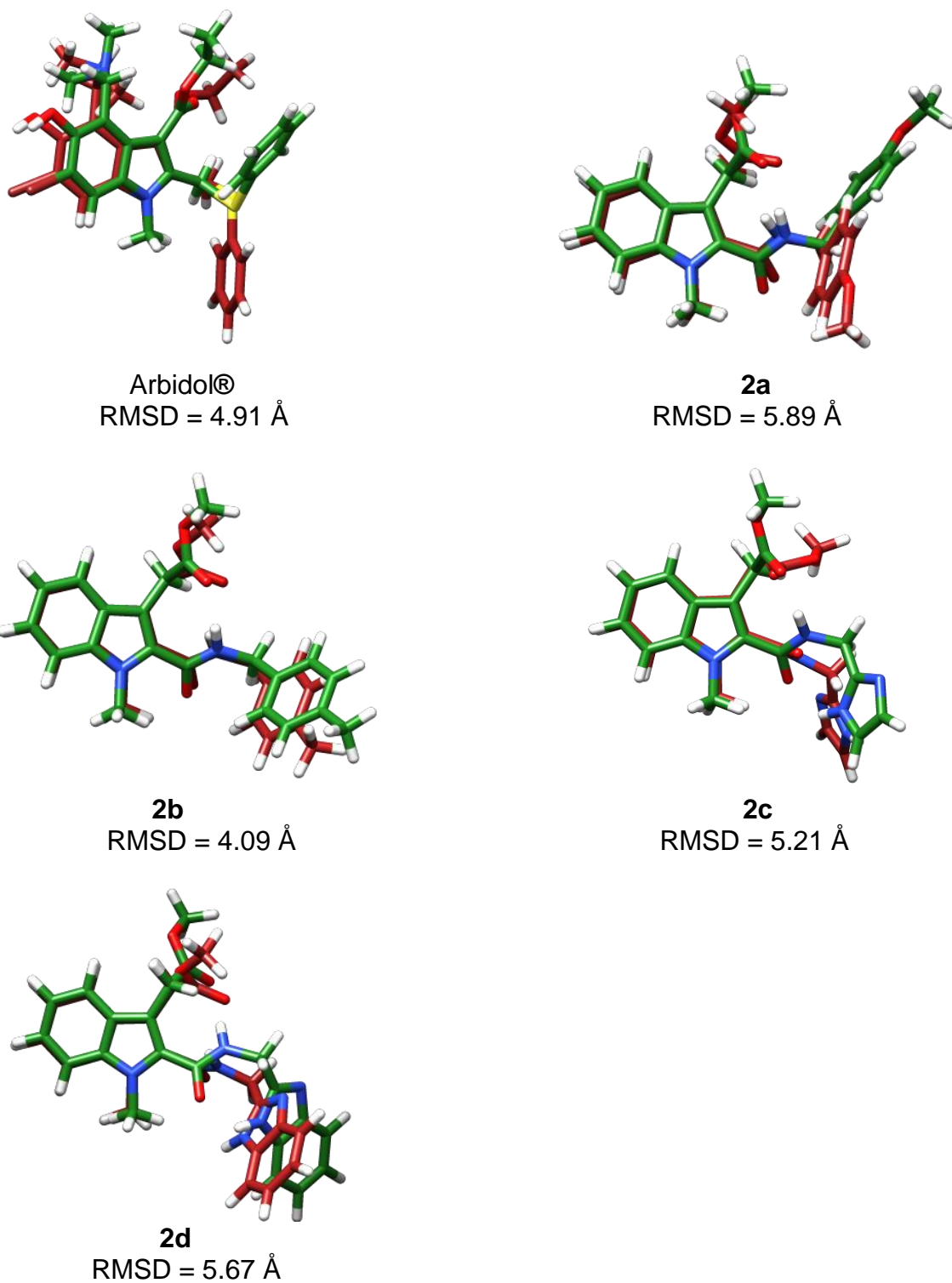


Figura 26. Sobreposición del conformero de mínima energía (verde) y la conformación adoptada en el complejo (rojo) para el Arbidol® y los ligandos **2a-2d** en el sitio *P1*.

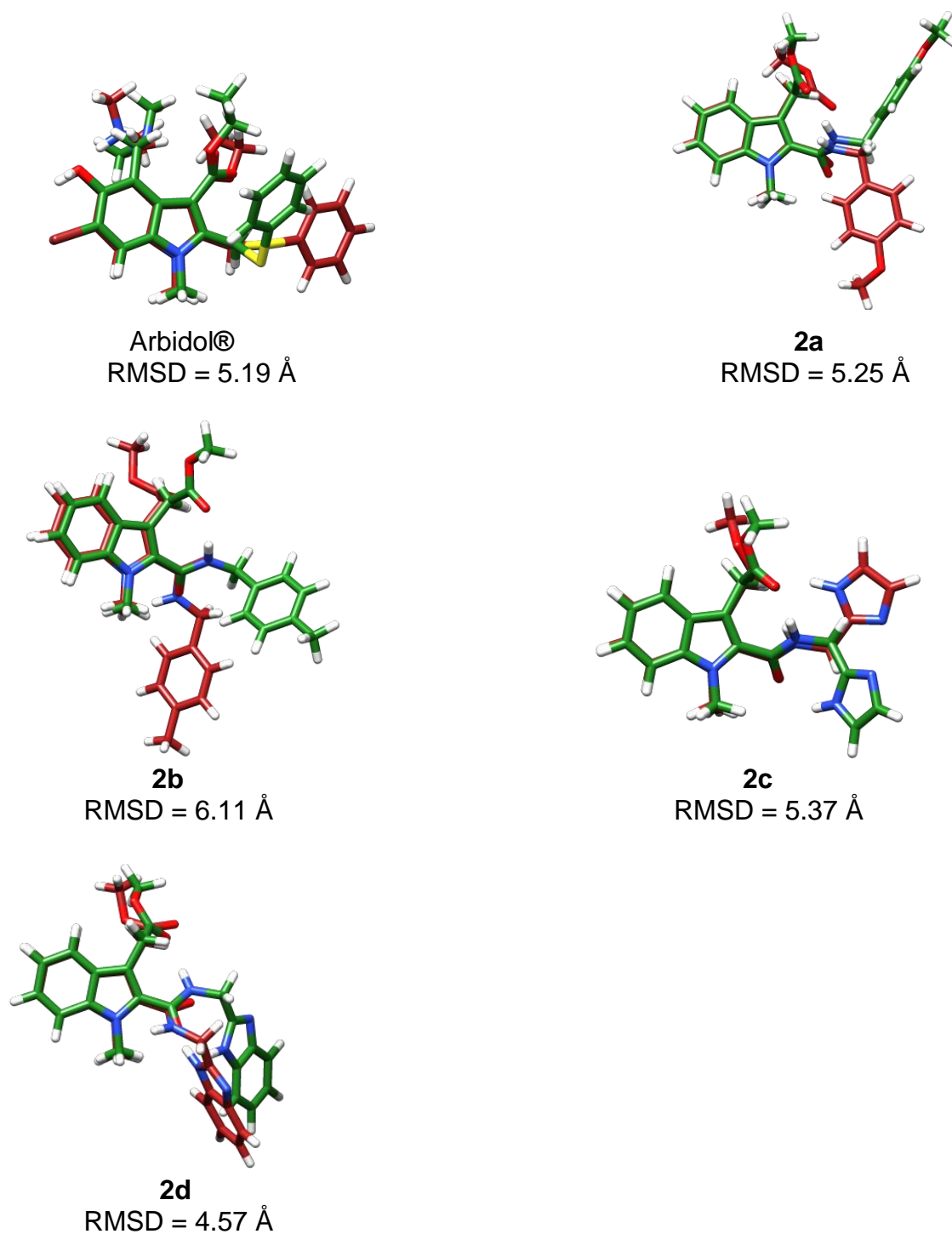
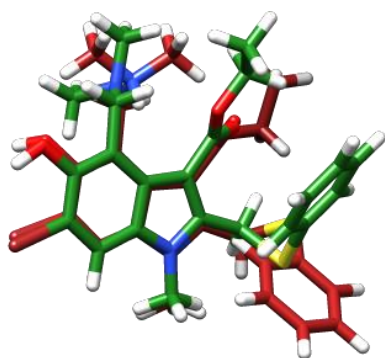
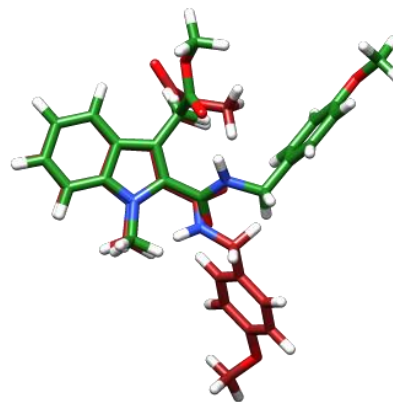


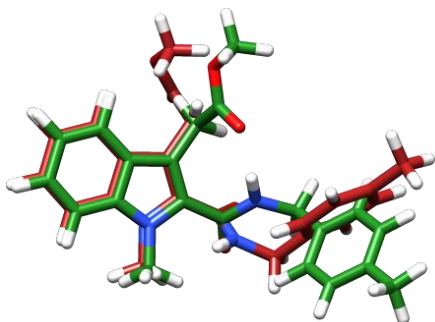
Figura 27. Sobreposición del conformero de mínima energía (verde) y la conformación adoptada en el complejo (rojo) para el Arbidol® y los ligandos **2a-2d** en el sitio *P2*.



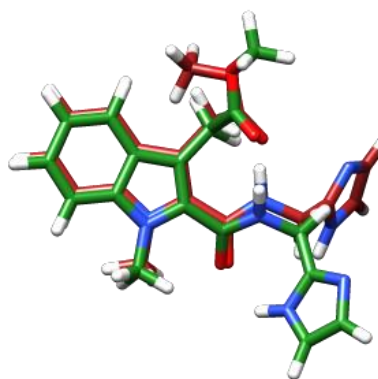
Arbidol@
RMSD = 4.95 Å



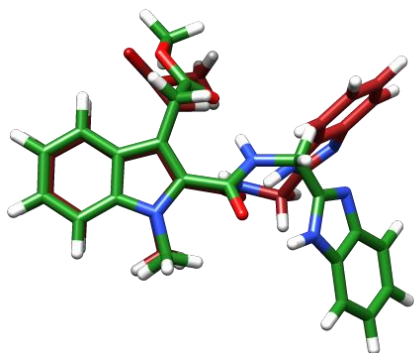
2a
RMSD = 5.29 Å



2b
RMSD = 5.57 Å



2c
RMSD = 5.12 Å



2d
RMSD = 5.17 Å

Figura 28. Sobreposición del conformero de mínima energía (verde) y la conformación adoptada en el complejo (rojo) para el Arbidol@ y los ligandos **2a-2d** en el sitio *P3*.

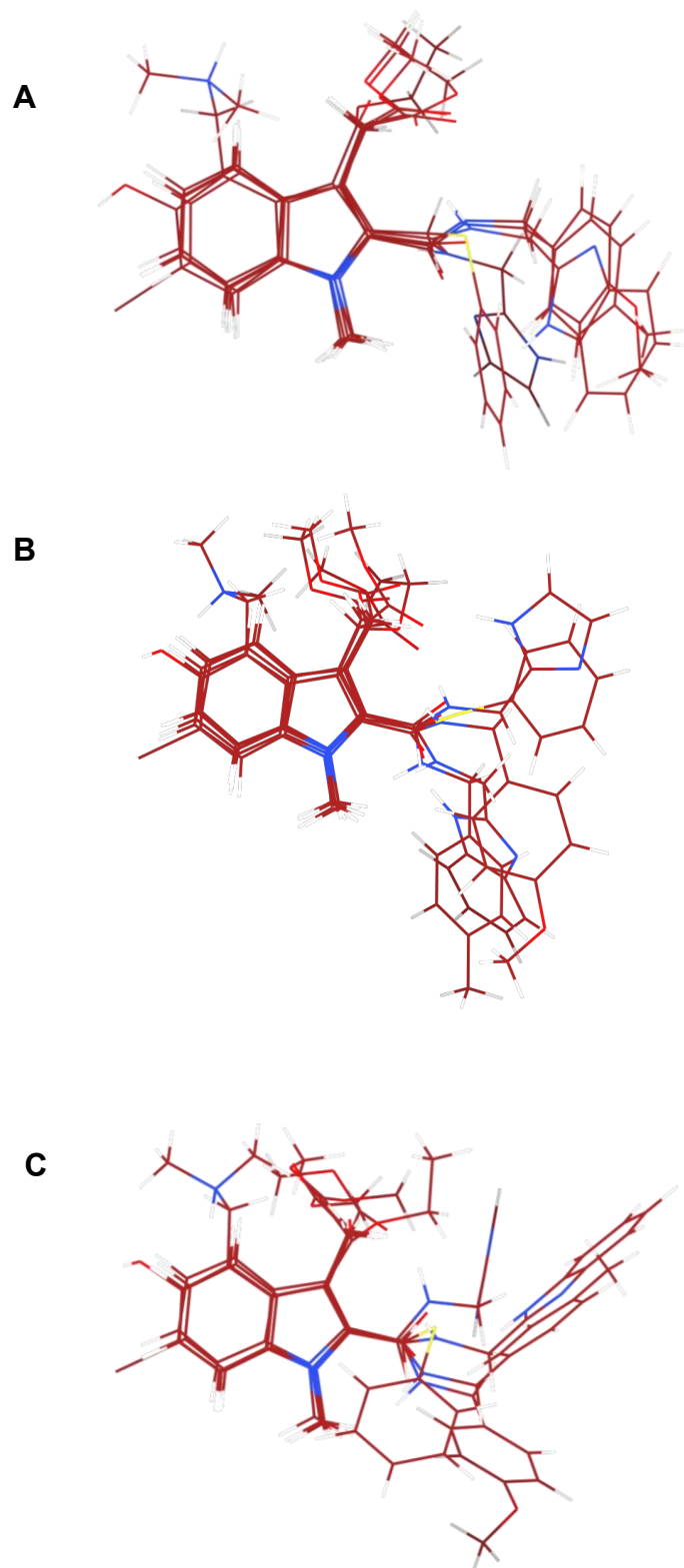


Figura 29. Sobreposición de las conformaciones adoptadas en el complejo para el Arbidol® y los ligandos **2a-2d** en el sitio *P1* (**A**) *P2* (**B**) y *P3* (**C**)

9. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se demostró que el uso de herramientas de bioinformática y modelado molecular son de gran utilidad para la búsqueda, identificación y priorización de sitios de unión o cavidades con potencial medicable (<<druggable>>) en la proteína S del SARS-CoV-2, sugiriendo que la proteína S es un blanco terapéutico potencial contra la COVID-19. Se encontró que compuestos conteniendo un núcleo indólico, adecuadamente sustituido con grupos que favorezcan el anclaje en la cavidad *P1* de la proteína S, pueden potencialmente actuar como bloqueadores de la entrada del virus SARS-CoV-2 inhibiendo la interacción con los receptores celulares.

Por lo anterior, resulta de interés realizar la síntesis química de nuevas “drug-likeness” indol-2-carboxamidas **2a-2d** y evaluar la actividad antiviral *in vitro* de estos compuestos.

10. Referencias

- Abi Hussein, H., Geneix, C., Petitjean, M., Borrel, A., Flatters, D., & Camproux, A. C. (2017). Global vision of druggability issues: applications and perspectives. *Drug Discovery Today*, 22(2), 404–415.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.021>
- Agoni, C., Olotu, F. A., Ramharack, P., & Soliman, M. E. (2020). Druggability and drug-likeness concepts in drug design: are biomodelling and predictive tools having their say? *Journal of Molecular Modeling*, 26(6).
<https://doi.org/10.1007/s00894-020-04385-6>
- Ahn, D. G., Shin, H. J., Kim, M. H., Lee, S., Kim, H. S., Myoung, J., Kim, B. T., & Kim, S. J. (2020). Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 313–324.
<https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03011>
- Allinger, N. L., Crabbe, P., & Pérez, G. (1966). The conformations of the acetyl side chains of some compounds related to pregnan-20-one. *Tetrahedron*, 22(1961), 1615–1623. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(66\)80152-7](https://doi.org/10.1016/0040-4020(66)80152-7)
- Andersson, M. P., & Uvdal, P. (2005). New scale factors for harmonic vibrational frequencies using the B3LYP density functional method with the triple- ζ basis Set 6-311+G(d,p). *Journal of Physical Chemistry A*, 109(12), 2937–2941. <https://doi.org/10.1021/jp045733a>
- Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G., & Schinazi, R. F. (2021). COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *Journal of Hepatology*, 74(1), 168–184. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.031>
- Berger, I., & Schaffitzel, C. (2020). The SARS-CoV-2 spike protein: balancing stability and infectivity. *Cell Research*, 30(12), 1059–1060.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-00430-4>
- Boriskin, Y., Leneva, I., Pecheur, E.-I., & Polyak, S. (2008). Arbidol: A Broad-Spectrum Antiviral Compound that Blocks Viral Fusion. *Current Medicinal Chemistry*, 15(10), 997–1005.

<https://doi.org/10.2174/092986708784049658>

- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I. H., Frearson, J., & Wyatt, P. G. (2008). Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem*, 3(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>
- Burton, L., Chabner, B., & Knollmann, B. (2012). *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12ª Edición). Mc Graw Hill.
- Chadha, N., & Silakari, O. (2017). Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 134, 159–184. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.003>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- Dhama, K., Khan, S., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4), 1–48.
- Dorababu, A. (2020). Indole-a promising pharmacophore in recent antiviral drug discovery. *RSC Medicinal Chemistry*, 11(12), 1335–1353. <https://doi.org/10.1039/d0md00288g>
- Duan, G. (2020). Intuition on virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Novel Research in Microbiology Journal*, 4(5), 955–967. <https://doi.org/10.21608/nrmj.2020.118446>
- Ferreira, L. L. G., & Andricopulo, A. D. (2019). ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 24(5), 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.015>
- Frisch, M., Scalmani, G., Vreven, T., & Zheng, G. (2009). Analytic second derivatives for semiempirical models based on MNDO. *Molecular Physics*, 107(8–12), 881–887. <https://doi.org/10.1080/00268970802676057>

- Gil, C., Ginex, T., Maestro, I., Nozal, V., Barrado-Gil, L., Cuesta-Geijo, M. ángel, Urquiza, J., Ramírez, D., Alonso, C., Campillo, N. E., & Martínez, A. (2020). COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. *Journal of Medicinal Chemistry* 63 (21). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00606>
- Gur, M., Taka, E., Yilmaz, S. Z., Kilinc, C., Aktas, U., & Golcuk, M. (2020). Conformational transition of SARS-CoV-2 spike glycoprotein between its closed and open states. *Journal of Chemical Physics*, 153(7). <https://doi.org/10.1063/5.0011141>
- Gürsoy, O., & Smieško, M. (2017). Searching for bioactive conformations of drug-like ligands with current force fields: How good are we? *Journal of Cheminformatics*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13321-017-0216-0>
- Hajduk, P. J., Huth, J. R., & Tse, C. (2005). Predicting protein druggability. *Drug Discovery Today*, 10(23–24), 1675–1682. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03624-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03624-X)
- Hopkins, A. L., & Groom, C. R. (2002). Opinion: The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), 727–730.
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X. feng, Xu, W., & Liu, S. wen. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Kumari, A., & Singh, R. K. (2019). Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic prospectives. *Bioorganic Chemistry*, 89, 103021. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103021>
- Lamb, Y. N. (2020). Remdesivir: First Approval. *Drugs*, 80, 1355–1363. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01378-w>
- Lin, X., Li, X., & Lin, X. (2020). A review on applications of computational methods in drug screening and design. *Molecules*, 25(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules25061375>
- Mikhailov, S., Scotti, L., Singla, R., & Scotti, M. (2016). Perspectives in Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(999), 1–2. <https://doi.org/10.2174/1568026616999160510121240>

- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2020). Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell*, 182(5), 1077–1092.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología Médica* (8ª edición). Elsevier.
- Ou-Yang, S. S., Lu, J. Y., Kong, X. Q., Liang, Z. J., Luo, C., & Jiang, H. (2012). Computational drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(9), 1131–1140. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.109>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91–102.
<https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Pellet, P. E., Mitra, S., & Holland, T. C. (2014). Basics of virology. *Basics of Virology*. In *Handbook of Clinical Neurology*, 123(January), 45–66.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00002-X>
- Perola, E., & Charifson, P. S. (2004). Conformational Analysis of Drug-Like Molecules Bound to Proteins: An Extensive Study of Ligand Reorganization upon Binding. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(10), 2499–2510.
<https://doi.org/10.1021/jm030563w>
- Sahebnasagh, A., Avan, R., Saghafi, F., Mojtahedzadeh, M., Sadremomtaz, A., Arasteh, O., Tanzifi, A., Faramarzi, F., Negarandeh, R., Safdari, M., Khataminia, M., Rezai Ghaleno, H., Habtemariam, S., & Khoshi, A. (2020). Pharmacological treatments of COVID-19. In *Pharmacological Reports* (Issue 0123456789). Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/s43440-020-00152-9>
- Samudrala, P. K., Kumar, P., Choudhary, K., Thakur, N., Wadekar, G. S., Dayaramani, R., Agrawal, M., & Alexander, A. (2020). Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *European Journal of Pharmacology*, 883, 173375.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173375>
- Shyr, Z. A., Gorshkov, K., Chen, C. Z., & Zheng, W. (2020). Drug discovery strategies for sars-cov-2. *Journal of Pharmacology and Experimental*

- Therapeutics*, 375(1), 127–138. <https://doi.org/10.1124/JPET.120.000123>
- Surade, S., & Blundell, T. L. (2012). Structural biology and drug discovery of difficult targets: The limits of ligandability. *Chemistry and Biology*, 19(1), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.013>
- Tang, T., Bion, M., Jaimes, J., Whittaker, G., & Daniel, S. (2020). Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Research, ELSEVIER*, 178, 104792. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104792>
- Teissier, E., Zandomenighi, G., Loquet, A., Lavillette, D., Lavergne, J. P., Montserret, R., Cosset, F. L., Böckmann, A., Meier, B. H., Penin, F., & Pécheur, E. I. (2011). Mechanism of inhibition of enveloped virus membrane fusion by the antiviral drug arbidol. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015874>
- Vankadari, N. (2020). Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(2), 105998. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105998>
- Volkamer, A., Kuhn, D., Grombacher, T., Rippmann, F., & Rarey, M. (2012). Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(2), 360–372. <https://doi.org/10.1021/ci200454v>
- Vukovic, S., & Huggins, D. J. (2018). Quantitative metrics for drug–target ligandability. *Drug Discovery Today*, 23(6), 1258–1266. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.02.015>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veerler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, X., Cao, R., Zhang, H., Liu, J., Xu, M., Hu, H., Li, Y., Zhao, L., Li, W., Sun, X., Yang, X., Shi, Z., Deng, F., Hu, Z., Zhong, W., & Wang, M. (2020). The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2

- in vitro. *Cell Discovery*, 6(1), 4–8. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0169-8>
- Watts, K. S., Dalal, P., Murphy, R. B., Sherman, W., Friesner, R. A., & Shelley, J. C. (2010). ConfGen: A conformational search method for efficient generation of bioactive conformers. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(4), 534–546. <https://doi.org/10.1021/ci100015j>
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Microbiología* (7^a edición). Mc Graw Hill.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.aax0902>
- Xiu, S., Dick, A., Ju, H., Mirzaie, S., Abdi, F., Cocklin, S., Zhan, P., & Liu, X. (2020). Inhibitors of SARS-CoV-2 entry: Current and future opportunities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(21), 12256–12274. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00502>
- Yuan, Y., Pei, J., & Lai, L. (2013). Binding Site Detection and Druggability Prediction of Protein Targets for Structure- Based Drug Design. *Current Pharmaceutical Design*, 19(12), 2326–2333. <https://doi.org/10.2174/1381612811319120019>
- Zhang, M. Z., Chen, Q., & Yang, G. F. (2015). A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 421–441. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.065>
- Zhou, S. F., & Zhong, W. Z. (2017). Drug design and discovery: Principles and applications. *Molecules*, 22(2), 1–6. <https://doi.org/10.3390/molecules22020279>
- Zumla, A., Chan, J. F. W., Azhar, E. I., Hui, D. S. C., & Yuen, K. Y. (2016). Coronaviruses-drug discovery and therapeutic options. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(5), 327–347. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.37>

11. ANEXO

11.1 Tablas y Figuras

Tabla I. Energía de unión de la pose más estable (menor energía) y la más poblada del ligando **2d** y del Arbidol® en las cavidades AB, BC y AC en los sitios de unión *P1*, *P2* y *P3* obtenida por docking molecular. Número de clústers (n), energía de unión (ΔG , kcal/mol) y población (p, %).

Ligando	Sitios de unión <i>P</i>	Clúster ^a (n)	Pose más estable		Pose más poblada	
			ΔG	p	ΔG	p
2d	<i>P1 AB</i>	14	-9.2	10.0	-9.0	46.0
	<i>P1 BC</i>	9	-9.5	18.0	-9.1	54.0
	<i>P1 AC</i>	18	-9.0	30.0	-9.0	30.0
	<i>P2 AB</i>	8	-7.9	22.0	-7.7	26.0
	<i>P2 BC</i>	16	-8.7	10.0	-7.7	22.0
	<i>P2 AC</i>	15	-8.7	26.0	-8.7	26.0
	<i>P3 AB</i>	19	-10.2	22.0	-10.2	22.0
	<i>P3 BC</i>	30	-10.2	26.0	-10.2	26.0
	<i>P3 AC</i>	15	-10.2	36.0	-10.2	36.0
Arbidol®	<i>P1 AB</i>	28	-8.3	14.0	-8.3	14.0
	<i>P1 BC</i>	18	-8.8	2.0	-8.2	12.0
	<i>P1 AC</i>	23	-8.9	2.0	-8.3	14.0
	<i>P2 AB</i>	21	-7.8	12.0	-6.5	16.0
	<i>P2 BC</i>	24	-7.8	14.0	-7.0	24.0
	<i>P2 AC</i>	27	-7.8	22.0	-7.8	22.0
	<i>P3 AB</i>	21	-8.7	2.0	-7.8	36.0
	<i>P3 BC</i>	32	-9.2	2.0	-7.5	16.0
	<i>P3 AC</i>	22	-7.9	26.0	-7.9	26.0

^a Conjunto de conformaciones con un RMSD igual o menor a 2.0 Å.

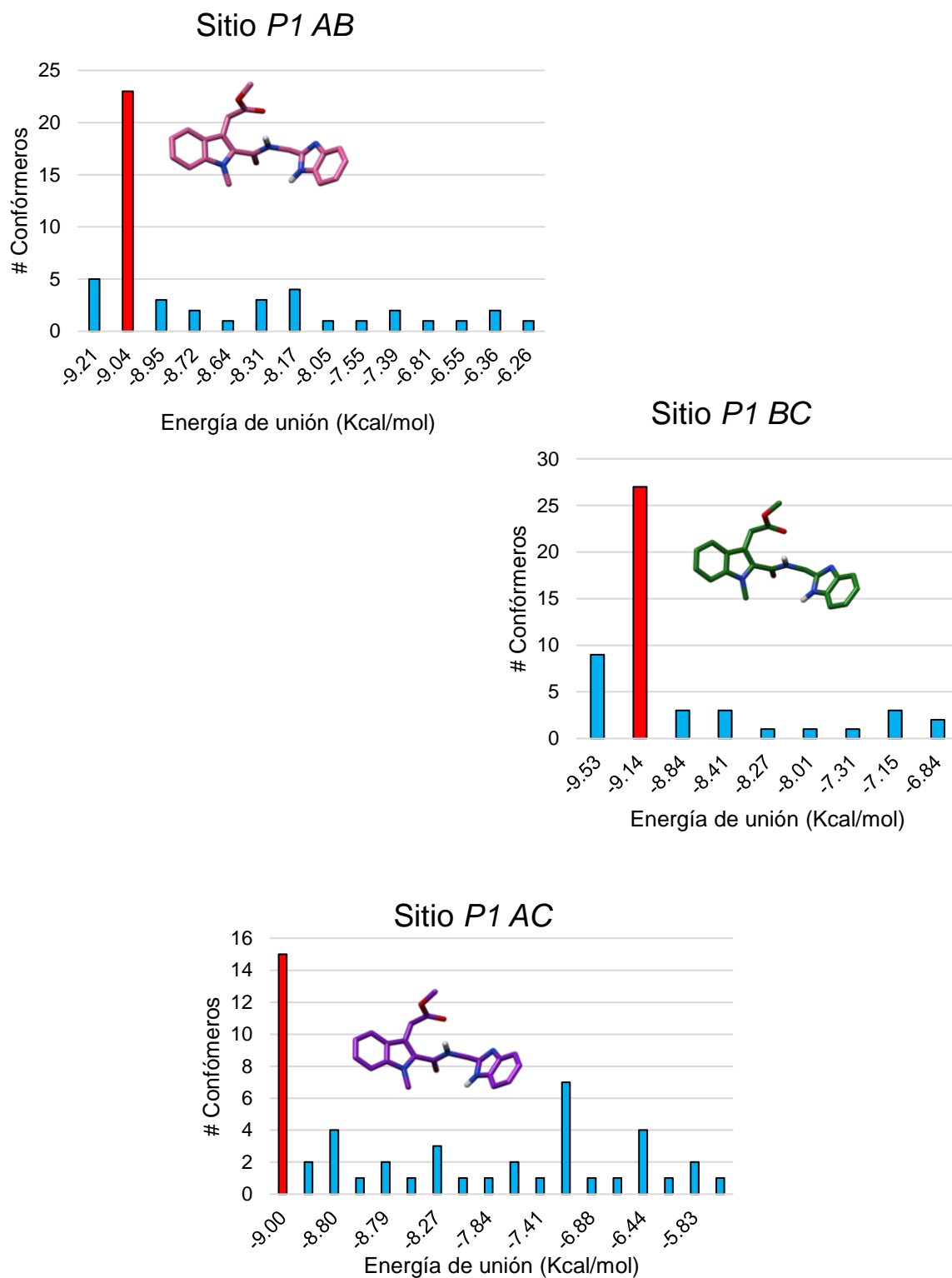


Figura I. Distribución de clústers (RMSD 2.0 Å) del ligando **2d** en las cavidades AB, BC y AC en el sitio de unión *P1* de la proteína S. Clúster de la pose ilustrada, en rojo.

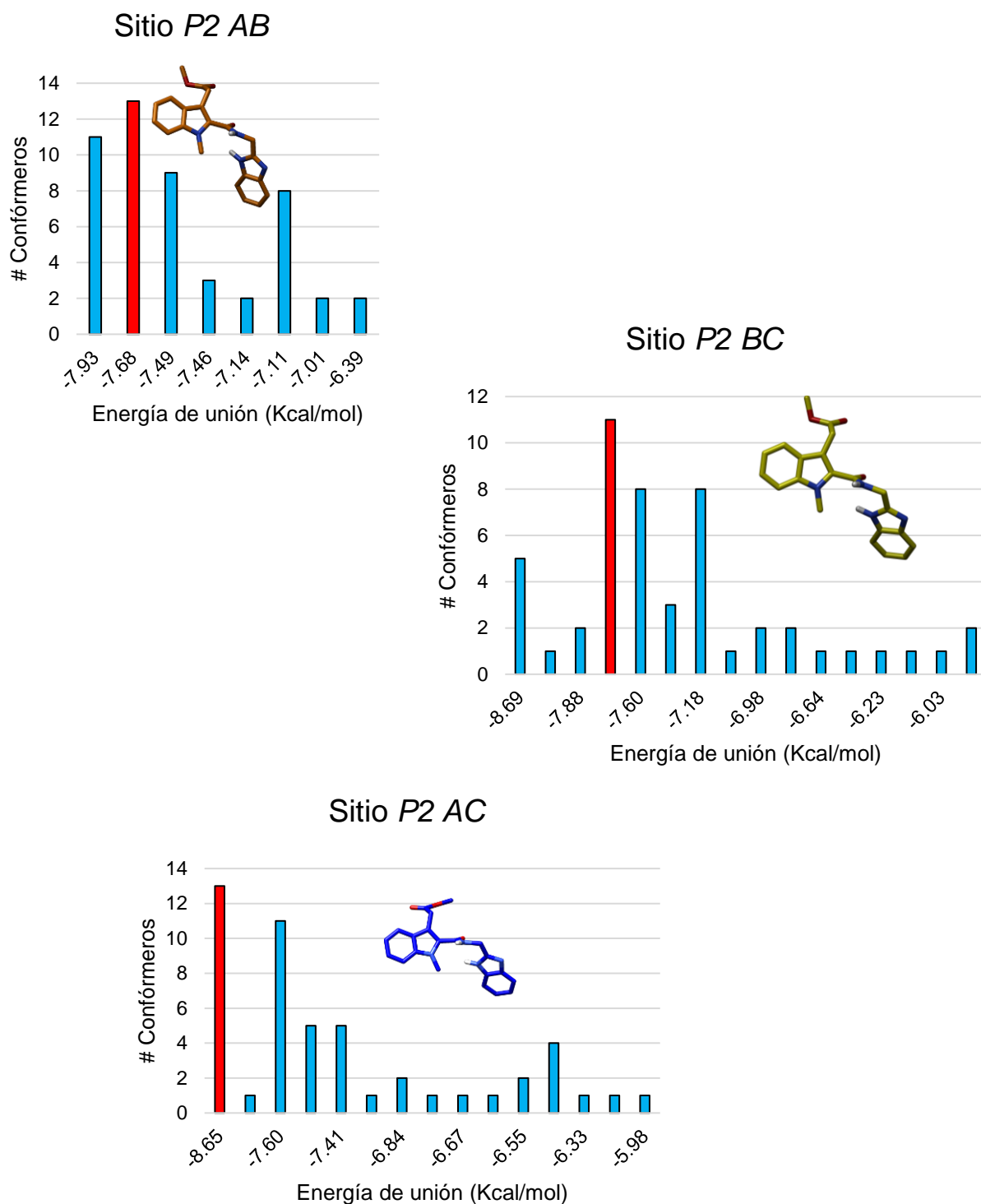


Figura II. Distribución de clústers (RMSD 2.0 Å) del ligando **2d** en las cavidades AB, BC y AC en el sitio de unión P2 de la proteína S. Clúster de la pose ilustrada, en rojo.

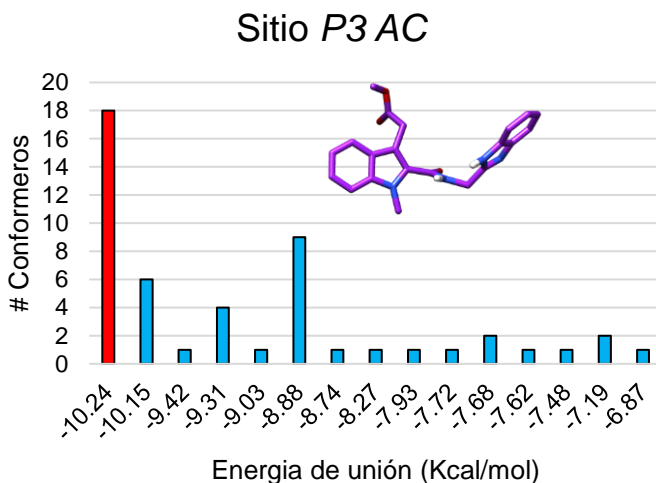
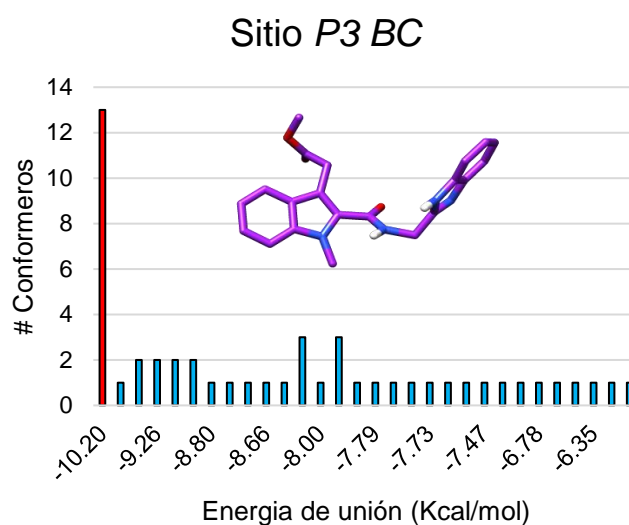
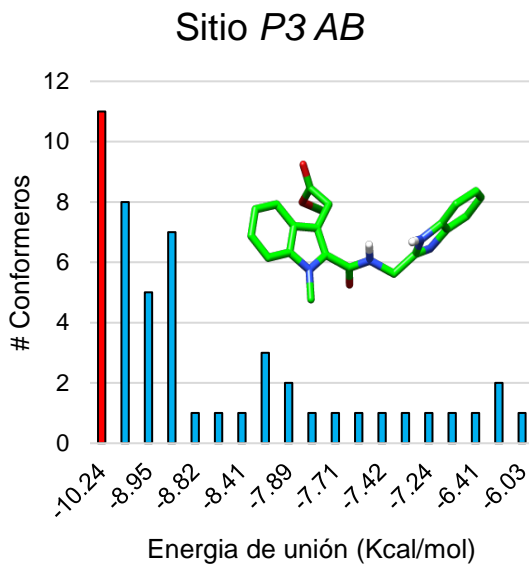


Figura III. Distribución de clústers (RMSD 2.0 Å) del ligando **2d** en las cavidades AB, BC y AC en el sitio de unión P3 de la proteína S. Clúster de la pose ilustrada, en rojo.

Tabla II. Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los residuos de aminoácidos en las cavidades AB, BC y AC en el del sitio *P1* de la proteína S con el ligando **2d** y el Arbidol®

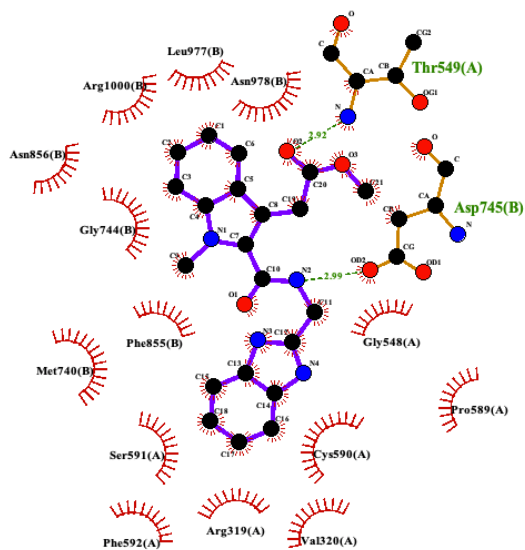
Ligando	Sitio de unión	Tipo de interacción	Aminoácidos involucrados
2d	<i>P1 AB</i>	Hidrofóbicas	Val320(A) Gly548(A) Pro589(A) Cys590(A) Phe592(A) Met740(B) Gly744(B) Phe855(B) Leu977(B)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(A) Asp745(B)
	<i>P1 BC</i>	Hidrofóbicas	Val320(B) Gly548(B) Pro589(B) Cys590(B) Phe592(B) Gly744(C) Phe855(C) Leu977(C)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(B) Asp745(C) Asn978(C)
	<i>P1 AC</i>	Hidrofóbicas	Val320(C) Gly548(C) Pro589(C) Cys590(C) Phe592(C) Gly744(A) Phe855(A) Leu977(A)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(C) Asp745(A)
Arbidol®	<i>P1 AB</i>	Hidrofóbicas	Phe541(A) Gly548(A) Ile587(A) Pro589(A) Phe855(B) Gly744(B)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(A) Met740(B)
	<i>P1 BC</i>	Hidrofóbicas	Phe541(B) Ile587(B) Pro589(B) Gly548(C) Gly744(C) Phe855(C)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(B) Met740(C)
	<i>P1 AC</i>	Hidrofóbicas	Met740(A) Gly744(A) Phe855(A) Phe541(C) Gly548(C) Ile587(C) Pro589(C)
		Puentes de hidrógeno	Thr549(C)

Tabla III. Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los residuos de aminoácidos en las cavidades AB, BC y AC en el del sitio *P2* de la proteína S con el ligando **2d** y el Arbidol®

Ligando	Sitio de unión	Tipo de interacción	Aminoácidos involucrados
2d	<i>P2 AB</i>	Hidrofóbicas	Gly311(A) Leu611(A) Ile666(A) Ala647(A) Val772(B) Leu861(B) Pro862(B)
		Puentes de hidrógeno	Ile312(A) Lys733(B)
	<i>P2 BC</i>	Hidrofóbicas	Gly311(B) Leu611(B) Ala647(B) Ile666(B) Val772(C) Leu861(C) Pro665(C)
		Puentes de hidrógeno	Ile312(B) Lys733(C)
	<i>P2 AC</i>	Hidrofóbicas	Val772(A) Leu861(A) Pro862(A) Leu611(C) Ala647(C) Pro665(C) Ile666(C)
		Puentes de hidrógeno	Lys733(A) Ile312(C)
Arbidol®	<i>P2 AB</i>	Hidrofóbicas	Gly311(A) Ile312(A) Pro665(A) Ile666(A) Gly667(A) Val772(B) Leu864(B)
		Puentes de hidrógeno	-
	<i>P2 BC</i>	Hidrofóbicas	Ile312(B) Leu611(B) Pro665(B) Gly667(B) Ala647(B) Ile666(B) Ala771(C) Val772(C) Pro862(C) Leu861(C)
		Puentes de hidrógeno	-
	<i>P2 AC</i>	Hidrofóbicas	Ala771(A) Val772(A) Leu861(A) Pro862(A) Ile312(C) Leu611(C) Ala647(C) Pro665(C) Ile666(C) Gly667(C)
		Puentes de hidrógeno	Lys733(A)

Tabla IV. Interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno de los residuos de aminoácidos en las cavidades AB, BC y AC en el del sitio *P3* de la proteína S con el ligando **2d** y el Arbidol®

Ligando	Sitio de unión	Tipo de interacción	Aminoácidos involucrados	
2d	<i>P3 AB</i>	Hidrofóbicas	Ile909(A) Val1040(A) Gly1046(A) Trp886(B) Ala890(B)	
		Puentes de hidrógeno	Lys1038(A) His1048(A) Gln1036(B)	
	<i>P3 BC</i>	Hidrofóbicas	Val1040(B) Gly1046(B) Trp886(C) Ala890(C)	
		Puentes de hidrógeno	His1048(B) Gln1036(C)	
	<i>P3 AC</i>	Hidrofóbicas	Trp886(A) Ala890(A) Val1040(C) Gly1046(C)	
		Puentes de hidrógeno	Gln1036(A) His1048(C)	
	Arbidol®	<i>P3 AB</i>	Hidrofóbicas	Trp886(B) Ile909(A) Val1040(A)
			Puentes de hidrógeno	Arg1091(B)
<i>P3 BC</i>		Hidrofóbicas	Trp886(C) Ile909(B) Val1104(B) Phe1121(B)	
		Puentes de hidrógeno	Arg1091(C)	
<i>P3 AC</i>		Hidrofóbicas	Trp886(A) Ile909(C) Val1104(C) Phe1121(C)	
		Puentes de hidrógeno	Arg1091(A)	



A

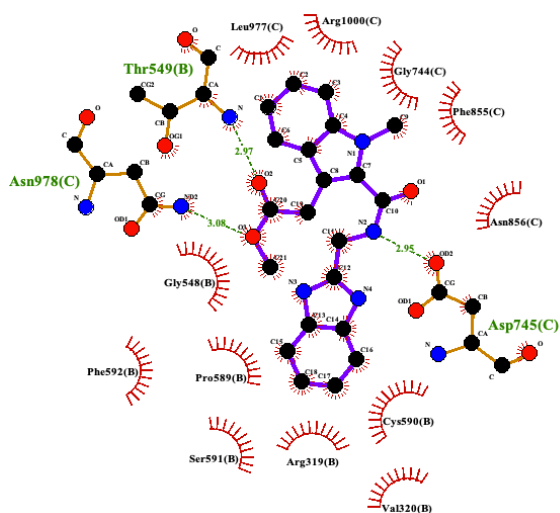
$\Delta G = -9.0$ Kcal/mol

$p = 46.0$

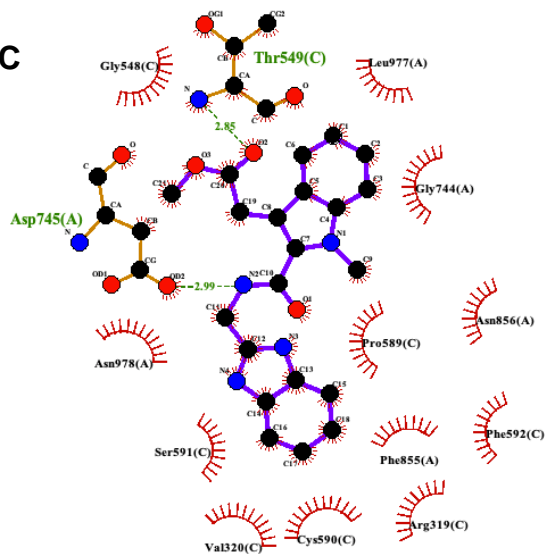
B

$\Delta G = -9.1$ Kcal/mol

$p = 54.0$



C

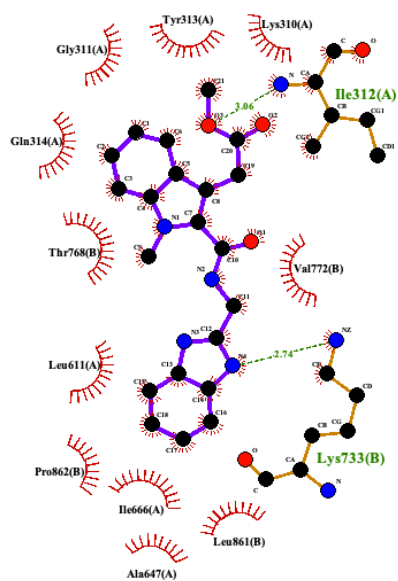


C

$\Delta G = -8.7$ Kcal/mol

$p = 26.0$

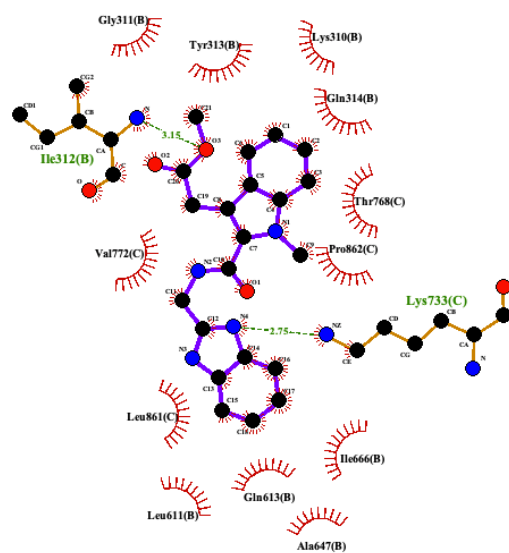
Figura IV. Interacciones del ligando **2d** con aminoácidos en el sitio de unión *P1* de la proteína *S*. **A)** cavidad AB, **B)** cavidad BC, **C)** cavidad AC.



A

$$\Delta G = -7.7 \text{ Kcal/mol}$$

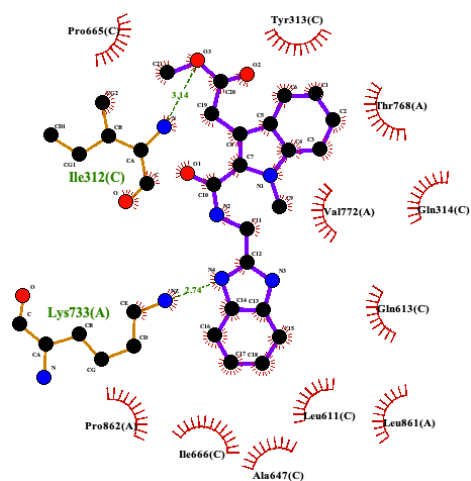
$$p = 26.0$$



B

$$\Delta G = -7.7 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 22.0$$

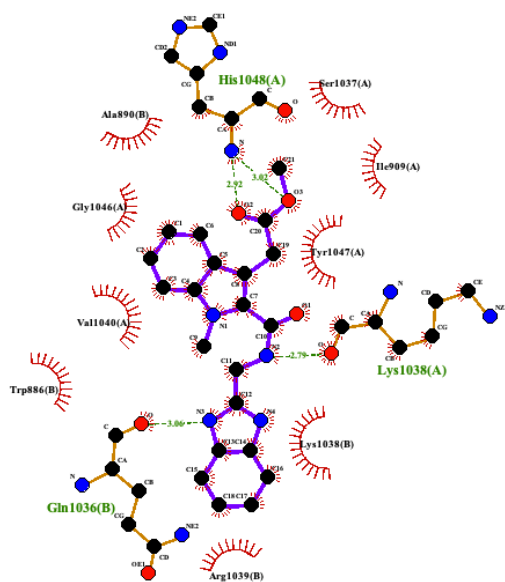


C

$$\Delta G = -7.7 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 22.0$$

Figura V. Interacciones del ligando **2d** con aminoácidos en el sitio de unión *P2* de la proteína *S*. **A)** cavidad AB, **B)** cavidad BC, **C)** cavidad AC.



A

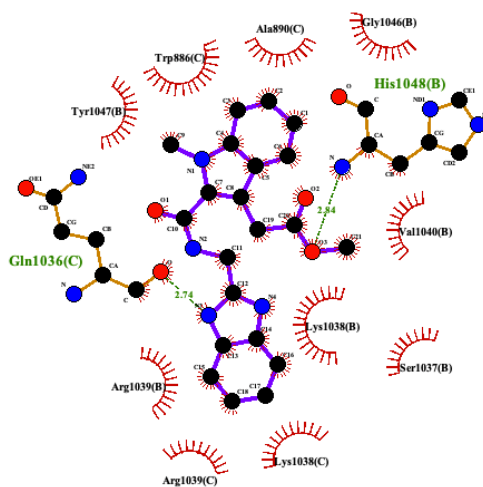
$$\Delta G = -10.2 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 22.0$$

B

$$\Delta G = -10.2 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 26.0$$



C

$$\Delta G = -10.2 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 36.0$$

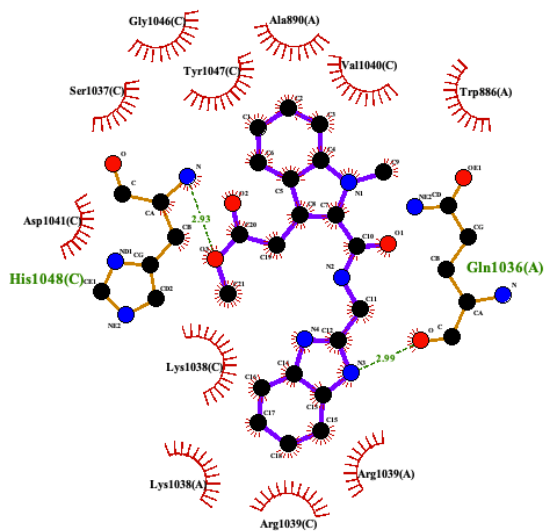
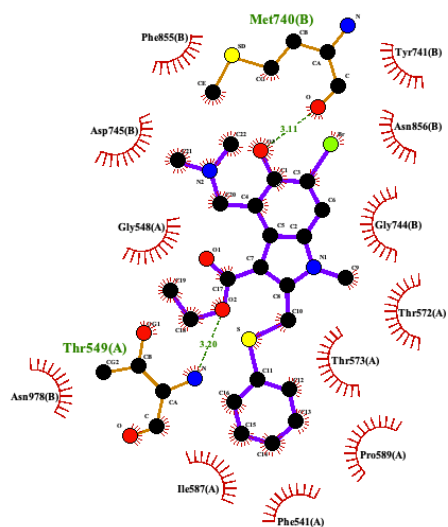


Figura VI. Interacciones del ligando **2d** con aminoácidos en el sitio de unión *P3* de la proteína *S*. **A)** cavidad AB, **B)** cavidad BC, **C)** cavidad AC.



A

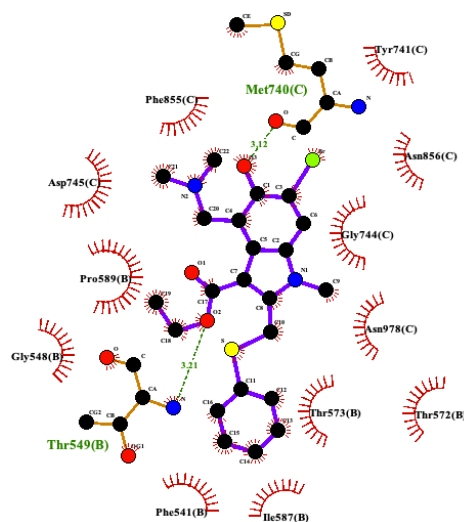
$\Delta G = -8.3$ Kcal/mol

$p = 14.0$

B

$\Delta G = -8.2$ Kcal/mol

$p = 12.0$



C

$\Delta G = -8.3$ Kcal/mol

$p = 14.0$

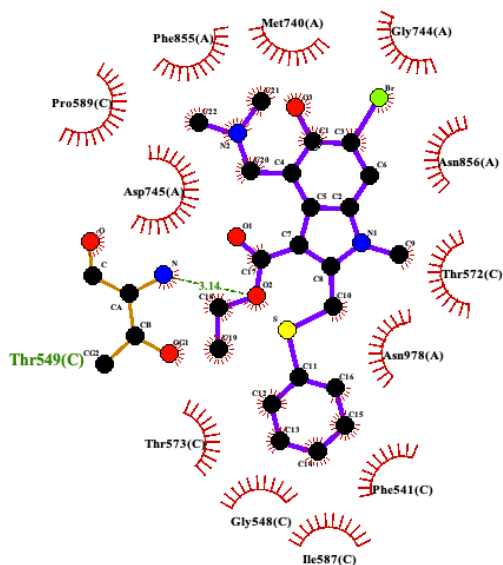
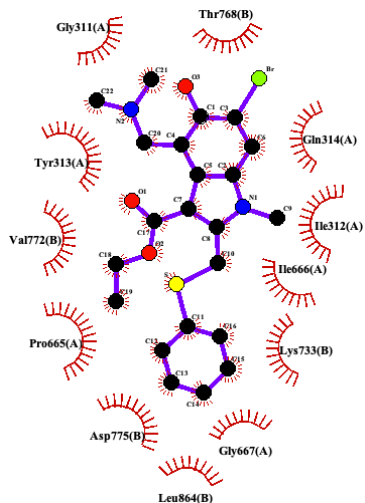


Figura VII. Interacciones del Arbidol® con aminoácidos en el sitio de unión *P1* de la proteína S. **A)** cavidad AB, **B)** cavidad BC, **C)** cavidad AC.



A

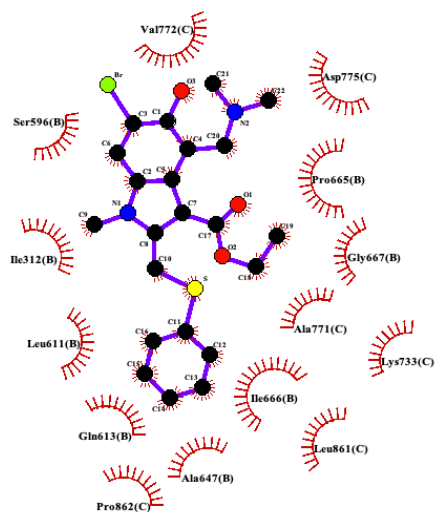
$$\Delta G = -6.5 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 16.0$$

B

$$\Delta G = -7.0 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 24.0$$



C

$$\Delta G = -7.8 \text{ Kcal/mol}$$

$$p = 22.0$$

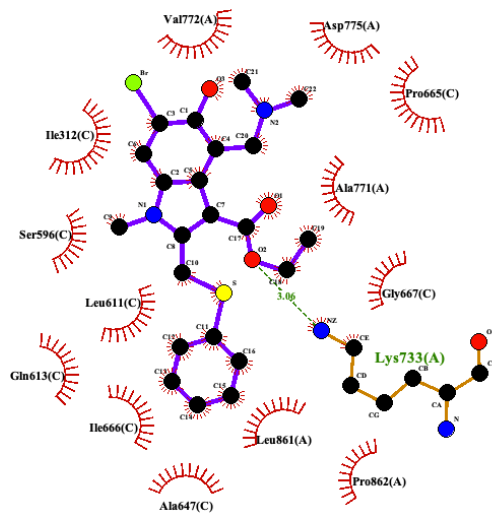
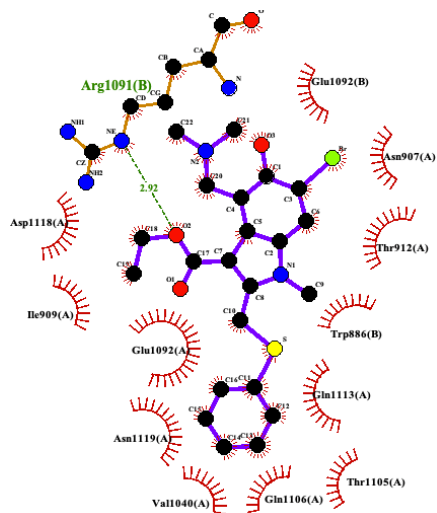


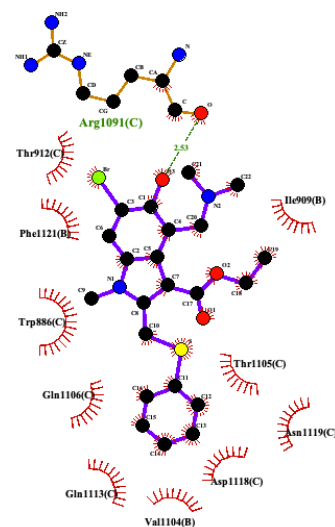
Figura VIII. Interacciones del Arbidol® con aminoácidos en el sitio de unión *P2* de la proteína S. **A)** cavidad AB, **B)** cavidad BC, **C)** cavidad AC.



A

$\Delta G = -7.8$ Kcal/mol

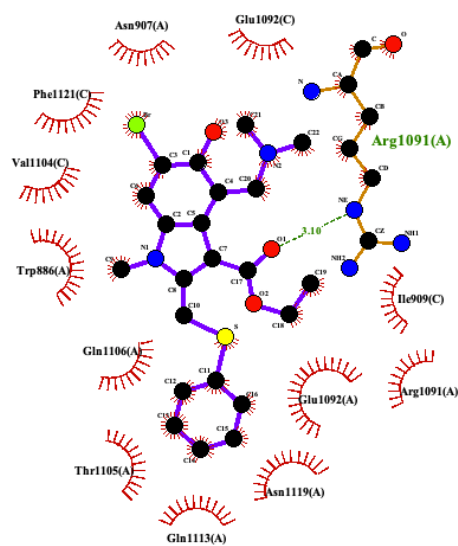
$p = 36.0$



B

$\Delta G = -7.5$ Kcal/mol

$p = 16.0$



C

$\Delta G = -7.9$ Kcal/mol

$p = 26.0$

Figura IX. Interacciones del Arbidol® con aminoácidos en el sitio de unión *P3* de la proteína S. **A)** cavidad AB, **B)** cavidad BC, **C)** cavidad AC.