



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Cribado virtual de inhibidores de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos de animales.

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este Trabajo de Titulación forma parte del Proyecto “Diseño racional de inhibidores con potencial actividad antiviral contra el virus SARS-CoV-2 (COVID-19)”, auspiciado por la UODIDE mediante la Convocatoria 2020 y coordinado por Mario Daniel García Solís, Ph.D.

Autora: María Lisette Ramos Aristimbay

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Enero – 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato

Ambato, 16 de diciembre del 2020

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Ramos Aristimbay María Lisette, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



María Lisette Ramos Aristimbay

C.I. 1803322708

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

C.I.: 1714348859

Mg. Mayra Fernanda Chico Terán

C.I.: 1003327044

Ambato, 11 de enero del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



María Lisette Ramos Aristimbay

C.I. 1803322708

AUTORA

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mi Madre Angélica Aristimbay,
a mi padre Washington Ramos,
a mi hermano Jean Pierre
y principalmente, a mi hijo, quien ha sido mi motivación.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis agradecimientos primero a Dios, por permitirme compartir mi vida con mis seres queridos y bendecirme a mí y a mi familia, por darme fortaleza para atravesar los momentos de adversidad y porque gracias a él estoy cumpliendo mis sueños.

Agradezco a mis padres, por apoyarme incondicionalmente, por esforzarse para que yo me convierta en una profesional, por inculcarme valores tan importantes como el respeto, la honestidad y especialmente la responsabilidad, porque me han enseñado a no rendirme y luchar por cumplir mis propósitos. A mi hermano, por ayudarme en todo momento y hacer que mi vida se vea más fácil. A mi hijo, por ser lo más importante que tengo, ya que gracias a él me he planteado metas y por él debo cumplirlas, por hacerme feliz, impulsarme y motivarme en mis momentos difíciles, por ser la luz de mi vida.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por brindarme todas las enseñanzas que me ayudarán a ser una excelente profesional.

A mi tutor, Dr. Mario García, por los conocimientos compartidos, por el tiempo brindado, por la paciencia y el apoyo. Le extiendo mi gratitud por atender mis dudas y guiarme en este proceso, ya que gracias a su ayuda he podido culminar mi proyecto de titulación.

Y, finalmente, agradezco a todos, quienes me han apoyado y han confiado en mis capacidades. Le agradezco a mi novio, por la paciencia, el apoyo y el cariño que me brinda, por ayudarme a creer en mí y a superar las dificultades que ha conllevado este proceso de desarrollo profesional y personal.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. SARS-CoV-2	1
1.1.1.1. Taxonomía.....	1
1.1.1.2. Origen.....	2
1.1.1.3. Estructura.....	3
1.1.1.4. Mecanismo de Infección	4
1.1.2. COVID-19	5
1.1.2.1. Síntomas	6
1.1.2.2. Índice de Mortalidad	6
1.1.2.3. Distribución de la enfermedad	7
1.1.2.4. Otras enfermedades causadas por coronavirus.....	8
1.1.3. Proteasa Principal M ^{PRO}	9
1.1.3.1. Estructura y función	9
1.1.3.2. Diseño de inhibidores	10
1.2. Objetivos	13
1.2.1. Objetivo general.....	13
1.2.2. Objetivos específicos	13
1.3. Hipótesis.....	13
1.3.1. Hipótesis nula	13
1.3.2. Hipótesis alternativa	13
1.4. Señalamiento de las variables de la hipótesis	14
1.4.1. Variables dependientes	14
1.4.2. Variables independientes	14
CAPÍTULO II	15
METODOLOGÍA	15

2.1.	Materiales.....	15
2.1.1.	Páginas web	15
2.1.2.	Softwares Bioinformáticos	15
2.1.3.	Librerías de compuestos	15
2.1.4.	Códigos PDB de los compuestos usados	15
2.1.5.	Equipos	16
2.2.	Métodos.....	16
2.2.1.	Secuencia y estructura tridimensional de la proteína M ^{pro}	16
2.2.2.	Análisis de homología de M ^{pro} de SARS-CoV-2 en PDBeFold.....	17
2.2.3.	Análisis de homología de M ^{pro} de SARS-CoV-2 en UniProt	18
2.2.4.	Alineamiento múltiple de secuencias	19
2.2.5.	Determinación de posibles inhibidores de la enzima M ^{pro} y construcción de librerías de compuestos	20
2.2.6.	Determinación de sitios drogables en la enzima M ^{pro}	21
2.2.7.	Acoplamiento molecular.....	21
CAPÍTULO III.....		23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		23
3.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	23
3.1.1.	Análisis de homología estructural entre la enzima M ^{pro} del virus SARS-CoV-2 y proteasas de virus animales.	23
3.1.2.	Determinación de sitios de posible unión de inhibidores a la enzima M ^{pro} del virus SARS-CoV-2.....	29
3.1.3.	Generación de una librería de compuestos para análisis de acoplamiento molecular.....	37
3.1.4.	Determinación de los mejores inhibidores de la proteasa M ^{pro} mediante el análisis de sus propiedades de unión con la enzima.....	48
3.2.	Verificación de hipótesis.....	58
CAPÍTULO IV.....		60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		60
4.1.	Conclusiones	60
4.2.	Recomendaciones.....	61
BIBLIOGRAFÍA		62
ANEXOS		70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2.....	4
Figura 2. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2.....	5
Figura 3. Carmofur unido a M ^{pro} de SARS-CoV-2.....	11
Figura 4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la enzima M ^{pro} procedente de los virus SARS-CoV-2 y BatCoV.....	12
Figura 5. Estructura de la proteasa M ^{pro} de SARS-CoV-2.....	24
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias entre M ^{pro} de SARS-CoV-2 y proteasas de CoVs mostrados en la tabla 1.....	34
Figura 7. Representación de M ^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3	36
Figura 8. Superposición de estructuras de M ^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con distintos inhibidores.....	50
Figura 9. Representación de M ^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con los mejores inhibidores.....	55
Figura 10. Interacciones entre los residuos de M ^{pro} de SARS-CoV-2 y el inhibidor MMV637861.....	56
Figura 11. Interacciones entre los residuos de M ^{pro} de SARS-CoV-2 y el inhibidor MMV688774.....	57
Figura 12. Interacciones entre los residuos de M ^{pro} de SARS-CoV-2 y el inhibidor MMV000025.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación estructural entre la proteína M ^{pro} del virus SARS-CoV-2 y proteasas virales de animales.....	25
Tabla 2. Valores de puntuación de homología de UniProt	28
Tabla 3. Ligandos con actividad inhibitoria de la enzima M ^{pro} del virus SARS-CoV-2 y otras proteasas virales de animales determinados mediante análisis de homología estructural y revisión bibliográfica.....	38
Tabla 4. Resultados de acoplamiento molecular de los 10 mejores inhibidores de la enzima M ^{pro} de SARS-CoV-2.....	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Análisis de homología de la proteasa principal M ^{pro} de SARS-CoV-2 mediante la herramienta PDBeFold	70
Anexo A.1. Resultados obtenidos en el análisis de homología de M ^{pro} de SARS-CoV-2 y proteasas de virus animales en PDBeFold.....	70
Anexo B. Identificación de los sitios drogables de la proteasa principal M ^{pro} de SARS-CoV-2.....	73
Anexo B.1. Interacciones de inhibidores con los residuos de M ^{pro} de SARS-CoV-2	73
Anexo B.2. Interacciones de inhibidores con los residuos de M ^{pro} de HKU4-CoV	74
Anexo B.3. Interacciones de inhibidores con los residuos de M ^{pro} de MHV	74
Anexo B.4. Interacciones de inhibidores con los residuos de M ^{pro} de PEDV	74
Anexo B.5. Interacciones de inhibidores con los residuos de M ^{pro} de TGEV.....	75
Anexo B.6. Interacciones de inhibidores con los residuos de M ^{pro} de FIPV.....	75
Anexo B.7. Interacciones de inhibidores con los residuos de M ^{pro} de IBV	75
Anexo C. Librería de ligandos generados para realizar el acoplamiento molecular .	76
Anexo C.1. Ligandos obtenidos de la página PDB y de revisión de literatura.	76
Anexo D. Análisis de acoplamiento molecular entre la enzima M ^{pro} y los ligandos obtenidos de las librerías.....	81
Anexo D.1. Resultados del docking entre los inhibidores determinados y la proteasa principal M ^{pro} de SARS-CoV-2.....	81
Anexo D.2. Interacciones entre los mejores inhibidores determinados mediante docking y la proteasa principal M ^{pro} de SARS-CoV-2.....	85

RESUMEN

El presente estudio tiene como propósito realizar un cribado virtual de inhibidores de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos de animales. En respuesta a la presente pandemia por la que está atravesando el mundo, causada por el COVID-19, por lo que es de suma importancia la búsqueda de compuestos, que eviten la propagación del SARS-CoV-2, con los que se puedan realizar medicamentos para frenar los contagios de esta enfermedad. Dado que la proteasa principal M^{pro} es la encargada de llevar a cabo los procesos proteolíticos durante la replicación del virus, se la ha seleccionado como target para la búsqueda de moléculas que inhiban su actividad, evitando así que el virus continúe multiplicándose. Para esto, se realizó un análisis de homología con el que se pudo identificar que esta proteasa se encuentra conservada en varias especies de coronavirus que infectan a animales, como aquellos que causan la hepatitis murina, la gastroenteritis transmisible porcina, la peritonitis felina y la bronquitis infecciosa aviar. Lo que permitió buscar compuestos que se utilicen para tratar estas enfermedades, y crear una librería con los ligandos más efectivos. Con esto se pudo determinar los sitios drogables de la enzima y realizar un acoplamiento molecular (docking), identificando diez inhibidores que se unen mejor a M^{pro}, entre ellos el Ritonavir, con los que, mediante posteriores estudios *in vitro*, se podrían generar fármacos contra el COVID-19, y además probarlos en otros coronavirus con los que existe homología.

Palabras clave: SARS-CoV-2, proteasa principal M^{pro}, coronavirus, inhibidores enzimáticos, bioinformática, homología, cribado virtual, actividad antiviral.

ABSTRACT

The purpose of this study is to perform virtual screening of SARS-CoV-2 virus M^{pro} enzyme inhibitors using compound libraries and structural homology with animal pathogenic virus proteases. In response to the present pandemic the world is going through, caused by COVID-19, so it is of paramount importance to search for compounds, which prevent the spread of SARS-CoV-2, with which medicines can be made to curb the contagions of this disease. Since the main protease M^{pro} is responsible for carrying out the proteolytic processes during the replication of the virus, it has been selected as a target for the search for molecules that inhibit its activity, thus preventing the virus from continuing to multiply. For this, a homology analysis was performed that could identify that this protease is preserved in several species of coronavirus that infect animals, such as those that cause murine hepatitis, swine transmissible gastroenteritis, feline peritonitis and avian infectious bronchitis. Which allowed us to look for compounds used to treat these diseases, and to create a library with the most effective ligands. This was able to determine the druggable sites of the enzyme and perform a molecular coupling (docking), identifying ten inhibitors that best bind to M^{pro}, including Ritonavir, with which, through subsequent *in vitro* studies, COVID-19 drugs could be generated, and also tested in other coronaviruses with which homology exists.

Keywords: SARS-CoV-2, main protease M^{pro}, coronavirus, enzyme inhibitors, bioinformatics, homology, virtual screening, antiviral activity.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. SARS-CoV-2

El coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo, SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés, es el virus causante de la enfermedad COVID-19, la cual fue reportada por primera vez en la ciudad de Wuhan, en China, el 31 de diciembre del 2019, esparciéndose posteriormente en la mayoría de los países del mundo, por lo que la Organización Mundial de la Salud la declaró pandemia el 12 de marzo del 2020.

Se sabe que el SARS-CoV-2 es un virus transmisible entre los humanos, con altos índices infecciosos, por lo que la OMS ha determinado que su número reproductivo básico (R_0) se encuentra entre 1.4 y 3.5. Además, según estudios epidemiológicos, la incubación del virus se da en el transcurso de 2 a 14 días, siendo el quinto día en el que empieza la aparición de los primeros síntomas (**Pastrian, 2020**).

Se trata de un virus de origen zoonótico, ya que su hospedero principal es un animal, a partir del cual se transmitió a humanos, para analizar su secuencia por primera vez, se aisló una muestra de uno de los primeros pacientes de Wuhan que presentaron este tipo de neumonía (**World Health Organization, 2020**).

1.1.1.1. Taxonomía

El SARS-CoV-2 es un virus que pertenece al dominio *Riboviria*, encontrándose en el orden de los *Nidovirales*, que son aquellos que tienen ARN monocatenario positivo, usando un conjunto de ARN mensajero para su replicación. Es miembro de la familia *Coronaviridae*, razón por la cual recibe el nombre de coronavirus, ya que en su envoltura contiene glicoproteínas en forma de espículas o también llamadas peplómeros (**Pastrian, 2020**). En esta familia se encuentra la subfamilia *Orthocoronavirinae*, que a su vez se divide en cuatro géneros, que son: los *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*, siendo los dos primeros los que infectan únicamente a mamíferos, mientras que los otros, además, pueden infectar a aves. HCoV-229E y HCoV-NL63 son ejemplos de

alfacoronavirus que se transmiten a humanos, así mismo, HCoV-OC43 HCoV-HKU1 representan a los betacoronavirus, que causan una gripe común, en este último género también se alojan el MERS-CoV y los dos tipos de SARS-CoV existentes (**Amanat & Krammer, 2020**).

1.1.1.2. Origen

Los animales son reservorios de una gran cantidad de virus, los cuales mediante mutaciones pueden llegar a infectar a humanos, generando enfermedades que pueden ser leves o críticas. Tal es el caso del SARS, MERS y COVID-19, que son afecciones causadas por coronavirus provenientes del murciélago, ya que se ha demostrado que comparten aproximadamente un 96% de identidad genómica con BatCoV RaTG13, que infecta a *Rhinolophus affinis*. Sin embargo, estos debieron evolucionar pasando por un organismo intermedio que permita acoplar los sitios de unión del virus a los humanos para que puedan ser transmitidos (**Andersen et al., 2020**). Según estudios, se ha logrado identificar a las civetas de palma como intermediarios para el SARS y a los dromedarios para el MERS (**Ullrich & Nitsche, 2020**).

En el caso del SARS-CoV-2 aún no se sabe con exactitud cuál es el organismo que permitió esta transmisión evolutiva, por lo que es de suma importancia el estudio y comparación de las secuencias de virus de animales con este coronavirus y así disminuir la propagación de este.

El SARS-CoV-2 presenta un dominio de unión al receptor (RBD) el cual se vincula a la enzima convertidora de Angiotensina 2 (ACE2) de humanos (**Armijos et al., 2020**). En BatCoV RaTG13 existen variaciones en esta estructura, presentando 17 aminoácidos diferentes, 4 de los cuales se encuentran en el sitio activo, lo que significa que no puede existir una interacción eficiente entre el dominio de esta especie con la hACE2 (**Andersen et al., 2020**). Por lo que existen hipótesis, las cuales mencionan que el pangolín podría haber sido el intermediario para que el SARS-CoV-2 infecte a humanos.

Según un estudio realizado por **Zhang et al. (2020)**, al analizar las secuencias de coronavirus provenientes de Pangolines malayos muertos, comparando todo el genoma del Pangolin-CoV con SARS-CoV-2, se demostró que estos eran 91.02%

idénticos. Además, al comparar los aminoácidos de RBD, entre estos dos virus, determinaron que estos se encuentran altamente conservados, existiendo un solo cambio en la histidina 500 por glutamina, que no es un residuo clave para la interacción con ACE2 humana. Así mismo se determinó que la similitud existente entre Pangolin-CoV y BatCoV RaTG13 era de 90.55%.

1.1.1.3. Estructura

En cuanto a las bases genéticas y moleculares que se conocen de este coronavirus, se ha documentado que presenta una forma esférica con un diámetro que oscila entre 60 y 140 nm, cuyas espigas poseen una longitud entre los 8 y 12 nm. Además, contiene una envoltura externa y una nucleocápside que protege el material genético (figura 1), el cual se asocia a esta mediante la proteína de la nucleocápside (N), la que a su vez esta insertada dentro de la bicapa de fosfolípidos de la capa externa. Las proteínas principales de esta envoltura son la Spike (S), que presenta dos subunidades S1 y S2, y permite la unión del virus al huésped, la proteína de membrana (M), que mantiene la forma curvada de la misma y se une a la nucleocápside, y la proteína de envoltura (E), que lleva a cabo el ensamblaje. También posee proteínas accesorias como la hemaglutinina esterasa (HE), cuya función es facilitar la entrada del virus a las células para la infección (**Pastrian, 2020**).

El virus está formado por ARN monocatenario de aproximadamente 30 kb. La cadena tiene en el extremo 5' una forma de capa metilada y en el 3' una cola poli A, por lo que se asemeja al ARNm de los huéspedes. Además, la secuencia de ARN presenta seis marcos de lectura abiertos (ORF). Los ORF1a y ORF1b, situados en el gen que codifica a la replicasa viral, ocupan dos tercios del genoma total, el un tercio restante codifica para las proteínas N, S, M, E y HE (**Dai et al., 2020**).

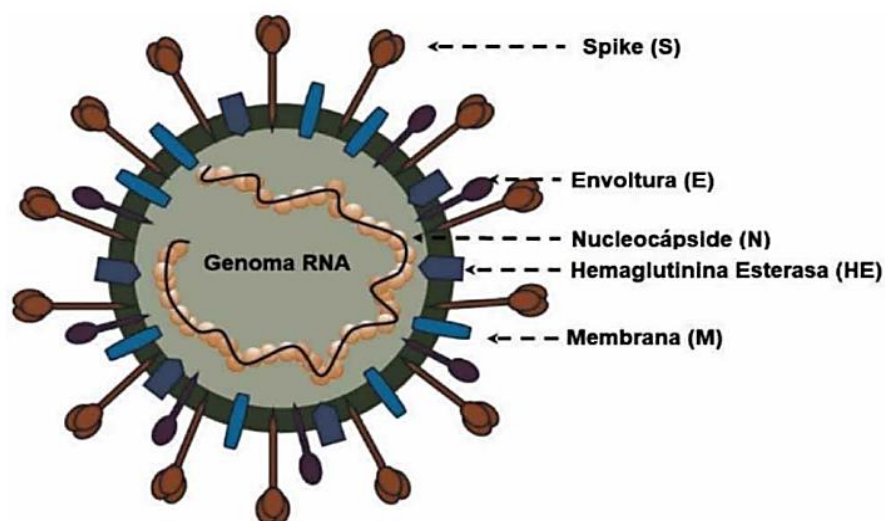


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2. La partícula viral de SARS-CoV-2 presenta un genoma constituido de ARN envuelto por una nucleocápside con su proteína N, que se asocia a la envoltura externa, cuyas proteínas principales son S, M y E y su proteína accesoria HE. (Pastrian, 2020).

1.1.1.4. Mecanismo de Infección

Para que comience la infección, el virus primero ingresa en el huésped gracias a la interacción entre la subunidad S1 de la proteína S y el dominio RBD al receptor hACE2 ubicado en las células del tracto respiratorio, la cavidad oral, células alveolares del pulmón, células epiteliales de la lengua y en otros órganos como corazón, riñón, estómago, entre otros (Walls et al., 2020). Posteriormente, la subunidad S2 hace posible la unión de la membrana viral con la célula hospedera. Esto ocurre debido a que se da la escisión de S2, separando al dominio RBD del receptor hACE2, lo que permite la entrada del virus a la célula por endocitosis (figura 2) (Ou et al., 2020). Una vez en el citoplasma, el ARN viral es liberado y actúa como ARNm, en donde los ORF1a y ORF1b traducen las poliproteínas pp1a y pp1ab, respectivamente, las que luego son procesadas proteolíticamente por la enzima M^{pro} en 16 proteínas no estructurales (NSPs) (Figura 2). Estas proteínas participan en la replicación y transcripción de ARNm subgenómico (sgARN), mediante la formación del complejo replicasa transcriptasa (RTC), el cual se ensambla en vesículas de doble membrana generadas en el retículo endoplasmático y sirve para crear copias de ARN monocatenario. Después, este ARN se asocia a la proteína N formando la nucleocápside, que luego se ensambla con las proteínas de membrana y accesorias en

el aparato de Golgi, para producir nuevos virus, llevando a cabo así la replicación de los mismos (Pastrian, 2020).

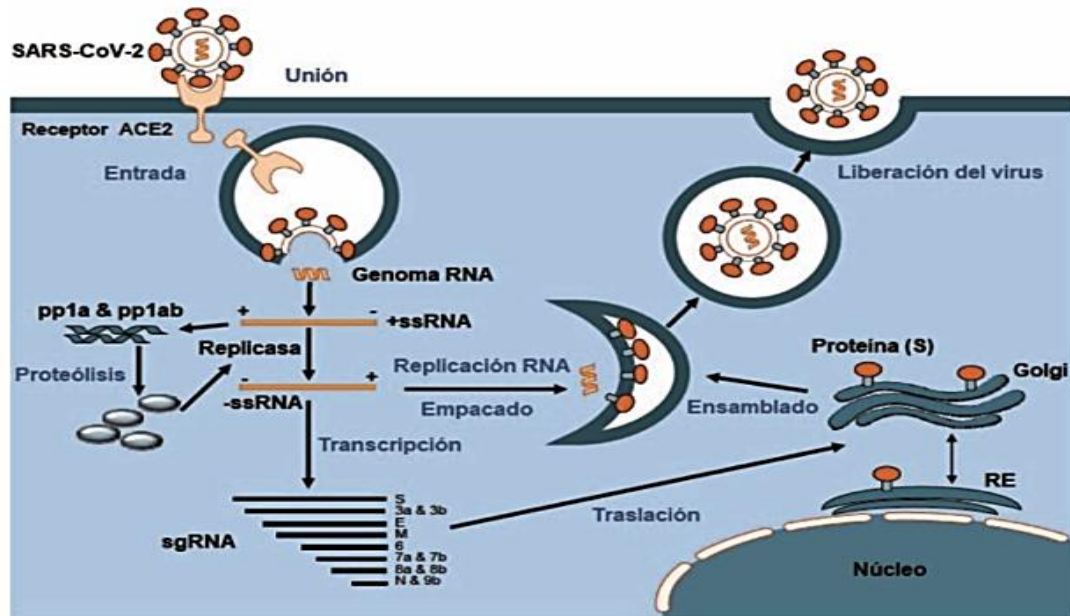


Figura 2. Mecanismo de infección del SARS-CoV-2. La infección empieza por la entrada del virus a la célula mediante la interacción de la proteína S viral con el receptor hACE2, induciendo así el ingreso del virus por endocitosis. Posteriormente, el ARN viral es liberado en la célula huésped y traducido en las poliproteínas pp1a y pp1ab, cuya proteólisis realizada por M^{pro} genera el complejo RTC. Este complejo es encargado de la replicación del sgARN, que a su vez da lugar a la producción de las proteínas N, S, M, E y HE. Todos estos componentes luego se ensamblan en el aparato de Golgi para formar nuevas partículas virales (Pastrian, 2020).

1.1.2. COVID-19

La enfermedad ocasionada por el coronavirus SARS-CoV-2, COVID-19, denominada así por sus siglas en inglés (coronavirus disease), causante de la actual pandemia, es una afección que conduce a una insuficiencia respiratoria, al ser un virus que provoca neumonía, según ensayos realizados y autopsias a personas que padecieron esta enfermedad de rápida propagación (Hung et al., 2020).

La COVID-19 presenta características epidemiológicas especiales, en comparación con el MERS y el SARS, al mostrar una alta transmisión incluso en pacientes que no presentan síntomas, asemejando a una diseminación viral de una influenza, caso contrario a lo que ocurrió con las anteriores enfermedades (Giordano et al., 2020).

1.1.2.1. Síntomas

La enfermedad se caracteriza por producir síntomas similares a un resfriado, como tos seca, fiebre, cansancio, congestión nasal, pérdida del gusto y olfato, dolor de cabeza y garganta, también se pueden presentar otros síntomas que son menos frecuentes, como problemas gastrointestinales, erupciones cutáneas, conjuntivitis y el síndrome inflamatorio multisistémico en infantes.

El 80% de las personas infectadas presentan síntomas leves, por lo que pueden superar el virus sin necesidad de ser hospitalizadas, el 15% desarrollan neumonía grave necesitando que se les suministre oxígeno y el 5% restantes presentan un estado crítico desarrollando insuficiencia respiratoria y multiorgánica requiriendo atención médica urgente con equipos sofisticados (**Shamsi et al., 2020**).

Estos síntomas pueden aparecer entre los 2 a 14 días después de la infección, con dicha aparición la carga viral suele ser un poco más alta en la zona nasal en comparación con la garganta. Según **Madjid et al. (2020)**, esta enfermedad se relaciona con una carga inflamatoria elevada, lo que podría inducir efectos negativos en el sistema cardiovascular, provocando inflamación vascular, miocarditis y arritmias cardíacas, ya que al comparar ciertos estudios, determinaron mediante biomarcadores inflamatorios plasmáticos, que estos se elevaban en pacientes con COVID-19, en comparación con pacientes sanos, lo que significa que estos desarrollan una tormenta de citoquinas tras la infección.

1.1.2.2. Índice de Mortalidad

Inicialmente se sabía que el índice de mortalidad del virus a nivel mundial oscilaba entre los 2.1 y 3.4%, sin embargo, este valor se ha ido modificando a medida que aumentan los contagios en cada país, siendo una cifra diferente para cada nación. Las personas que sufren más afecciones y presentan síntomas graves pertenecen a poblaciones vulnerables, inmunodeprimidas, con problemas cardíacos y pulmonares, diabetes e hipertensión arterial (**Gentile et al., 2020**).

De igual manera, existen reportes que mencionan que, tras la recuperación, pueden quedar secuelas en los pulmones o incluso a nivel cerebral, además de que recientemente han surgido casos de reinfección (**Tillett et al., 2020**). Según un estudio

realizado por **To et al (2020)**, mediante análisis genéticos se determinó que un paciente tras 142 días de su primera infección con SARS-CoV-2, presentó nuevamente síntomas, evidenciándose una carga serológica elevada de proteína C-reactiva e inmunoglobulinas IgG, además los genomas virales de los dos episodios eran diferentes, es decir, se debía a una cepa del virus de distinto linaje, confirmándose una reinfección. Esto sugiere que la inmunidad no dura un tiempo prolongado y que los anticuerpos producidos por el organismo no pueden atacar a todas las cepas de SARS-CoV-2 que se han secuenciado hasta hoy, esto debido a que, en dicho estudio, se reveló que existía una diferencia significativa en los epítomos de las células B y T de los virus analizados en las dos infecciones. Por lo que es de suma importancia la búsqueda de una vacuna que permita crear una inmunidad completa que brinde protección contra todos los agentes infecciosos de la COVID-19.

1.1.2.3. Distribución de la enfermedad

Actualmente, son 225 los países que han reportado casos de esta enfermedad, sumando un total de 25.500.870 personas contagiadas y 850.879 fallecidos a nivel global, siendo los países más afectados: Estados Unidos con 6.045.064 infectados y 183.870 muertos, Brasil con 3.908.272 contagios y 121.381 decesos e India reportando 3.691.166 y 65.288 personas infectadas y fallecidas respectivamente, datos recogidos hasta el 1 de septiembre del 2020 (**Cruz, 2020**).

Según **El Comercio (2020)**, en el Ecuador, este coronavirus ha tenido una alta repercusión, infectando hasta la misma fecha a 114.309 personas, de las cuales 6.571 se ha confirmado que han fallecido por el virus y 3.743 son muertes probables a causa de este, dando un total de 10.314 decesos. Las ciudades con más casos confirmados en el país son: Quito con 21.739 contagiados, seguido de Guayaquil con 12.825, Cuenca con 4.470 y Loja con 3.651.

El SARS-CoV-2 es altamente transmisible, razón por la cual el número de casos confirmados ha ido incrementando exponencialmente. El contagio se da al estar en contacto con una persona infectada a través de las gotículas que se esparcen al toser, estornudar y hablar. Así mismo, estas gotas pueden caer sobre superficies y objetos, que al ser tocados por un individuo, pueden transmitirle el virus, si este se lleva las manos a la nariz, boca, ojos u oídos (**World Health Organization, 2020**).

1.1.2.4. Otras enfermedades causadas por coronavirus

Estos tipos de virus son microorganismos patógenos que se alojan comúnmente en animales vertebrados. Existen algunas especies de coronavirus que atacan a aves y mamíferos, entre ellos, a los humanos, causando enfermedades respiratorias, neurológicas y a nivel hepático, siendo los alfacoronavirus HCoV-229E y HCoV-NL63 y los betacoronavirus HCoV-HKU1 y HCoV-OC43, que, en personas inmunocompetentes, provocan síntomas semejantes a un resfriado común, representando aproximadamente al 30% de infecciones respiratorias que afectan a la población. Por otro lado, se encuentran el MERS-CoV y el SARS-CoV-1 que junto con el SARS-CoV-2 son patógenos con mayor letalidad y más contagiosos (**Shamsi et al., 2020**). Estos tres últimos virus se encuentran muy relacionados entre sí, presentando aproximadamente un 80% de similitud en sus secuencias.

Según **Lárez & Rojas (2020)**, el CoV de la bronquitis infecciosa aviar (IBV), fue uno de los primeros virus aislado en 1930, este patógeno ocasionaba daños renales y a nivel del tracto reproductivo en pollos. Así mismo, se han secuenciado otros gammacoronavirus que afectan a otros animales como los patos, causándoles enteritis transmisible; las ballenas, a las cuales les produce insuficiencia pulmonar y hepática, llegando a ser una enfermedad terminal; y por último los delfines nariz de botella, quienes presentan una infección asintomática ya que no generan síntomas clínicos. En cuanto a los deltacoronavirus, se ha documentado una cepa que infecta a porcinos, especialmente a lechones neonatales, induciéndoles vómitos agudos, deshidratación y mortalidad, se ha confirmado que este CoV también puede transmitirse a aves, sin embargo, no se han reportado casos en humanos de estos virus gamma y delta.

Otros alfacoronavirus que se asocian a animales son el coronavirus entérico felino (FECV), que causa afecciones asintomáticas pero persistentes en felinos salvajes y domésticos, el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), que por el contrario puede llegar a ser letal, lesionando la mayoría de los órganos, los coronavirus caninos que únicamente producen una enteritis leve y el virus de la diarrea epidémica porcina que se relaciona con lechones lactantes. Por otra parte, están los betacoronavirus, como el de la hepatitis de ratón (MHV), que afecta al hígado y llega al cerebro generando encefalitis desmielizante, además se ha documentado que ciertas cepas pueden infectar

a humanos induciéndoles al SARS, mientras que los coronavirus caninos, bovinos y equinos, hasta ahora solo han infectado a animales, ocasionándoles desde infecciones asintomáticas hasta síntomas severos e incluso la letalidad (**Lárez & Rojas, 2020**).

1.1.3. Proteasa Principal M^{pro}

La proteasa principal del SARS-CoV-2, M^{pro}, es encargada de llevar a cabo procesos de replicación y transcripción del virus, escindiendo proteolíticamente los polipéptidos pp1a y pp1ab generados durante la transcripción, para formar un complejo entre la replicasa y la transcriptasa, como se ha mencionado anteriormente. Por lo que se ha identificado a esta enzima como un objetivo al que se puede direccionar un fármaco, ya que su inhibición podría evitar la replicación viral dado que los humanos no contienen una enzima similar que pueda realizar esta función. (**Das et al., 2020**).

Menciona **Joshi et al. (2020)**, que el esqueleto y los sitios activos de la M^{pro}, están altamente conservados en todas las especies de coronavirus, únicamente presentando variaciones en algunos residuos, lo que se puede aprovechar para reutilizar inhibidores creados para otros virus, que se acoplen a la proteína del SARS-CoV-2 y que además funcionen en la mayoría de coronavirus provenientes de animales, que podrían ser un problema de salud a futuro.

1.1.3.1. Estructura y función

Según **Świderek & Moliner (2020)**, esta enzima, también conocida como 3CL^{pro} y que está conformada por 306 residuos de aminoácidos, es una cisteína proteasa que presenta en su sitio activo aminoácidos histidina y cisteína, formando una diada catalítica. El grupo imidazol presente en el residuo His41 es clave en la catálisis enzimática, ya que polariza al grupo tiol de la Cys145 para generar iones CysS⁻ e HisH⁺ nucleofílicos que facilitan la escisión del enlace peptídico del sustrato.

La estructura tridimensional de la enzima ha sido determinada por Das et al (2020), quien indica que la proteasa M^{pro} está conformada por un homodímero, cuyos protómeros se encuentran ortogonalmente alineados. Cada subunidad está formada por tres dominios denominados I, II y III. Los dominios I (residuos 8-101) y II (residuos 102-184) presentan una estructura en forma de láminas β , mientras que el dominio III (residuos 201-306) adopta la forma de hélices α . El dominio III se une al dominio II

por medio de una región bucle formada por los aminoácidos 185-200. Los protómeros se unen por los residuos 1-7 entre los dominios I y II formando un dedo N-terminal, que conforman el sitio activo (Ullrich & Nitsche, 2020).

1.1.3.2. Diseño de inhibidores

Es necesario investigar los diferentes inhibidores que existen actualmente, que permitan inactivar al virus y reducir su propagación, ya que los genomas, o ciertas proteínas involucradas en el proceso infeccioso del virus y en su replicación son semejantes en algunas especies de coronavirus que infectan a animales, con lo que se podría ayudar en la elaboración de una terapia para combatir la actual enfermedad y tener una estructura que podría servir en otros tipos de virus, que con el tiempo y con ayuda de un organismo intermediario puedan infectar a la población.

Tomando en cuenta el rol central que cumplen las proteasas virales en el ciclo de replicación viral, se ha dirigido grandes esfuerzos en el diseño y desarrollo de fármacos que inhiban su actividad. En el contexto del virus SARS-CoV-2, la proteasa M^{pro} es el principal target tras el brote de COVID-19.

Se han analizado varios inhibidores dirigidos a la proteasa M^{pro}, los aminoácidos de los sustratos que se unen a dicha enzima comúnmente son enumerados desde el extremo N al C terminal, con las letras P, es decir, P4-P3-P2-P1 ↓ P1'-P2'-P3', siendo el sitio de escisión aquel representado por la flecha hacia abajo (Dai et al., 2020). Entre los compuestos que presentan inhibición de la M^{pro} se encuentran; antivirales, como ritonavir, penciclovir, lopinavir, azidotimidina, indinavir, tripanavir, squinavir; antifúngicos, entre los que están el fuconazol e itraconazol; la dietilcarbamazina, primaquina, mepacrina y niclosamida que son antinemátodos; antiprotozoarios como la emetina y productos naturales como la curcumina, demetoxicurcumina, hesperidina, mericitrina, ácido ursólico, etc. (Das et al., 2020).

Por otra parte, existen fármacos aprobados por la FDA empleados para otras patologías, que pueden ser reutilizados para tratar la COVID-19, tales como maraviroc (MVC), que inhibe la entrada del VIH, teniendo una buena disponibilidad, además de tener una función protectora en otras enfermedades. Así mismo, otro antiviral es el glecaprevir, inhibidor del virus de la hepatitis C. En un estudio aplicando acoplamiento

molecular (docking), que consiste en utilizar simulación computacional para determinar la unión entre un sustrato y una enzima, se investigó las interacciones que ocurren entre estos compuestos y la proteasa M^{pro}, observando que los aminoácidos que intervienen son: Thr25, Thr26, Leu27, His41, Thr45, Ser46, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Leu167, Pro168 y Gln189 interactuando ampliamente con los dos inhibidores (Shamsi et al., 2020).

De la misma manera se han estudiado otras estructuras, como el Carmofur, que ha sido usado para tratar el cáncer colorrectal, además de mostrar eficiencia en otros tipos de cáncer como el de mama, el gástrico y el de vejiga, demostrando mediante un experimento que puede inhibir a la proteasa M^{pro} in vitro, siendo His41, Met49, Gly143, Ser144, Cys145, His164, Met165, Asp187 los residuos que interactúan con el inhibidor (Jin, Zhao, et al., 2020).

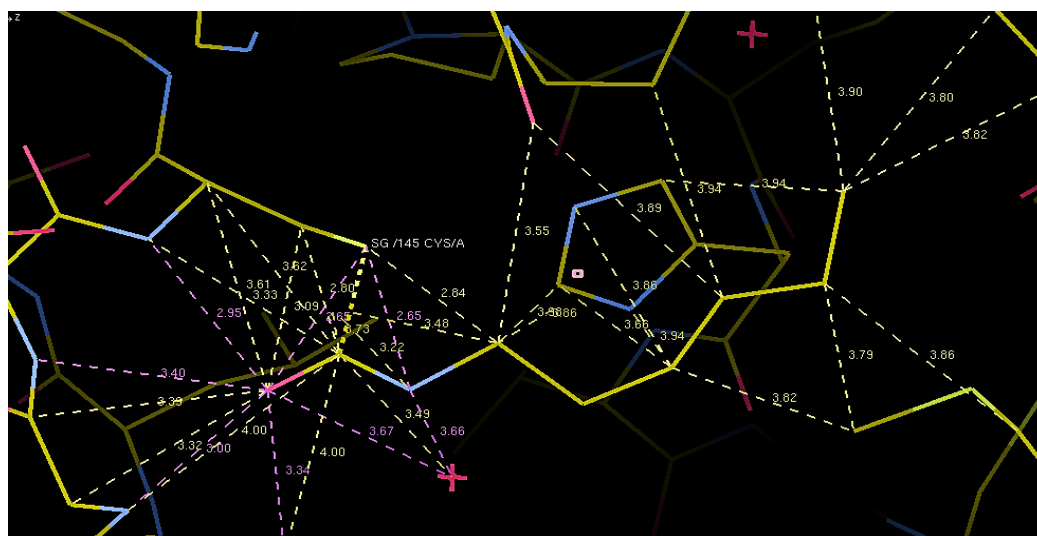


Figura 3. Carmofur unido a M^{pro} de SARS-CoV-2. Inhibidor Carmofur interactuando con los residuos His41, Met49, Gly143, Ser144, Cys145, His164, Met165, Asp187 de la enzima M^{pro}, Las líneas segmentadas finas de color amarillo representan enlaces no polares, las líneas segmentadas finas de color morado son puentes de hidrógeno y con la línea segmentada gruesa amarilla se puede visualizar el enlace covalente que el inhibidor establece con la Cys145.

También existen inhibidores que se pueden diseñar mediante la sustitución de ciertas partes del sustrato que se une directamente al sitio activo de la M^{pro}, imitando así al sustrato natural. Este tipo de moléculas se adhieren primeramente de manera no

covalente a la enzima, para luego darse el ataque nucleofílico de la cisteína, con lo que se forma el enlace covalente (Gentile et al., 2020). Uno de estos compuestos es el N3, que es un potente inhibidor irreversible que se une de manera covalente a la Cys145, e interacciona con la mayoría de los residuos que intervienen en los otros inhibidores mencionados (Jin, Du, et al., 2020).

La estructura y el sitio activo de la mayoría de las proteasas M^{pro} de los coronavirus está altamente conservado y además los sustratos comparten ciertas características, ya que esta enzima generalmente reconoce sustratos cuyos aminoácidos van de P4 hasta P1', mostrando similitud en los sitios de escisión. Mediante estudios de homología se ha determinado que las secuencias de la M^{pro} de BatCoV RaTG13 con la de SARS-CoV-2 son aproximadamente 99% idénticas (figura 4), presentando los mismos aminoácidos en el centro activo (Ullrich & Nitsche, 2020). Esto es relevante puesto que permite desarrollar fármacos con inhibidores que se hayan empleado en brotes virales anteriores. Desde otra perspectiva, se pueden crear compuestos que tengan actividad inhibitoria no solo contra el actual coronavirus sino también contra especies virales homólogas hospedadas en animales y que puedan infectar a la población en un futuro. Por esto el presente estudio pretende identificar todos aquellos inhibidores con potencial de inhibir la proteasa M^{pro}, creando una librería de estos compuestos y realizando análisis de acoplamiento molecular con enzimas M^{pro} de SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2	3264	SGFRKMAFP	SGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLD	DDV	VVYCPRHVICT	SEDMLNPNYEDLLIR	*	*
BatCov	3247	SGFRKMAFP	SGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLD	DDTV	VVYCPRHVICT	SEDMLNPNYEDLLIR		
SARS-CoV-2	3324	KSNHN	FLVQAGNVQLRVIGHSMQNC	ML	LKVD	TANPKTPKYK	FVRIQPGQTF	SVLACYNG
BatCov	3307	KSNHS	FLVQAGNVQLRVIGHSMQNC	LL	LKVD	TSNPKTPKYK	FVRIQPGQTF	SVLACYNG
SARS-CoV-2	3384	SPSGVYQC	AMRPN	TIKGSFL	NGSCG	SVGFNIDYDCV	SFCYMHMELPTGVHAGTDLE	CN
BatCov	3367	SPSGVYQC	AMRPN	TIKGSFL	NGSCG	SVGFNIDYDCV	SFCYMHMELPTGVHAGTDLE	CK
SARS-CoV-2	3444	FYGFVDRQ	TAQAAGTDTTIT	INVLAWLYAAVINGDRWFLNR	FTTTLNDFNLVAMKYN	YE	*	
BatCov	3427	FYGFVDRQ	TAQAAGTDTTIT	INVLAWLYAAVINGDRWFLNR	FTTTLNDFNLVAMKYN	YE		
SARS-CoV-2	3504	PLTQDHVD	ILGPLSAQTGIAVLDMCAS	LKELLQNGMNGRTILGSA	LEDEFTPF	DVVRQC		
BatCov	3487	PLTQDHVD	ILGPLSAQTGIAVLDMCAAL	LKELLQNGMNGRTILGST	LEDEFTPF	DVVRQC		
SARS-CoV-2	3564	SGVTFQ						
BatCov	3547	SGVTFQ						

Figura 4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la enzima M^{pro} procedente de los virus SARS-CoV-2 y BatCoV. Las secuencias de aminoácidos de la enzima M^{pro} de los virus SARS-CoV-2 y BatCoV son 99% idénticas. Aquellos

residuos resaltados con color negro son los que se encuentran altamente conservados en las dos especies, en gris se representan los medianamente conservados y en blanco los no conservados. Los residuos indicados con un asterisco (His41, Met49, Gly143, Ser144, Cys145, His164, Met165, Asp187) intervienen en la unión del inhibidor carmofur con la enzima, que como se puede apreciar, son altamente conservados en ambas enzimas.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Realizar un cribado virtual de inhibidores de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos de animales.

1.2.2. Objetivos específicos

- Analizar la homología estructural entre la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 y proteasas de virus animales.
- Determinar sitios de posible unión de inhibidores a la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2.
- Generar una librería de compuestos para análisis de acoplamiento molecular.
- Determinar los mejores inhibidores de la proteasa M^{pro} mediante el análisis de las propiedades de su unión con la enzima.

1.3.Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

Los análisis de acoplamiento molecular, empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos de animales, no permiten determinar nuevos inhibidores de la enzima M^{pro} de SARS-CoV-2.

1.3.2. Hipótesis alternativa

Los análisis de acoplamiento molecular, empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos de animales, permiten determinar nuevos inhibidores de la enzima M^{pro} de SARS-CoV-2.

1.4. Señalamiento de las variables de la hipótesis

1.4.1. Variables dependientes

- Valor ChemPLP
- Valor S(PLP)

1.4.2. Variables independientes

- Modelos tridimensionales de la enzima M^{pro}
- Librería de ligandos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Páginas web

- Protein Data Bank (PDB)
- PDBeFold
- Universal Protein (UniProt)
- T-Coffee
- Boxshade
- PubChem
- The PRODRG

2.1.2. Softwares Bioinformáticos

- WinCoot
- PyMOL
- GOLD - Protein Ligand Docking Software
- QtMG
- Mercury
- Microsoft Office

2.1.3. Librerías de compuestos

- Ligandos identificados mediante la herramienta PDBeFold y revisión de la literatura.
- Librería COVID Box

2.1.4. Códigos PDB de los compuestos usados

- 6YB7
- 7BUY
- 7BQY
- 6Y2F
- 6LZE
- 6M0K
- 6W63
- 6WNP

- 6WTT
- 2YNB
- 4YOG
- 4YOI
- 4YOJ
- 6JIJ
- 6L70
- 5GWZ
- 1P9U
- 2AMP
- 4F49
- 4ZRO
- 5EU8
- 2Q6F

2.1.5. Equipos

- Computadora Personal
- Computadora por acceso remoto

2.2.Métodos

2.2.1. Secuencia y estructura tridimensional de la proteína M^{pro}

La estructura tridimensional de la enzima M^{pro} de SARS-CoV-2 se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB), la cual contiene estructuras en tercera dimensión de proteínas y ácidos nucleicos, obtenidas por cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (NMR) o microscopía electrónica (Cryo-EM), por profesionales a nivel mundial, y que están disponibles para dominio público.

Para identificar la estructura correspondiente a la enzima M^{pro} de SARS-CoV-2 se realizó primeramente una búsqueda en la base de datos del PDB (<https://www.rcsb.org/>). De los resultados obtenidos se identificó aquellas estructuras de interés para el presente estudio, de las cuales se extrajo información con respecto al organismo del que proviene, sistema de expresión, datos experimentales, autores involucrados, estructura tridimensional (archivo con extensión .pdb) y la secuencia en

formato FASTA. En una búsqueda preliminar se identificó que la estructura con código PDB 6YB7, que corresponde a la estructura de la enzima M^{pro} en ausencia de inhibidor, se podía emplear para el presente estudio (Owen et al., 2020). Para descargar los documentos electrónicos correspondientes a la estructura tridimensional o la secuencia de la enzima se siguió los siguientes pasos: Se dio clic en “Download Files” y se seleccionó en “PDB Format” o en “FASTA Sequence”, respectivamente. Este procedimiento aplicó para todos los procesos que involucraron a la base de datos PDB.

2.2.2. Análisis de homología de M^{pro} de SARS-CoV-2 en PDBeFold

PDBeFold es una herramienta web que permite comparar estructuras 3D de proteínas mediante homología de su estructura secundaria (SSM, por sus siglas en inglés). Del análisis se desprenden una serie de parámetros de puntuación que permiten determinar cuán parecida puede ser una estructura determinada con respecto a una estructura base. La gran ventaja de esta herramienta es que permite realizar la comparación de una estructura objetivo con toda la base de datos del PDB, la cual a la fecha de construcción del presente manuscrito contenía aproximadamente 170000 estructuras depositadas. Así, mediante PDBeFold se pretendió realizar un examen de la estructura de la proteasa M^{pro} de SARS-CoV-2 buscando similitudes con todas las estructuras de la base de datos del PDB. De este análisis se pudo extraer información valiosa con respecto a la estructura de la enzima, y principalmente la estructura química de ligandos como sustratos e inhibidores, los cuales fueron empleados para el presente proyecto.

Para realizar la comparación estructural, primero se ingresó a la página PDBeFold (<http://pdbe.org/fold/>), en donde se encontró información sobre sus funciones. Para iniciar el experimento bioinformático se dio clic en “Launch PDBeFold”. A continuación, se desplegó una solicitud de envío que contenía parámetros que pueden modificarse según los resultados que se necesiten obtener. Para introducir la estructura base para la comparación se escribió el código PDB 6YB7 en la sección de “PDB code” de la herramienta PDBeFold. Así mismo, en el parámetro “lowest acceptable match”, que le permite al programa determinar el límite de coincidencia mínima aceptable para el emparejamiento, se ingresó 70 %. Es decir, la herramienta mostró aquellos resultados de la comparación que mantenían una homología de estructura

secundaria entre 70 y 100%. Se analizaron todos los elementos presentes en la estructura (cadenas de polipéptido A y B), por lo que en la sección “chains” no se realizó ninguna modificación. Por último, se seleccionó “submit your query” para iniciar la comparación. Una vez finalizado el proceso de SSM la herramienta mostró la página de resultados, que se ordenaron según el Q-score, cuyo valor mide la calidad de alineamiento con base a la posición de los carbonos α de cada residuo incluido en la comparación.

Finalmente, se analizaron los valores RMSD (raíz de error cuadrático medio de la superposición de los carbonos α de la proteína), el %SSE (identidad de la estructura secundaria, es decir, indica que fracción de la estructura secundaria de consulta se identificó en la proteína de destino), y el P-Score (calidad del emparejamiento en dependencia del RMSD, la cantidad de aminoácidos alineados, número de brecha y cantidad de elementos que coinciden de estructura secundaria) de aquellos resultados que comprendían estructuras de la proteasa M^{pro} de virus patógenos presentes en animales.

2.2.3. Análisis de homología de M^{pro} de SARS-CoV-2 en UniProt

Por otra parte, ya que la base de datos del PDB es algo limitada y proporciona únicamente información de aquellas macromoléculas de las cuales se ha determinado su estructura tridimensional, se realizó un análisis de homología de la secuencia de aminoácidos de la enzima M^{pro} mediante la base de datos Universal Protein (UniProt). UniProt es una base de datos gratuita que registra una gran cantidad de información sobre proteínas, incluyendo su secuencia de aminoácidos. Esta información proviene de secuenciaciones genómicas publicadas en revistas científicas y depositadas en bases de datos como el GenBank. Para realizar el análisis de identidad de secuencia, UniProt utiliza el algoritmo BLAST, herramienta de búsqueda de alineación local básica, que permite localizar regiones similares entre la secuencia objetivo con todos los archivos depositados en UniProt. De esta forma, tanto el programa como el usuario pueden inferir relaciones evolutivas y funcionales de la proteína en estudio, mediante ciertos parámetros cuantificables.

El análisis BLAST se realizó tomando como referencia la secuencia de aminoácidos de la estructura de la proteína M^{pro} (6YB7) disponible en el PDB. De esta forma, con

un primer análisis se obtuvo la secuencia nativa y código de acceso UniProt de la enzima.

En cuanto al procedimiento, el alineamiento se realizó ingresando a la página UniProt (<https://www.uniprot.org/>), en donde se seleccionó “BLAST”. Con esto se abrió otra pestaña en la cual se visualizó el formulario de la herramienta. En el espacio en blanco del formulario se insertó la secuencia que se deseaba buscar o el código, es decir, la secuencia de aminoácidos en formato FASTA de 6YB7 descargada del PDB. Los parámetros de búsqueda se mantuvieron en los valores preestablecidos por defecto. Por último, se seleccionó el botón “Run BLAST” para iniciar el algoritmo de alineamiento y posteriormente se analizaron los datos desplegados de acuerdo con el Score (puntuación de alineamiento) y el porcentaje de identidad de secuencia.

En los resultados, se tomaron aquellos correspondientes a virus de origen animal y de cada uno se analizó el valor E, que indica la homología entre secuencias, cuyo valor menor o igual a 0.02 indica que las secuencias son probablemente homólogas, mientras que, si este se encuentra entre 0.2 y 1 significa homología no descartable. Si el valor de E sobrepasa a 1 quiere decir que la homología de las secuencias no es significativa. Así mismo se analizó el porcentaje de identidad de secuencia con valores superiores al 45%, valores que sugieren que la secuencia, la estructura y la función de las secuencias analizadas son similares a la de la secuencia objetivo.

2.2.4. Alineamiento múltiple de secuencias

Se realizó un alineamiento entre todas las secuencias de las estructuras seleccionadas a partir del BLAST de UniProt y las secuencias de estructuras determinadas mediante el PDBeFold, para lo cual se descargaron las secuencias en su formato FASTA. En un editor de texto como Word, se colocaron todas las secuencias junto a la de la proteína M^{Pro} de SARS-CoV-2 en el orden que se deseaba que se realice el alineamiento. Luego, se realizó el alineamiento múltiple mediante la herramienta T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>), donde se colocaron las secuencias FASTA en el espacio disponible. Finalmente se seleccionó “Submit”, y una vez terminado el alineamiento se descargaron los resultados en formato “fasta_aln”.

Para la generación de ilustraciones coloreadas que faciliten el análisis del alineamiento múltiple se empleó la herramienta Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Aquí se ingresaron los datos descargados de T-Coffee en la ventana en blanco, y se descargaron los resultados en formato “RTF_new”. El alineamiento se visualizó y analizó en Word. Con este procedimiento se pudo identificar que aminoácidos de las proteínas alineadas de los diferentes organismos, se encontraban conservados, especialmente aquellos relacionados con el sitio de unión a inhibidores.

2.2.5. Determinación de posibles inhibidores de la enzima M^{pro} y construcción de librerías de compuestos

Del análisis desprendido de la herramienta PDBeFold se identificó aquellas estructuras de proteínas homólogas a M^{pro} en complejo con sustratos o inhibidores. Para ello, se ingresó el código de dicha secuencia en el buscador de PDB, con lo que se mostró la página de la enzima y se pudo ver la información de la proteína, así como de la presencia de ligandos de interés. Se recopiló el nombre químico, estructura química, nomenclatura SMILES y código en PDB de los ligandos seleccionados para el presente estudio. Por otra parte, se analizaron artículos científicos en los cuales se han estudiado inhibidores que interactúan con la proteasa M^{pro} y enzimas homólogas.

Las librerías de compuestos estuvieron conformadas, pero no limitadas, por:

- Ligandos identificados mediante la herramienta PDBeFold y revisión de la literatura.
- Librería COVID Box

Después de determinar todos los inhibidores que formarían parte de la librería de compuestos del presente estudio, se procedió a preparar dichos ligandos, previo a los experimentos de acoplamiento molecular (docking), de acuerdo con los requerimientos del programa de docking GOLD - Protein Ligand Docking Software. Para esto se requerían los códigos SMILES de todas las estructuras, extrayendo estos de la página PDB o de PubChem, en la cual se pueden dibujar los compuestos de interés, desplegándose con ello toda la información procedente de dicho elemento buscado. Luego se ingresó a la página The PRODRG, en donde se insertó la

nomenclatura SMILES obtenida, con lo que se pudo descargar el archivo de cada molécula en formato MOL2. Estos archivos posteriormente pasaron a Mercury, programa gratuito para visualización de estructuras cristalinas, creado por Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, en donde se optimizaron los ligandos, siendo estos los que finalmente se emplearon para el acoplamiento molecular.

2.2.6. Determinación de sitios drogables en la enzima M^{pro}

Para la determinación de sitios drogables en la enzima M^{pro} se utilizó los programas WinCoot y PyMOL, que permiten la construcción, validación y visualización de modelos tridimensionales de macromoléculas. Ambas herramientas permiten además emplear bibliotecas como Python para realizar análisis más completos y complejos de estructuras moleculares.

En estas aplicaciones se analizaron los resultados desprendidos de la herramienta PDBeFold para determinar los residuos que se unen a inhibidores, ajustando la distancia de estos enlaces, a un rango entre 1.8 y 4 Å. Se identificaron así interacciones no polares, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que se forman entre ligandos y residuos de aminoácidos y, por consiguiente, se determinó los sitios drogables en las enzimas analizadas. Posterior a ello, se buscaron dichos residuos en el alineamiento múltiple de secuencias con lo que se establecieron relaciones de homología.

Además, mediante una superposición de todas las estructuras de M^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con inhibidores, en PyMOL, se identificaron cuales aminoácidos se deforman o cambian de posición en presencia de los ligandos, para así poder flexibilizarlos en los experimentos de acoplamiento molecular.

2.2.7. Acoplamiento molecular

Los ensayos de acoplamiento molecular se realizaron empleando el programa de docking GOLD - Protein Ligand Docking Software, que se basa en algoritmo genético para caracterizar y puntuar las posibles poses que puede adoptar una molécula (ligando) en un sitio determinado de una proteína y las potenciales interacciones no covalentes que podrían formar. Para ello se empleó la estructura de la proteasa M^{pro} en

ausencia de ligandos (código PDB: 6YB7) y las librerías de compuestos construidas en el presente proyecto.

Para ejecutar el programa primeramente se cargó las coordenadas tridimensionales de 6YB7 en formato .pdb. Posterior a eso, se preparó a la proteína, para lo cual se le añadió hidrógenos, se eliminó las moléculas de agua de la estructura y se extrajo los ligandos o cofactores presentes, dejándola lista para el acoplamiento. Después, se definió el sitio drogable de la enzima, ya sea seleccionando un átomo, un ligando de referencia o una lista de residuos, con esto se identificó el área en la que se realizaría el docking, determinándose un radio entre 6 y 10 Å. Luego, se añadió la librería de compuestos a emplear y se determinó la función de evaluación de los acoplamientos, eligiendo la opción CHEMPLP, ya que es la herramienta comparativa que ofrece mejor rendimiento en cuanto a predicción de pose y detección visual. Antes de correr el programa se seleccionó el algoritmo genético lento, que es el más preciso y se eligió la carpeta en donde se guardarán los resultados, también se flexibilizaron los aminoácidos encontrados en el punto anterior. Finalmente, se inició el algoritmo de acoplamiento molecular y al terminar se analizaron los datos tomando en cuenta los valores de energía libre calculados de la unión del ligando con la proteína.

Las posiciones adoptadas por los ligandos en la proteína M^{PRO} se analizaron mediante los programas WinCoot y PyMOL. Ilustraciones de los mejores resultados se construyeron en QtMG y PyMOL.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Análisis de homología estructural entre la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 y proteasas de virus animales.

La proteasa principal M^{pro} juega un papel fundamental en los coronavirus ya que es la encargada de escindir proteolíticamente los polipéptidos formados a partir del ARNm, generando proteínas no estructurales, que son indispensables para que los virus se repliquen (Bzówka et al., 2020). Debido a esto, esta enzima es clave en la supervivencia de los coronavirus, siendo uno de los principales objetivos en la búsqueda de inhibidores contra el SARS-CoV-2 para frenar así el número de contagios y muertes a causa de la enfermedad que este provoca.

Según Tahir et al. (2020), M^{pro} de SARS-CoV-2, tiene un peso molecular de 33.797 kDa. aproximadamente, presentando 306 aminoácidos en su estructura, además menciona que estos residuos se encuentran altamente conservados en la mayoría de betacoronavirus, como los que infectan a bovinos y murciélagos.

Con estos antecedentes, en el presente estudio se realizó un análisis de homología entre la proteasa de SARS-CoV-2 y otras proteasas de virus que infectan a animales, tomando aquellos resultados en los que hubo un mayor porcentaje de identidad, datos que se pueden visualizar en el Anexo A. Para esto se empleó la estructura cristalográfica obtenida de la base de datos de PDB con código 6YB7, que corresponde a la proteasa principal de SARS-CoV-2 con sitio activo sin ligando, depositada en la base de datos el 16 de marzo del presente año, clasificada como una proteína viral, cuyo sistema de expresión fue *Escherichia coli*.

Este homodímero está compuesto por tres dominios, los dominios I y II presentan formas de láminas beta, conformados por 93 y 82 residuos cada uno, estos se unen al dominio III, con forma de hélice alfa, que contiene 105 aminoácidos, por medio de una región bucle, como se muestra en la figura 5. Además, la estructura contiene un dedo N-terminal que posee 7 residuos, al comienzo de la secuencia.

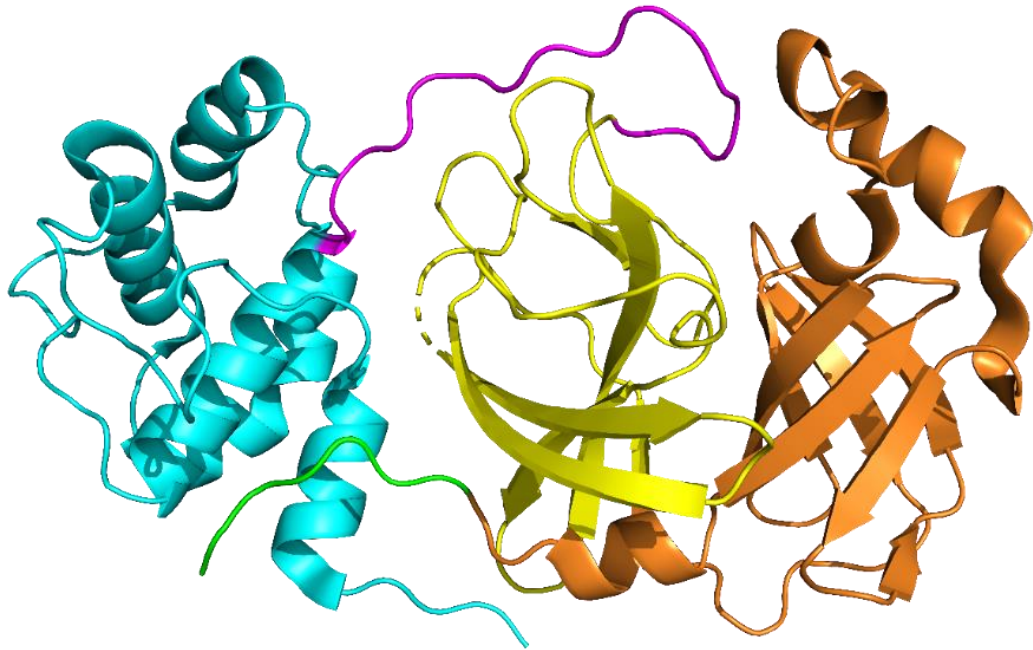


Figura 5. Estructura de la proteasa M^{pro} de SARS-CoV-2. La enzima se encuentra representada como cartoon. El dominio I, que comprende los residuos desde el 8 al 101, presenta un color naranja, el dominio II, conformado por los aminoácidos 102 al 184, se muestra de color amarillo y el dominio III, desde el residuo 201 al 306, presenta un tono celeste. En coloración magenta se señalan los aminoácidos (185 al 200) en forma de bucle que unen al dominio II y al III, finalmente en tono verde se indica el dedo N-terminal con los primeros residuos de la cadena.

Con las herramientas PDBeFold y BLAST de UniProt, se determinaron valores de homología entre M^{pro} de SARS-CoV-2 y ciertos betacoronavirus como: los coronavirus de murciélago, siendo uno de estos cuyo hospedero es el murciélago de herradura de orejas grandes, que corresponde a la especie *Rhinolophus macrotis*, o la cepa de virus HKU4 que ataca a *Tylonycteris pachypus*, murciélago de bambú menor. Otro ejemplo, es aquel que infecta a erizos de orejas cortas, denominado betacoronavirus erinaceus. La cepa A59 de coronavirus murino, que ocasiona hepatitis a los ratones de la especie *Mus musculus*, también llamados ratones comunes o domésticos. El virus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina. La cepa Quebec del coronavirus bovino que se hospeda en *Bos taurus*. La cepa HKU14 que infecta a conejos y el coronavirus que se aloja en antílopes acuáticos. Lo que corrobora los hallazgos encontrados por **Tahir et al. (2020)**.

No obstante, se lograron identificar otros tipos de géneros, como los alfacoronavirus, siendo un ejemplo, la cepa WD1133 que infecta a visones. O el virus de la diarrea epidémica porcina, cepa CV777, cuyo huésped es *Sus scrofa domestica*, cerdo usado para alimentación humana, a quien también ataca la cepa Purdue, que causa la gastroenteritis transmisible porcina. Así mismo, se puede nombrar al coronavirus canino, al virus que causa la peritonitis infecciosa felina atacando a toda la familia de félidos y al coronavirus de musaraña Wencheng Sm.

De la misma manera, se analizaron otras cepas como el coronavirus de delfín nariz de botella, HKU22, que es un gammacoronavirus, al igual que el que infecta a las ballenas beluga. La cepa Beaudette CK, del virus de la bronquitis infecciosa aviar, que se hospeda en pollos, gallos y gallinas, el coronavirus de pavo europeo y aquel que ataca a los patos.

Por último, también se encontraron casos de deltacoronavirus, siendo estos, la cepa HKU12, que se aloja en tordos de las especies *Turdus hortulorum* y *Turdus merula*. La cepa HKU20 del coronavirus de wigeon, HKU17 que ataca a gorriones, el coronavirus de la gallineta común, HKU21 y la cepa HKU19 del coronavirus de la garza nocturna. Datos que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación estructural entre la proteína M^{pro} del virus SARS-CoV-2 y proteasas virales de animales.

Organismo	Abreviatura	Uniprot			PDBe fold			
		Valor E	Identidad (%)	Identificador	P-score	rms d	%s se	Código PDB
Coronavirus de murciélago 279/2005 (BtCoV)	BtCoV	0.0	96.1%	P0C6V9	ND	ND	ND	ND
Betacoronavirus Erinaceus (erizos de orejas cortas) /VMC/DEU/2012	EriCoV	2.1e-94	51.1%	U5KNA9	ND	ND	ND	ND
Coronavirus Murino-virus de la hepatitis	MHV	2.3e-90	50.7%	P0C6X9	29.8	1.35	86	6JIJ

de ratón, cepa A59 (MHV)								
Coronavirus de murciélago HKU4	HKU4CoV	1.2e-90	49,7%	P0C6W3	36.8	1.23	91	2YNB
Virus de encefalomielitis hemaglutinante porcina	PHEV	4.1e-90	48.7%	Q2QKN6	ND	ND	ND	ND
Coronavirus bovino (cepa Quebec) (BCoV)	BCoV	1.4e-89	48.4%	P0C6X0	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de conejo HKU14	RbCoV	4.8e-91	48.0%	H9AA60	ND	ND	ND	ND
Coronavirus Waterbuck US / OH-WD358-GnC / 1994 (antílope acuático)	WbCoV	2.6e-89	48.0%	B7U2L8	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de visón WD1133	MCoV	2.6e-78	47.7%	D9J202	ND	ND	ND	ND
Virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV)	PEDV	2e-76	45.1%	P0C6Y4	37.41	1.14 9	91	4ZUH
Coronavirus canino	CCoV	5.9e-73	44.8%	H9TEX0	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de gastroenteritis transmisible porcina (cepa Purdue) (TGEV)	TGEV	2.8e-72	44.4%	P0C6Y5	26.3	1.70	86	2AMP
Coronavirus de la peritonitis infecciosa felina	FIPV	3.2e-73	44.1%	Q98VG9	26.6	1.57	82	4ZRO
Coronavirus de delfín nariz de botella HKU22	BDCoV	9.6e-70	42.1%	V5TFR4	ND	ND	ND	ND

Coronavirus de ballena beluga SW1	BWCoV	3.3e-69	41.4%	B2BW31	ND	ND	ND	ND
Virus de la bronquitis infecciosa aviar (cepa Beaudette CK) (IBV)	IBV	1e-63	40.5%	P0C6Y2	27.4	1.51	86	2Q6D
Coronavirus de pavo europeo 080385d	ETCoV	7.4e-64	40.2%	A0A0S2ZX33	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de la musaraña Wencheng Sm	WCoV	5.6e-62	40.1%	A0A240FW17	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de pato	DCoV	1.7e-60	39.6%	A0A0F6WGL5	ND	ND	ND	ND
Coronavirus del tordo HKU12-600	ThCoV	2.4e-44	35.9%	B6VDX7	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de Wigeon HKU20	WCoV	7e-45	35.6%	H9BR24	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de gorrión HKU17	SCoV	2.4e-44	35.6%	H9BQZ9	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de la gallineta común HKU21	CMCoV	3.2e-42	33.7%	H9BR34	ND	ND	ND	ND
Coronavirus de garza nocturna HKU19	NHCoV	8.1e-48	33.2%	H9BR16	ND	ND	ND	ND

En los resultados obtenidos en la tabla 1 se pueden observar los nombres de los organismos que formaron parte del alineamiento en las plataformas usadas y su abreviatura, además, se muestran datos recopilados de UniProt como el Valor E, que determina la homología en la secuencia de aminoácidos de las moléculas. El porcentaje de identidad, que permite identificar si existe homología en las estructuras tridimensionales y la función de las proteínas y el código que permite identificar estas proteínas en la página.

Tabla 2. Valores de puntuación de homología de UniProt

Valor E	
≤ 0.02	Secuencias probablemente homólogas
0.02 - 1.0	Homología no descartable
>1	Homología no significativa
Porcentaje de Identidad	
$\geq 45\%$	Estructura similar y posible función similar
$\geq 25\%$	Similitud en el plegamiento 3D general
$< 20\%$:	No existe similitud

Mientras que, al comparar estos resultados con los obtenidos en PDBeFold, se analizaron valores como rmsd (raíz del error cuadrático medio de la superposición de los $C\alpha$ del polipéptido), P-score (logaritmo negativo del valor P y representa la probabilidad de encontrar un emparejamiento de calidad al elegir las estructuras de una base de datos al azar, es decir, es una medida de la calidad del emparejamiento que toma en cuenta el RMSD, el número de aminoácidos alineados, el número de brechas, la cantidad de elementos de estructura secundaria coincidentes y la puntuación de coincidencia de elementos de estructura secundaria), el porcentaje de la estructura secundaria SSE (indica que fracción de la estructura secundaria de consulta se identificó en la proteína objetivo) y el código con el que se puede buscar información de la proteína en PDB.

Los datos se presentaron en orden descendente en función del porcentaje de identidad, con lo que se sabe que la proteasa principal M^{PRO} del coronavirus de murciélago 279 de *Rhinolophus macrotis*, secuenciado en el 2005, muestra una estructura similar a la proteasa del SARS-CoV-2 al tener 96.1% de identidad, además de ser secuencias completamente homólogas, gracias a su valor E de 0.0, esto sucede debido a que dichas secuencias presentan conservados la mayoría de los aminoácidos de su estructura. A este organismo le sigue el betacoronavirus erinaceus, cuyo valor de identidad se reduce significativamente, sin embargo, este no se encuentra por debajo de 45% presentando aún una estructura similar. Las demás estructuras se encuentran en un rango entre 30 y 50% indicando una similitud en la estructura o en el plegamiento 3D.

Con esto se puede verificar los datos bibliográficos en los cuales se menciona que SARS-CoV-2 tiene un origen zoonótico siendo el murciélago su principal hospedero. Según **Zhou et al. (2020)**, el genoma completo de SARS-CoV-2 tiene 96.1% de identidad con RaTG13, aislado de *Rhinolophus affinis*, además, al analizar muestras de otras especies de murciélagos como *Rhinolophus malayanus* y *Rhinolophus stheno*, obtuvieron valores similares, especialmente con el primero, con un porcentaje de 93.3%, en todo el genoma y 97.2% en la poliproteína 1ab, con lo que se puede deducir, que M^{pro} de SARS-CoV-2 es altamente similar con estas especies de coronavirus que infectan a los murciélagos *Rhinolophus*.

Por otro lado, se encuentra el coronavirus HKU4 de *Tylonycteris pachypus*, quien ocupa el cuarto lugar en el análisis de homología con 49.7% de identidad, siendo un valor mucho más bajo al obtenido con las otras especies de murciélagos, esto debido a que, se sabe que los betacoronavirus están divididos en tres linajes, estos son: A, B y C. SARS-CoV-2 junto a SARS-CoV-1 pertenecen al linaje B, mientras que HKU4 se encuentra ubicado en el linaje C, en este último también se posiciona al MERS (**John et al., 2015**). Por esta razón, **Anson et al. (2020)**, menciona que es probable que el MERS se haya originado de estas especies de coronavirus ya que comparten 75% de identidad a nivel general y 100% en cuanto a la proteasa principal.

Los valores de identidad son similares en los betacoronavirus analizados, sin embargo, estos empiezan a variar cuando las especies corresponden a alfa, gamma y deltacoronavirus, con los cuales solo comparten similitud en plegamiento 3D general y en ciertos aminoácidos de la cadena, debido al cambio de género.

Solo se ingresaron datos de PDB de ciertos organismos, puesto que no todos presentan estructura tridimensional obtenida mediante cristalografía de rayos X, en su lugar solo han sido secuenciados, por lo que únicamente existen datos de UniProt.

3.1.2. Determinación de sitios de posible unión de inhibidores a la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2.

Los virus son los microorganismos que existen en mayor cantidad en el mundo, considerados como infecciosos ya que no pueden reproducirse, ni generar energía si no están dentro de un huésped. Sin embargo, son denominados seres vivos, al contener

material genético, responder a estímulos ambientales, causando enfermedades en su organismo hospedero, que pueden ser células animales o vegetales, bacterias, hongos e incluso otros virus, convirtiéndose en parásitos extracelulares estrictos (**Piña et al., 2020**). Debido a su alta tasa de replicación y a la gran cantidad de población de virus existentes, estos son indispensables en los procesos de evolución de vida en el planeta, lo que significa que presentan un elevado índice de mutación, sobre todo aquellos, cuyo genoma está compuesto por ARN. Esto ocasiona que surjan nuevas especies constantemente, por lo que es importante buscar vacunas y fármacos que eviten que estos afecten a los seres vivos (**Córdoba & Montaña, 2020**).

Los animales son portadores de una amplia variedad de virus, siendo los responsables de que estos sean transmitidos a humanos, mediante procesos zoonóticos. Esto lo hacen, debido a la cercanía que presentan con sus hospederos, lo que quiere decir, que solo pueden infectar a ciertos organismos, mediante un reconocimiento específico entre las proteínas receptoras de la membrana celular y las proteínas de la cápside viral, para luego dirigirse a órganos y tejidos en particular, lo que recibe el nombre de tropismo. Es así, como los CoV, afectan comúnmente al sistema respiratorio del organismo huésped (**Piña et al., 2020**).

Los coronavirus, contienen genomas similares, con una cadena de ARN positivo, cuyo primer ORF, codifica para proteínas no estructurales, nsp, que presentan cierto nivel de conservación en su secuencia. Lo que hace posible, que el sitio activo de estas enzimas sea el mismo y solo difiera en ciertos aminoácidos, permitiendo el empleo de compuestos que puedan inhibir su actividad, funcionando en la mayoría de las especies de CoVs (**Abarca et al., 2020**).

En este contexto, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias empleando a la proteasa principal M^{pro}, también llamada nsp5, de SARS-CoV-2 y de coronavirus que infectan animales, lo que permitió determinar que gran parte de su secuencia se encuentra altamente conservada, en especial aquellos restos de aminoácidos que forman parte del sitio activo (Figura 6).

El sitio activo de la enzima M^{pro} de SARS-CoV-2, está conformado por la Cys145 que interactúa con la His41, formando una diada catalítica (**Ullrich & Nitsche, 2020**). Como se puede observar en la figura 6, tanto los residuos catalíticos Cys145 y His41,

como otros 13 aminoácidos que conforman el sitio activo de M^{pro}, tienen algún grado de conservación en todas las proteasas de las especies analizadas, lo que sugiere que la arquitectura del sitio activo es el mismo en todas estas enzimas. Esto correlaciona con los resultados obtenidos por **Tahir et al. (2020)** que muestran que las enzimas M^{pro} de SARS-CoV-2, Bovine-CoV y de Bat-CoV son similares.

Para conocer los sitios drogables de la proteína a los cuales se puedan unir los inhibidores, se analizaron los compuestos encontrados mediante homología en PDBeFold, los cuales estaban formando un complejo con proteasas de los virus de animales presentados en la tabla 1, así mismo, se buscó en la literatura compuestos que ya hayan sido estudiados en M^{pro} de SARS-CoV-2, experimentalmente o mediante aplicaciones bioinformáticas.

Posteriormente, se identificaron las interacciones que estos compuestos forman con los residuos del sitio activo de M^{pro} mediante un análisis estructural desarrollado con la ayuda del software Wincoot, y estos resultados se pueden observar en el Anexo B. Este análisis permitió establecer que los residuos que participan en la mayoría de las interacciones son: His41, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Asp187, Arg188 y Gln189, tomando como referencia la numeración de la secuencia de M^{pro} del SARS-CoV-2. Al comparar estos análisis con el alineamiento múltiple de secuencias se pudo establecer que estos aminoácidos participan en la mayoría de las interacciones que se producen con diferentes ligandos presentes en las enzimas identificadas mediante homología estructural. Estos resultados sugieren que los inhibidores de M^{pro} de coronavirus que infectan animales virtualmente podrían inhibir M^{pro} del SARS-CoV-2 por la elevada similitud que existe entre sus sitios activos.

```

SARS-CoV-2 1 -SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTTLNLGLWLDVVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLI
BtCoV 1 -SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTTLNLGLWLDVVYCPRHVICTAEDMLNPNYEDLLI
EriCoV 1 -SGLVKMAHPSGAVEQCIVQVTCGSMTLNLGLWLDNIYCPRHVPCPDQLVDENYDALLN
MHV 1 -SGLVKMNSPTSKVEPCIVSVIYGNMTLNLGLWLDKVCYCPRHVICS--DMTDPDYTNLLC
HKU4CoV 1 -SGLVKMSAPSGAVENCIVQVTCGSMTLNLGLWLDNTVYCPRHVPCPADQLTDPNYDALLI
PHEV 1 -SGLVKMNSPTSKVEPCIVSVIYGTMTLNLGLWLDKVCYCPRHVICSASDMTNPDYTNLLC
BCoV 1 -SGLVKMNSPTSKVEPCIVSVIYGNMTLNLGLWLDKVCYCPRHVICSASDMTNPDYTNLLC
RbCoV 1 -SGLVKMNSPTSKVEPCIVSVIYGNMTLNLGLWLDKVCYCPRHVICSASDMTNPDYTNLLC
WbCoV 1 -SGLVKMNSPTSKVEPCIVSVIYGNMTLNLGLWLDKVCYCPRHVICSASDMTNPDYTNLLC
MCoV 1 -SGLRKLTAQPSGVVEPCIVRVAYGNTVNLGLWLGDEVICPRHVIASDIT-KTINYESDILL
PEDV 1 -AGLRKMAQPSGVVEPCIVRVAYGNTVNLGLWLGDEVICPRHVIASDIT-STIDYDYALS
CCoV 1 -SGLRKMAQPSGLVEPCIVRVSYGNVNLGLWLGDEVICPRHVIASDIT-RVINYENEMS
TGEV 1 -SGLRKMAQPSGLVEPCIVRVSYGNVNLGLWLGDEVICPRHVIASDIT-RVINYENEMS
FIPV 1 -SGLRKMAQPSGVVEPCIVRVAYGNNVNLGLWLGDEVICPRHVIASDTS-RVINYENELS
BDCoV 1 -AGIKKMAFSSSAVEQCIVSVVHGNTQLNLGLWLDYVLCPRHILCKYTF---GEQWRDALI
BWCoV 1 -AGIKKMAFSSSAVEQCIVSVVHGNTQLNLGLWLDYVLCPRHILCKYTF---GEQWRDALI
IBV 1 -SGFKKLVSPSSAVEKCIIVSVSYRGNLNLGLWLDYVLCPRHVLCKFT---GDQWSDVNL
ETCoV 1 -AGFKKLVSPSSAVEKCIIVSVSYRGNLNLGLWLDYVLCPRHVLCKFT---GEQWSDVNL
WSCoV 1 -AGLRKIIQPTIGVVEPCIVSVVYGLSLTLNLGLWLGNNVYCPRHVIAEDVT-KEIDYETCFM
DCoV 1 -AGFKKLVSPSSAVEKCIIVSVSYRGNLNLGLWLDYVLCPRHVLCKFT---GDQWSDVNL
ThCoV 1 -AGIKILLHPSGVVEPCIVSVVYNGSALNGLWLNNVYCPRHVILCKFK---GEQWQHILAS
SCoV 1 -SGFKKLLSPSGQVEQCIVSVVYRGSNGLWLDYVLCPRHILCKYTF---ASQWQDVVN
WCoV 1 -AGIKILLHPSGVVEPCIVSVVYNGSALNGLWLNNVYCPRHVILCKFR---GDQWTHMVS
CMCoV 1 -AGIKILLHPSGMVERCMTSVIYNGSTLNGWLNHNVYCPRHVILCKYTF---GDQWQLMVS
NHCov 1 AAGIKRLLSPSGSVEKCMVSVVHMRGLTLNGLWLNNVYCPRHILCKYQ---ASFWQDAWK

```

```

SARS-CoV-2 60 RKSNNHFLVQA--G---NVQLRVVIGHSMQNCVLL--RLKVDTSNPKTPKYKVFRIQPGQTF
BtCoV 60 RKSNNHFLVQA--G---NVQLRVVIGHSMQNCVLL--RLKVDTSNPKTPKYKVFRIQPGQTF
EriCoV 60 SVTNHSFTLQR--HGRSTANLCTGHAMHGTLL--RLTVDSANPETPAFTFTTRQCSSF
MHV 58 RVTSSDFCVMS--G---RMSLTVMSYQMQCCQL--VLTVTLQNPNTPKYSFGVVKPGETF
HKU4CoV 60 SKTNHSFTVQK--HIGAQANLRVVAHSMVGVLL--RLTVDVANPSTPAFTFTSTVVKPASF
PHEV 60 RVTSSDFTVLF--D---RLSLTVMSYQMQCCML--VLTVTLQNSRTPKYTFGVVKPGETF
BCoV 60 RVTSSDFTVLF--D---RLSLTVMSYQMQCCML--VLTVTLQNSRTPKYTFGVVKPGETF
RbCoV 60 RVTSSDFTVLF--D---RLSLTVMSYQMQCCML--VLTVTLQNSRTPKYTFGVVKPGETF
WbCoV 60 RVTSSDFTVLF--D---RLSLTVMSYQMQCCML--VLTVTLQNSRTPKYTFGVVKPGETF
MCoV 59 GVRLEHNSVSK--G---NDFLGVVGCYRCVNL--VTKVSVNTQTPKHKERTVKAQGSF
PEDV 59 VRLHNSVSS--G---NVFLGVVSATMRGALL--QIKVNQNVHPTPKYTFRTVVRPGEHF
CCoV 59 SVRLHNSVSK--N---NVFLGVVSAKYKCVNL--VTKVNQVNPNTPEHKFKSIRKAGHSF
TGEV 59 SVRLHNSVSK--N---NVFLGVVSARYKCVNL--VTKVNQVNPNTPEHKFKSIRKAGHSF
FIPV 59 SVRLHNSVAK--N---NAFLGVVSAKYKCVNL--VTKVNQVNPNTPEHKFKSIRKAGHSF
BDCoV 57 NANNFDHILY--K---GMELQVVGRELVGALL--RLKVMNVNANTPKYKFAKARIGENF
BWCoV 57 NANNFDHILY--K---GMELQVVGRELVGALL--RLKVMNVNANTPKYKFAKARIGENF
IBV 57 LANNHEFEVTT-QH---GVTLNVSRRKCAVL--ILQTAVANAEPTKYKFIKANGGHSF
ETCoV 57 LANNHEFEVVT-QN---GITLNVVSRRKCAVL--ILQTAVANADTPKYKFKANGGHSF
WSCoV 59 MVRKNMLESY--K---NSLLKVNQVNMKGSLL--VIEVDINNVLTPDYEFVKFKSGVFSF
DCoV 57 LANNHEFEVVT-GN---GVTLSVVSRRKCAVL--ILQTAIVNADTPKYKELKANGGHSF
ThCoV 57 IADCRDFCVVCPQTQ---GIQLTVQSVKMYGALL--QLTVHTNNTATPDYEFVRLTPGSSM
WCoV 57 LAECRDFVIFSPLO---GVNLTVTSVRMQGAVL--QLKVHAKNLKTPAYKFERARPGFPM
SCoV 57 IADCRDFIVKCPQTQ---GVQLNVQSVKMYGALL--QLTVHTNNTATPDYKFERLAPGSSM
CMCoV 57 IADCRDFIVKCPQTQ---GIQLTVQSVKMYGAVL--QLTVHSSNAHTPKYKFTRIKTPGASM
NHCov 58 VADTRDFVINSQHS---KIQFREVGLRNNAILQIVLPTEQNNPHTPDYEFVVTAKPGSSM

```


SARS-CoV-2	223	---FTTITLNDFNLVAMKYNVEPLTQDH--VDILGPIISAQTGLAVLDMCAAIKELLQNGMN
BtCoV	223	---FTTITLNDFNLVAMKYNVEPLTQDH--VDILGPIISAQTGLAVLDMCAAIKELLQNGMN
EriCoV	226	---NKTGVAAFNWALSNGFSTFTEVST----QALELAVKVTGVQTEQLLYSTIQQI--NNGFQ
MHV	221	---DSCSLEEFNVWAMTNGFSSIKAD----LVLDALASMTGVIVEQVLAATKRL--HSGFQ
HKU4CoV	226	---TRVGVVTYNEWALSNGFSTFTEVGT----QSIDMLAHRRTGVSVEQMLAATQSL--HAGFQ
PHEV	223	---DKCSVEDFNWALSNGFSTFTEVST----LVLDALASMTGVSETLLAATKRL--KNGFQ
BCoV	223	---DKCSVEDFNWALSNGFSTFTEVST----LVLDALASMTGVSETLLAATKRL--KNGFQ
RbCoV	223	---DRCSVEDFNWALSNGFSTFTEVST----LVLDALASMTGVSETLLAATKRL--KNGFQ
WbCoV	223	---DKCSVEDFNWALSNGFSTFTEVST----LVLDALASMTGVSETLLAATKRL--KNGFQ
MCoV	222	---GYTSEETFNWARSNGYTELASL----DVFSMLAAKTSINVERLLDAIIRL--STGLG
PEDV	222	---SRVAVDRFNWAVHNGMTTVGNT----DCFSILAAKTGVVQVORLLASTIQL--HKNG
CCoV	222	---TSMSESYNTWAKTNSFTTELSST----DAFSMLAAKTGQSVKLLDSIVRL--NKGFQ
TGEV	222	---TSMSESYNTWAKTNSFTTELSST----DAFSMLAAKTGQSVKLLDSIVRL--NKGFQ
FIPV	222	---TSMTESYNAWAKTNSFTTELVST----DAFNMLAAKTGVSEKLLDAIIRL--SKGFQ
BDCoV	220	GPKQVMSVEDFNWASGYGFTKFEYH----LAFDVSAATGVSVQMLAATKEL--ADGWN
BWCoV	220	GPKQVMSVEDFNWASGYGFTKFEYH----LAFDVSAATGVSVQMLAATKEL--ADGWN
IBV	227	---TTVSDYDYNKWAGDNGFTPESTST----TAITKLSAITGVVQVCKLLRILIMVK--NSQNG
ETCoV	227	---TTVSDYDYNKWAGDNGFTPESTST----TAITKLSAITGVVQVCKLLRILIMVK--SSQNG
WSCoV	222	---DECTVSAFNDWACTNNTQVENN-----FGLFENKTGVKVERILYAIRTY--SKGFQ
DCoV	227	---TTVSDYDYNKWAVDNGFTPEVSC----TAITKLSAITGVVQVCKLLRILIMVK--SAQNG
ThCoV	224	---AEVSETDFNAWASNNSFANFPCAPANMSYILGLAQTBRVSLGRVNLNIIQL--TLNRN
WCoV	224	---TEISVAEFNWAQNSYTSVPGSKSNQDYLEALAAATTRVSVLRCLAIVVKL--HANNG
SCoV	224	---SQISVEDFNWASNNSFANFPCQTNMSYIMGLSQTARVPERILNIIQL--TLNRD
CMCoV	224	---QAISDEEFNRWAVNNAFANFPCDSANLPYLTLGLAETSKVSLGRVNLNIIQL--TLNRD
NHCoV	227	---QELSVEDFNDWAKNNDHTQVPSCDENYTYLDALAKSTGVSLKRVLSLIVTTL--HTNNG

SARS-CoV-2	278	GRITILGSALLEDEFTPEFDVVRQCSGVTFQ
BtCoV	278	GRITILGSTILLEDEFTPEFDVVRQCSGVTFQ
EriCoV	278	GNVILGSAMLEDEFTPEFDVNMQVMGVVMQ
MHV	273	GRQILGSCVFEDELTPSDVYQQLAGVKLQ
HKU4CoV	278	GRITILGQSTLEDEFTPEFDVNMQVMGVVMQ
PHEV	275	GRQIMGSCSFEDELTPSDVYQQLAGIKLQ
BCoV	275	GRQIMGSCSFEDELTPSDVYQQLAGIKLQ
RbCoV	275	GRQIMGSCAFEDLTPSDVYQQLAGVKLQ
WbCoV	275	GRQIMGSCSFEDELTPSDVYQQLAGIKLQ
MCoV	274	GRITILGYGSLSDFTPEVVRQYFGVNLQ
PEDV	274	GRQILGHTSLTDEFTPEVVRQYFGVNLQ
CCoV	274	GRITILSYGSLCDEFTPEVIRQYFGVNLQ
TGEV	274	GRITILSYGSLCDEFTPEVIRQYFGVNLQ
FIPV	274	GRITILSYGSLCDEFTPEVIRQYFGVNLQ
BDCoV	275	YAPVILGSFHLDDDEYSPEMIMQOTSGIVLQ
BWCoV	275	YAPVILGSFHLDDDEYSPEMIMQOTSGIVLQ
IBV	279	GDFILGQYNFEDELTPESVFNQYGGVRLQ
ETCoV	279	SDFILGQYNFEDELTPESVFNQYGGVRLQ
WSCoV	272	NRTVILGFGSLTDEFTSDEIYSQTFGI---
DCoV	279	SEPIILGQYNFEDEMTPEVFNHGGVRLQ
ThCoV	280	GSLIMGKPDFECDWTFEMVYNQ-----
WCoV	280	DASILGYNDFECDWTFEMVYNQ-----
SCoV	280	CACIMGSHDFECDWTFEMVYNQ-----
CMCoV	280	CALIMGHPDFECDWTFQMVFNQ-----
NHCoV	283	SASVILGMSTFDLDFTEEMVYNQ-----

Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias entre M^{pro} de SARS-CoV-2 y proteasas de CoVs mostrados en la tabla 1. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteasa principal de todos los coronavirus analizados, con la abreviatura respectiva de cada organismo y su posición de inicio y fin. Los residuos resaltados con negro están altamente conservados, aquellos con gris son medianamente conservados, y los que se encuentran sin resaltar no presentan conservación. Con asterisco se señalan los aminoácidos que forman parte de la mayoría de las interacciones con inhibidores,

siendo estos la His41, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Asp187, Arg188 y Gln189 en SARS-CoV-2.

Algunos de estos residuos se encuentran conservados en todas las proteínas analizadas, como es el caso de la Cys145 e His41, anteriormente ya mencionadas, además de Phe140, Gly143, His163, Glu166 y el Asp187. Los demás aminoácidos, aunque no se encuentran conservados en todas las enzimas estudiadas, participan en la mayoría de las interacciones con los inhibidores, a excepción de la Met49, la cual solo forma parte de las interacciones con los ligandos en M^{PRO} de SARS-CoV-2 y con HKU4-CoV, en donde el residuo cambia a Leu49. En el caso de la Leu141, esta es reemplazada por isoleucina o metionina en algunos organismos, sin embargo, sigue habiendo interacción ya que estos aminoácidos presentan cadenas laterales con grupos no polares, lo que les permite establecer enlaces hidrofóbicos con los compuestos, lo mismo sucede con la Met165.

Al analizar los aminoácidos presentes en lugar de Asn142, Ser144 y la Gln189, tomando como referencia la secuencia del SARS-CoV-2, estos cambian por residuos polares sin carga como la cisteína y treonina, que hacen posible la formación de puentes de hidrógeno. También existen casos en los cuales estos residuos son reemplazados por un aminoácido no polar, como la alanina o prolina, con los cuales las interacciones varían de acuerdo con la estructura del ligando y su carga neta. Algo similar ocurre en el caso de la His164 y la Arg188, cuyas ubicaciones son ocupadas por lisina, que es un aminoácido hidrofílico cargado positivamente, al igual que los presentes en SARS-CoV-2, también existen casos en los que son reemplazados por glutamina, que al igual que la histidina y arginina pueden formar enlaces polares.

Con estos resultados se puede estimar que los aminoácidos presentes en el sitio activo de la proteasa principal de los CoVs son muy conservados a través de las diferentes especies, y, por lo tanto, los inhibidores que funcionan en SARS-CoV-2 también podrían unirse a las otras especies de coronavirus y viceversa. Esta hipótesis se demostró mediante el análisis del mecanismo de unión del inhibidor N3, que es un compuesto peptidomimético que fue diseñado para asemejarse a una proteína, creado con anterioridad para inhibir la actividad de SARS-CoV. Según **Ullrich & Nitsche (2020)**, N3 muestra actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 en células Vero. Este

ligando funciona como un inhibidor irreversible de M^{pro} de diferentes CoVs. N3 se une covalentemente a la enzima mediante el grupo aceptor de Michael, que permite formar enlaces S-C, uniendo un carbono al doble enlace del compuesto insaturado, modificando irreversiblemente a la Cys145. Wang et al. (2016), menciona que N3 es un potente inhibidor contra M^{pro} de FIPV, virus de la peritonitis infecciosa felina y en TGEV, Coronavirus de la gastroenteritis transmisible porcina.

Como se mencionó anteriormente, N3, al ser un compuesto parecido al sustrato de la enzima, ocupa toda la cavidad del sitio activo de M^{pro} , e interactúa con los residuos Thr26, Leu27, His41, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Pro168, His172, Asp187, Arg188, Gln189, Thr190 y Gln192. Estas interacciones se pueden visualizar en la figura 7. El análisis de homología de secuencias (Figura 6) indica que solo los residuos Leu27, His41, Phe140, Gly143, Cys145, His163, Glu166, His172, Asp187 y la Gln192 se encuentran conservados en todas las especies de coronavirus analizadas.

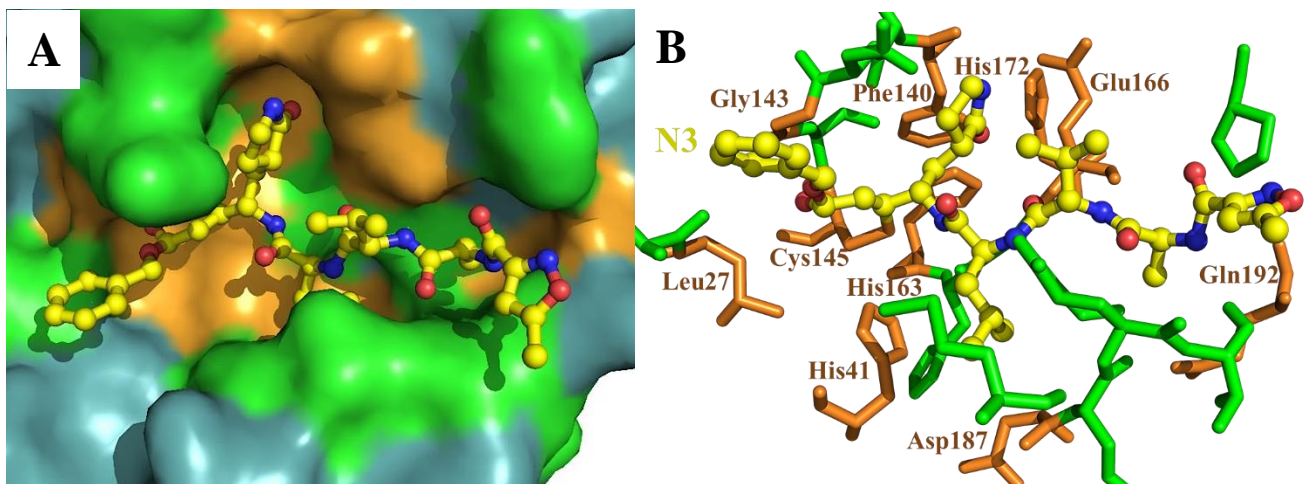


Figura 7. Representación de M^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con el inhibidor N3. A. La proteasa M^{pro} se encuentra representada como superficie en un tono verde azulado claro, mientras que N3 se muestra con esferas y barras en color amarillo. En naranja se señalan los aminoácidos que interactúan con el inhibidor y están conservados en todos los CoVs (Leu27, His41, Phe140, Gly143, Cys145, His163, Glu166, His172, Asp187, Gln192) y en verde a aquellos residuos no conservados (Thr26, Met49, Leu141, Asn142, Ser144, His164, Met165, Pro168, Arg188, Gln189, Thr190) B. Aminoácidos que forman interacciones no covalentes con N3. Los residuos

del sitio activo de M^{pro} se muestran con modelo de barras. Los colores empleados son los mismos que en el panel A.

3.1.3. Generación de una librería de compuestos para análisis de acoplamiento molecular.

La actual pandemia ha hecho que aumenten los esfuerzos en la búsqueda de una opción terapéutica que permita interrumpir la multiplicación del virus SARS-CoV-2 y frenar los contagios. Es así como, se han dirigido los estudios hacia la proteasa principal M^{pro}, la cual empezó a recibir atención tras el primer brote de SARS, ya que se sabe que no existen proteínas similares en la célula huésped que puedan realizar sus funciones y que los inhibidores de M^{pro} tienen un efecto antiviral (Shamsi et al., 2020).

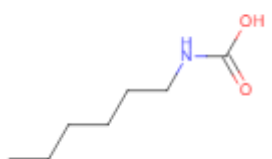
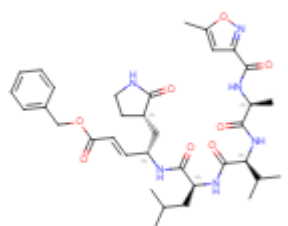
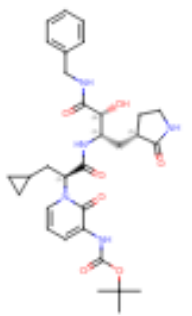
El análisis de homología estructural de M^{pro} permitió determinar que esta enzima se encuentra conservada en la mayoría de CoVs. Esto sugiere que ciertos fármacos empleados para el tratamiento de otras enfermedades causadas por CoVs, especialmente aquellos que inhiben sus proteasas, pueden tener actividad inhibitoria sobre M^{pro} del SARS-CoV-2. De este análisis, se logró identificar la existencia de 24 proteasas de virus que infectan a animales, homólogas a M^{pro}. En 6 de estas enzimas se encontraron inhibidores presentes, los que se muestran en la tabla 3. Así también, se determinaron compuestos que ya han sido probados en la proteína, y otras estructuras que presuntamente tienen actividad inhibitoria de M^{pro}, de las cuales se desconoce su modo de unión a la enzima.

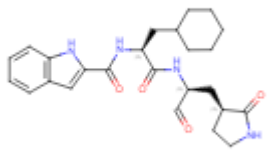
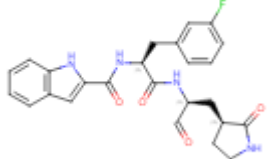
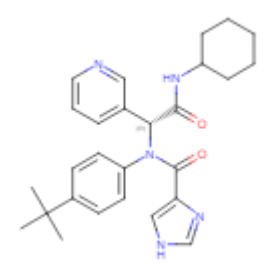
Es por esto por lo que, esta librería de ligandos (tabla 3) estructurada a partir de la selección de aquellos compuestos más efectivos en otros virus, puede ser útil para identificar moléculas que inhiban la actividad proteolítica de M^{pro}, lo que evitaría la replicación del SARS-CoV-2, siendo compuestos farmacológicos prometedores, para el desarrollo de una vacuna.

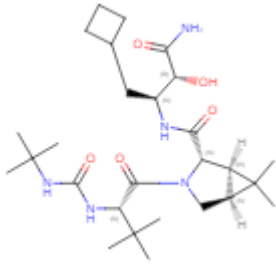
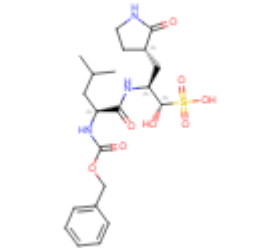
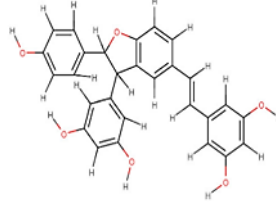
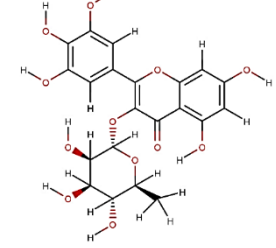
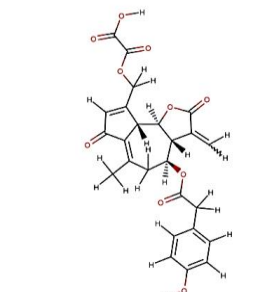
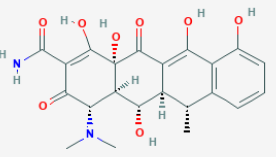
En la tabla 3 se detalla información referente a los potenciales inhibidores de M^{pro} identificados mediante el presente estudio, como el nombre de la especie de coronavirus, el código del ligando y el código PDB obtenido de la página en donde se están depositadas las enzimas de los organismos estudiados, en complejo con los inhibidores, lo que sirve para poder encontrar información sobre los compuestos de

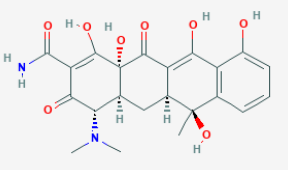
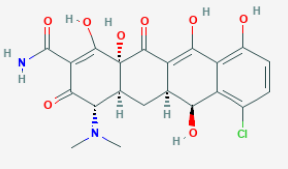
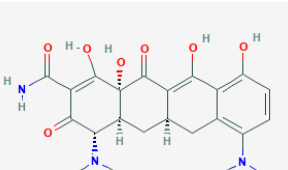
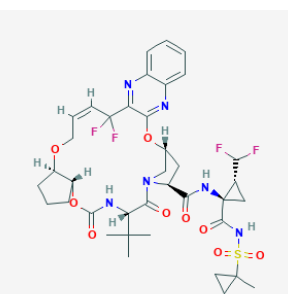
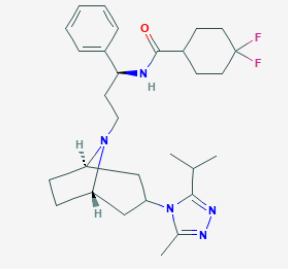
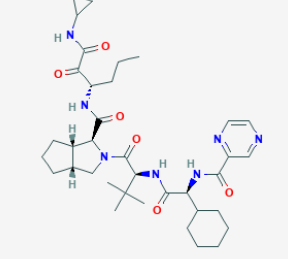
interés. Así mismo, se buscó la imagen en 2D de la estructura y su nomenclatura SMILES, proveniente del inglés; Simplified Molecular Input Line Entry Specification, que sirve para representar la estructura química de un compuesto empleando términos alfanuméricos del Código Estándar Estadounidense para el Intercambio de Información, ASCII, lo que sirvió para poder realizar el acoplamiento molecular posterior.

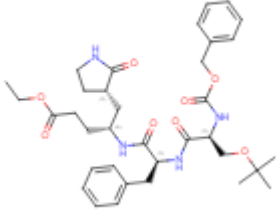
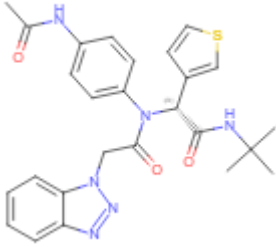
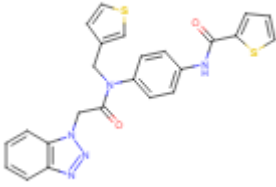
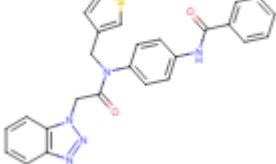
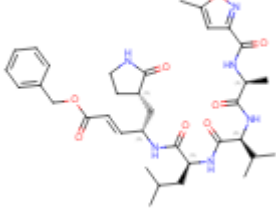
Tabla 3. Ligandos con actividad inhibitoria de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 y otras proteasas virales de animales determinados mediante análisis de homología estructural y revisión bibliográfica.

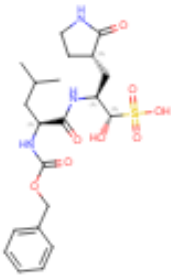
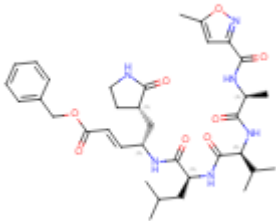
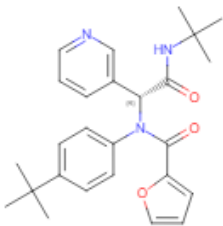
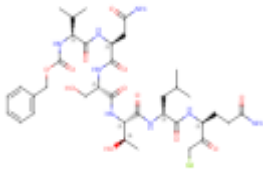
Organismo	Código PDB	Ligando	Código PDB del ligando	Nomenclatura SMILES	Estructura química
SARS-CoV-2	7BUY	Carmofur hexylcarbamic acid	JRY	<chem>CCCCCCNC(O)=O</chem>	
	7BQY	N3 n-[(5-methylisoxazol-3-yl)carbonyl]alanyl-1-valyl-n-1-((1r,2z)-4-(benzyloxy)-4-oxo-1-[(3r)-2-oxopyrrolidin-3-yl]methyl}but-2-enyl)-1-leucinamide	PRD_002214	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1cc(C)on1)C(C)C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)\C=C/C(=O)OCc3ccccc3</chem>	
	6Y2F	13b ~{tert}-butyl ~{N}-[1-[(2~{S})-3-cyclopropyl-1-oxidanylidene-1-[(2~{S},3~{R})-3-oxidanyl-4-oxidanylidene-1-[(3~{S})-2-oxidanylidene-pyrrolidin-3-yl]-4-	O6K	<chem>CC(C)(C)OC(=O)NC1=CC=CN([C@@H](CC2CC2)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]3CCNC3=O)[C@@H](O)C(=O)NCc4ccccc4)C1=O</chem>	

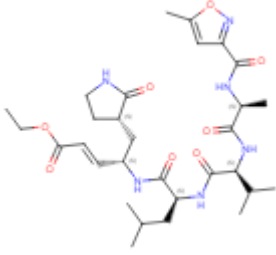
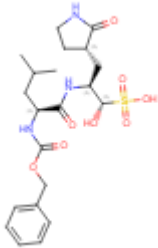
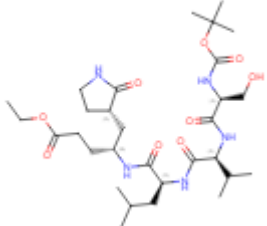
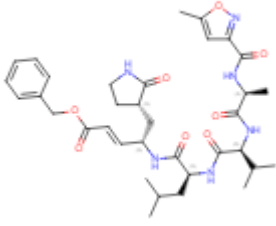
		[(phenylmethyl)amino]butan-2-yl]amino]propan-2-yl]-2-oxidanylidene-pyridin-3-yl]carbamate			
6LZE	11a ~{N}-[(2~{S})-3-cyclohexyl-1-oxidanylidene-1-[[2~{S})-1-oxidanylidene-3-[(3~{S})-2-oxidanylidenepyrrolidin-3-yl]propan-2-yl]amino]propan-2-yl]-1~{H}-indole-2-carboxamide	FHR/PR D_00234 7	<chem>O=C[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](CC2CCCCC2)NC(=O)c3[nH]c4cccc4c3</chem>		
6M0K	11b ~{N}-[(2~{S})-3-(3-fluorophenyl)-1-oxidanylidene-1-[[2~{S})-1-oxidanylidene-3-[(3~{S})-2-oxidanylidenepyrrolidin-3-yl]propan-2-yl]amino]propan-2-yl]-1~{H}-indole-2-carboxamide	FJC/PR D_00234 9	<chem>Fc1cccc(C[C@H](NC(=O)c2[nH]c3cccc3c2)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]4CCNC4=O)C=O)c1</chem>		
6W63	X77 N-(4-tert-butylphenyl)-N-[(1R)-2-(cyclohexylamino)-2-oxo-1-(pyridin-3-yl)ethyl]-1H-imidazole-4-carboxamide	X77	<chem>CC(C)(C)c1ccc(cc1)N([C@@H](C(=O)NC2CCCCC2)c3ccnc3)C(=O)c4c[nH]cn4</chem>		

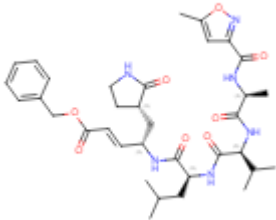
	6WNP	Boceprevir	U5G/PR D_00238 2	<chem>CC(C)(C)NC(=O)N[C@H](C(=O)N1C[C@H]2[C@@H]([C@H]1C(=O)N[C@@H](CC3C(C)C)C[C@@H](O)C(N)=O)C2(C)C)C(C)(C)C</chem>	
	6WTT	GC376 (1S,2S)-2-({N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-leucyl}amino)-1-hydroxy-3-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]propane-1-sulfonic acid	K36	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)OCc1ccccc1)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)[C@@H](O)[S](O)(=O)=O</chem>	
	ND	δ-Viniferin	ND	<chem>C1=CC(=CC=C1C2C(C3=C(O2)C=C(C=C3)C=CC4=C(C=CC(=C4)O)O)C5=CC(=CC(=C5)O)O)O</chem>	
	ND	Myricitrin	ND	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=C(OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O)C4=CC(=C(C(=C4)O)O)O)O)O)O</chem>	
	ND	Lactucopicrin 15-oxalate	ND	<chem>CC1=C2C(C3C(C(C1)OC(=O)CC4=CC=C(C=C4)O)C(=C)C(=O)O3)C(=CC2=O)COC(=O)C(=O)O</chem>	
	ND	Doxycycline	ND	<chem>CC1C2C(C3C(C(=O)C(=C(C3(C(=O)C2=C(C4=C1C=C(C=C4)O)O)O)O)C(=O)N)N(C)C)O</chem>	

	ND	Tetracycline	ND	<chem>CC1(C2CC3C(C(=O)C(=C(C3(C(=O)C2=C(C4=C1C=C(C=C4O)O)O)O)C(=O)N)N(C)C)O</chem>	
	ND	Demeclocycline	ND	<chem>CN(C)C1C2CC3C(C4=C(C=CC(=C4C(=C3C(=O)C2(C(=C(C1=O)C(=O)N)O)O)O)O)C1)O</chem>	
	ND	Minocycline	ND	<chem>CN(C)C1C2CC3C(C4=C(C=CC(=C4C(=C3C(=O)C2(C(=C(C1=O)C(=O)N)O)O)O)O)N(C)C</chem>	
	ND	Glecaprevir	ND	<chem>CC1(CC1)S(=O)(=O)NC(=O)C2(CC2C(F)F)NC(=O)C3CC4CN3C(=O)C(NC(=O)OC5CCC5OCC=CC(C6=NC7=CC=CC=C7N=C6O4)(F)F)C(C)(C)C</chem>	
	ND	Maraviroc	ND	<chem>CC1=NN=C(N1C2CC3CCC(C2)N3C(C4=C(C=CC(=C4)NC(=O)C5CC(C(C5)(F)F)C(C)C</chem>	
	ND	*Telaprevir	ND	<chem>CCCC(C(=O)C(=O)NC1CC1)NC(=O)C2C3CCCC3CN2C(=O)C(C(C)(C)C)NC(=O)C(C4CCCC4)NC(=O)C5=NC=CN=C5</chem>	

Coronavirus de murciélago HKU4	2YNB	SG85 N-[(benzyloxy)carbonyl]-O-tert-butyl-L-seryl-N-[(2R)-5-ethoxy-5-oxo-1-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]pentan-2-yl]-L-phenylalaninamide	G85	<chem>CCOC(=O)CC[C@@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](Cc2ccccc2)NC(=O)[C@H](COC(C)(C)C)NC(=O)OCc3ccccc3</chem>	
	4YOG	3B N-[4-(acetylamino)phenyl]-2-(1H-benzotriazol-1-yl)-N-[(1R)-2-(tert-butylamino)-2-oxo-1-(thiophen-3-yl)ethyl]acetamide	4F5	<chem>CC(=O)Nc1ccc(cc1)N([C@@H](C(=O)NC(C)(C)C)c2csc2)C(=O)Cn3nnc4ccccc34</chem>	
	4YOI	1A N-{4-[(1H-benzotriazol-1-yl)acetyl](thiophen-3-ylmethyl)amino}phenyl}thiophene-2-carboxamide	4F4	<chem>O=C(Cn1nnc2ccccc12)N(Cc3csc3)c4ccc(NC(=O)c5sc5)cc4</chem>	
	4YOJ	2A N-{4-[(1H-benzotriazol-1-yl)acetyl](thiophen-3-ylmethyl)amino}phenyl}benzamide	RFM	<chem>O=C(Cn1nnc2ccccc12)N(Cc3csc3)c4ccc(NC(=O)c5ccccc5)cc4</chem>	
Coronavirus Murinivirus de la hepatitis de ratón	6JIJ	N3 n-[(5-methylisoxazol-3-yl)carbonyl]alanyl-L-valyl-n~1~((1r,2z)-4-(benzyloxy)-4-oxo-1-[(3r)-2-oxopyrrolidin-3-yl]methyl}but-2-	PRD_002214	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1cc(C)on1)C(C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)\C=C/C(=O)OCc3ccccc3</chem>	

		enyl)-l-leucinamide			
Virus de la diarrea epidémica porcina	6L70	GC376 (1S,2S)-2-({N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-leucyl}amino)-1-hydroxy-3-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]propane-1-sulfonic acid	K36	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)OCc1ccccc1)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)[C@@H](O)[S](O)(=O)=O</chem>	
	5GWZ	N3 n-[(5-methylisoxazol-3-yl)carbonyl]alanyl-L-valyl-n~1~((1r,2z)-4-(benzyloxy)-4-oxo-1-[[3r)-2-oxopyrrolidin-3-yl]methyl}but-2-enyl)-l-leucinamide	PRD_00 2214	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1cc(C)on1)C(C)C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)\C=C/C(=O)OCc3ccccc3</chem>	
	ND	*(R)-16 N-[(1R)-2-(tert-butylamino)-2-oxo-1-(pyridin-3-yl)ethyl]-N-(4-tert-butylphenyl)furan-2-carboxamide	0EN	<chem>CC(C)(C)NC(=O)[C@H](N(C(=O)c1occc1)c2ccc(cc2)C(C)(C)C)c3ccnc3</chem>	
Coronavirus de gastroenteritis transmisible porcina	1P9U	Inhibitor CH2-QLTSNV-Z (SUBSTRATE-ANALOG)	PRD_00 0457	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](CO)NC(=O)[C@H](C)C(N)=O)NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1ccccc1)C(C)C)[C@@H](C)OC(=O)N[C@@H](CCC(N)=O)C(=O)CCl</chem>	

	2AMP	N1 N-[(5-methylisoxazol-3-yl)carbonyl]-l-alanyl-l-valyl-n~1~((1s)-4-ethoxy-4-oxo-1-[(3s)-2-oxopyrrolidin-3-yl]methyl}but-2-enyl)-l-leucinamide	I12	<chem>CCOC(=O)/C=C/[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c2cc(C)on2)C(C)C</chem>	
	4F49	GC376 (1S,2S)-2-({N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-leucyl}amino)-1-hydroxy-3-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]propane-1-sulfonic acid	K36	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)OCc1ccccc1)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)[C@@H](O)[S](O)(=O)=O</chem>	
Coronavirus de la peritonitis infecciosa felina	4ZRO	N-(tert-butoxycarbonyl)-L-seryl-L-valyl-N-((2S)-5-ethoxy-5-oxo-1-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]pentan-2-yl)-L-leucinamide	PRD_00 2174	<chem>CCOC(=O)CC[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](CO)NC(=O)OC(C)C)C(C)C</chem>	
	5EU8	N3 n-[(5-methylisoxazol-3-yl)carbonyl]alanyl-l-valyl-n~1~((1r,2z)-4-(benzyloxy)-4-oxo-1-[(3r)-2-oxopyrrolidin-3-yl]methyl}but-2-enyl)-l-leucinamide	PRD_00 2214	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1cc(C)on1)C(C)C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)\C=C/C(=O)OCc3ccccc3</chem>	

Virus de la bronquitis infecciosa aviar	2Q6F	N3 n-[(5-methylisoxazol-3-yl)carbonyl]alanine 1-1-valyl-n~1~ ((1r,2z)-4-(benzyloxy)-4-oxo-1-[[3r]-2-oxopyrrolidin-3-yl]methyl}but-2-enyl)-1-leucinamide	PRD_00 2214	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1cc(C)on1)C(C)C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)\C=C/C(=O)OCc3ccccc3</chem>	
---	------	--	----------------	--	---

De los compuestos enlistados en la Tabla 3 Carmofur, un análogo de la pirimidina, también nombrado HCFU, por su nomenclatura, 1-hexilcarbamoil-5-fluorouracilo, es uno de los ligandos probados en SARS-CoV-2, esta molécula es usada como antineoplásico para tratar varios tipos de cáncer, inhibiendo la ceramidasa ácida, que es la enzima encargada de la supervivencia de células cancerígenas (**Ma et al., 2020**). En SARS-CoV-2, carmofur se une covalentemente a la Cys145 de la proteasa principal M^{pro}, modificándola completamente. Según **Jin, Zhao, et al. (2020)**, este compuesto puede inhibir a M^{pro} in vitro, a una concentración inhibitoria media, IC₅₀ de 1.82μM, la interacción covalente se da mediante la unión del grupo sulfhídrido de la Cys145 con el grupo carbonilo de carmofur. Además, existen otras interacciones entre el compuesto y los residuos (Anexo B.1.), ya que, el oxígeno de este grupo carbonilo forma puentes de hidrógeno con las amidas de la Cys145 y Gly143, mientras que los residuos His41, Met49 y Met165 se enlazan hidrofóbicamente con la cola de ácido graso del ligando.

El mecanismo de unión de carmofur es distinto al de N3, el cual como se mencionó anteriormente, se enlaza mediante la adición de Michael del grupo vinilo a la cisteína catalítica. También, varían en la posición en la que se introducen estos dos compuestos, ya que el primero solo ocupa el subsitio S2 de la proteína, mientras que el segundo los subsitios S1, S2, S4 y S1' (**Jin, Zhao, et al., 2020**).

De la misma manera se analizaron fármacos como Boceprevir, antiviral empleado para inhibir la enzima del virus de la hepatitis C, al ser miembro de los medicamentos anti-proteasa, se une covalentemente a la Ser139 de la proteasa NS3/4A de HCV, por lo que resulta ser un buen candidato en la inhibición de M^{pro}. Esto fue estudiado por **Fu**

et al. (2020), demostrando que boceprevir en complejo con la proteasa principal de SARS-CoV-2, logra modificar a la enzima al unirse covalentemente con la cisteína catalítica y forma enlaces polares con His41, Gly143 e His164 por un lado de su grupo amida y con Glu166 por el otro lado, sin embargo, una parte del inhibidor no logra tener interacciones al ser empujado por la Glu166, lo que provoca que exista una actividad moderada de inhibición.

δ -Viniferin, Myricitrin y Lactucopicrin 15-oxalate, son más moléculas analizadas. Las dos primeras son fármacos antitusivos, antioxidantes, antivirales y antiinflamatorios, mientras que la última es usada para la malaria. Se trata de compuestos naturales provenientes de plantas como *Vitis vinífera*, *Myristica fragrans* y *Lactuca virosa*, respectivamente. Mediante un estudio se determinó que presentaban una fuerte unión con la proteasa de SARS-CoV-2, compartiendo la mayoría de las interacciones. Los grupos hidroxilo de δ -Viniferin, forman enlaces polares con los residuos de la enzima como Thr24 e His163 y su grupo aromático central interactúa con la His41. Sin embargo, este ligando no se enlaza con la Cys145, no obstante, existe una fuerte unión enzima-ligando. Myricitrin por el contrario, genera un enlace Pi-alquilo con la His41 y Pi-azufre con la Cys145. Y, por último, Lactucopicrin 15-oxalate, forma un enlace de hidrógeno con esta cisteína del centro activo (**Joshi et al., 2020**).

La Doxiciclina es un antirretroviral, se ha usado para tratar la enfermedad del dengue y Chikunguya, la demeclociclina actúa sobre el virus del Nilo Occidental, la Minociclina se usa contra el VIH, virus de inmunodeficiencia humana, virus de la encefalitis japonesa, la rabia, etc., estas tetraciclinas podrían ser usadas para impedir la replicación del SARS-CoV-2 (**Bharadwaj et al., 2020**). Por otra parte, está el Maraviroc, aprobado por la FDA, para evitar la entrada del VIH en las células humanas, además se ha usado para tratar el cáncer, teniendo resultados prometedores. Igualmente, se puede mencionar al Glecaprevir que actúa igual al Boceprevir, contra la hepatitis C, lo mismo sucede con el Telaprevir (**Shamsi et al., 2020**). Todos estos fármacos actúan inhibiendo significativamente la actividad de la enzima M^{pro} , generando un gran número de interacciones no covalentes con la mayoría de los residuos antes mencionados.

En el caso de 13b, este es un compuesto generado a partir de otro que fue usado para tratar el MERS y SARS, reemplazando grupos como un ciclopropil en lugar de un ciclohexil. 13b ataca nucleofílicamente a M^{pro}, al igual que los otros en la Cys145, reaccionando con los demás residuos de la misma manera que lo hace carmofur y N3, ya que al tratarse de una α -cetoamida, interactúa mediante enlaces de hidrógeno con el centro catalítico de la enzima (**L. Zhang et al., 2020**). X77, también es un ligando estudiado con anterioridad para inhibir a SARS-CoV M^{pro}, observándose resultados prometedores en cuanto a la actividad inhibitoria de la enzima, aunque no la modifique covalentemente.

Otros compuestos encontrados son 11a y 11b, cuyos grupos aldehídos pueden enlazarse covalentemente con la Cys145. **Dai et al. (2020)**, crearon estos compuestos a partir de N-Boc-L- glutamic acid dimethyl ester, para tratar la Covid-19, al analizar el sitio activo de la proteasa principal y los posibles residuos a los que se podían unir los ligandos. Determinando mediante FRET, Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente, que sus IC₅₀, fueron 0,05 μ M para 11a y 0,04 μ M para 11b, además, demostraron que el anillo (*S*)- γ -lactámico de 11a forma un puente de hidrógeno con la His163, His164 Phe140 y Glu166. Por otra parte, el grupo ciclohexil del inhibidor forma interacciones hidrofóbicas con la Met49, Met165, Pro168, Asp187, Arg188 y Gln189. Lo mismo ocurre con 11b, diferenciándose en el grupo 3-fluorofenilo que presenta 11b, en la posición del ciclohexil del 11a, que se une por enlace de hidrógeno a la Gln189.

En la tabla 3, también se muestran ligandos obtenidos a partir de los análisis de homología realizados previamente (tabla 1), en los cuales se encontraron compuestos en complejo con proteasas M^{pro} de coronavirus de animales, algunos de ellos ya se han probado en SARS-CoV-2, como es el caso de N3 y de GC376, este último, es una sal de aducto de dipeptidil bisulfito, un inhibidor que ataca covalentemente a las proteasas de coronavirus, actuando también sobre norovirus y picornavirus, por lo que ha sido usado para tratar la peritonitis infecciosa felina, FIP, presentando resultados positivos (**Fu et al., 2020**). Así mismo, se ha probado en el MERS y en el PED, diarrea epidémica porcina, mostrando un elevado efecto inhibitor, reportado por **Ye et al. (2020)**, quien afirmó que actuó a una concentración inhibitoria de 1.11 μ M, en estudios *in vitro*, además de interactuar con la Cys144, His162, Gln163 y Glu165 generando

puentes de hidrógeno, lo que se demostró mediante el uso de PyMOL y WinCoot. De igual manera, ocurrió al observar su efecto en SARS-CoV-2 M^{pro}, con la que se apreció especificidad en su unión por la presencia de un sustituto de glutamina, una leucina y un anillo benceno, en el sustrato, con una IC₅₀ de 0.4 μM, interactuando con la Cys145 de manera covalente y con los demás residuos drogables de la enzima (**Vuong et al., 2020**).

Existen otros compuestos que aún no han sido estudiados en M^{pro} de SARS-CoV-2, pero que han sido diseñados o probados en otras proteasas, un ejemplo de esto es 3B, ligando peptidomimético, empleado en HKU4-CoV, en donde se une al bolsillo del sitio activo de la proteína, conformado por residuos polares, interactuando con la Cys148 (**John et al., 2015**). Al igual que 3B, N1 ha sido explorado en variedad de CoVs, mostrando eficiencia en la inhibición de las proteasas de los virus TGEV, FIPV, MHV y IBV. Además, ha sido analizado en SARS-CoV, obteniendo resultados similares a los encontrados con TGEV, interactuando mediante la reacción de Michael (**Yang et al., 2005**).

A su vez, se analizaron varios ligandos presentes en la librería COVID Box, creada por los investigadores de MMV, Medicines for Malaria Venture, para impulsar la investigación de nuevos fármacos que sirvan para tratar el COVID-19. Este archivo contiene 160 moléculas, algunas de ellas son medicamentos ya comercializados, mientras que otros se encuentran en desarrollo y que presuntamente presentan actividad contra SARS-CoV-2. Esta librería está disponible para dominio público, con la finalidad de compartir los hallazgos obtenidos en cuanto a la factibilidad y mecanismo de acción de los compuestos allí enlistados. Para el presente estudio se seleccionó una parte de la librería, usando los compuestos del 1 al 80, a excepción de la molécula posicionada en el lugar 69, denominada ferroquina.

3.1.4. Determinación de los mejores inhibidores de la proteasa M^{pro} mediante el análisis de sus propiedades de unión con la enzima.

Para identificar potenciales inhibidores de M^{pro} de SARS-CoV-2, se realizó experimentos virtuales de acoplamiento molecular (docking) con los ligandos detallados en tabla 3. En este análisis se omitió aquellos ligandos que se unen por

enlace covalente a la enzima (Anexo C). Además, en el experimento de docking se agregaron los 79 compuestos tomados de la librería COVID Box.

Previo al experimento de docking, se realizó la superposición de las estructuras de SARS-CoV-2 M^{pro} con códigos PDB: 7BUY, 7BQY, 6Y2F, 6LZE, 6M0K, 6W63, 6WNP, 6WTT, con lo que se determinó que los aminoácidos Thr24, Ser46, Met49, Asn142, Met165, Arg188, Gln189, Thr190 y Gln192 tienden a cambiar la conformación de sus cadenas laterales dependiendo del inhibidor que esté presente. De esta forma se otorgó flexibilidad a sus cadenas laterales durante el docking (figura 8). Las proteínas son moléculas dinámicas, y esta propiedad se debe, en gran medida, a la flexibilidad de sus cadenas laterales y a las interacciones que estas tienen con el solvente. Por lo tanto, durante simulaciones de las interacciones entre un ligando y una proteína es imprescindible tomar en cuenta que las cadenas laterales de los residuos que conforman el sitio de unión del inhibidor necesitan ser flexibles para permitir que la molécula de inhibidor interactuar con la enzima. Esta flexibilidad se hace aún más necesaria cuando las librerías de compuestos a analizar contienen moléculas grandes, lo que requiere que los aminoácidos tengan que cambiar su posición para evitar choques estéricos con el compuesto. En el caso de M^{pro}, el sitio de unión de los inhibidores corresponde al sitio activo, el cual se encuentra cerca de la superficie de la enzima y está protegido por las cadenas laterales de Asn142, Gln189, Met49, que inherentemente requieren flexibilidad durante el docking.

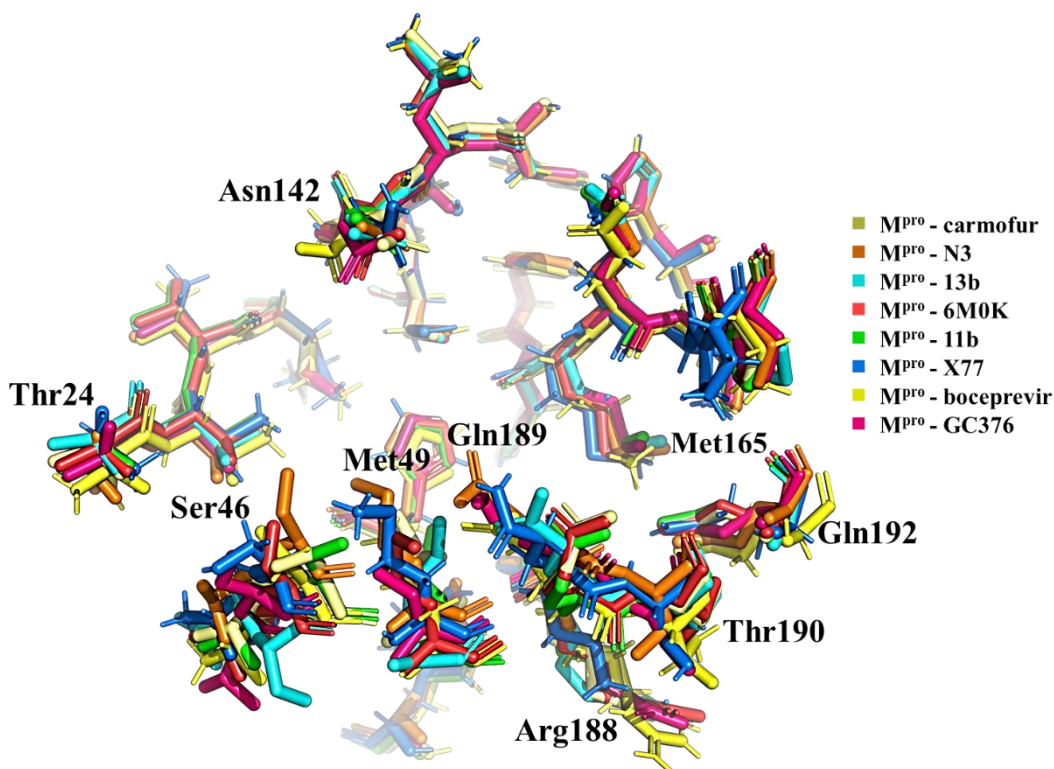


Figura 8. Superposición de estructuras de M^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con distintos inhibidores. Se indican los aminoácidos de SARS-CoV-2 M^{pro} que se flexibilizan en dependencia del inhibidor que esté presente, estos residuos son Thr24, Ser46, Met49, Asn142, Met165, Arg188, Gln189, Thr190 y Gln192. La estructura con código 7BUY: color crema, está en complejo con carmofur. 7BQY: en naranja, unida a N3. 6Y2F: en celeste, enlazada a 13b. 6LZE: en rojo, con 11a. 6M0K: en verde, con 11b. 6W63: en azul, la proteasa unida a X77. 6WNP: en tono amarillo, la enzima enlazada a boceprevir. 6WTT: en rosado, M^{pro} con GC376.

Luego de realizar el docking, empleando 94 compuestos, 79 de los cuales eran procedentes de la librería COVID Box, y 15 obtenidos del alineamiento en PDBeFold y revisión bibliográfica, se ordenaron los resultados en función del Score que brinda el programa GOLD - Protein Ligand Docking Software (Anexo D.1) y se escogió los 10 mejores resultados, tomando como referencia su afinidad a la enzima (Score ChemPLP). Estos resultados se observan en la tabla 4. La puntuación ChemPLP estima la transformación total de energía libre que se produce con la unión del compuesto a la enzima. Esta función brinda una puntuación interna a cada molécula, cuya determinación incluye varios parámetros como el potencial de choque de átomos pesados (clash) y el potencial de torsión (tors). Además, el docking fue evaluado

mediante el potencial lineal por partes (PLP), usado para determinar la complementariedad estérica entre la proteína y el ligando, considerándose los enlaces de hidrógeno dependientes de distancia y ángulo (Korb et al., 2009). Todos estos datos se pueden apreciar en el Anexo D.1

Tabla 4. Resultados de acoplamiento molecular de los 10 mejores inhibidores de la enzima M^{pro} de SARS-CoV-2.

Nº	Ligando	Score	S(PLP)
1	MMV637861	95.64	-98.71
2	MMV688774	95.17	-89.23
3	MMV000025	91.86	-91.15
4	MMV1804180	91.64	-82.85
5	MMV003162	91.21	-90.33
6	MMV637528	91.02	-89.46
7	VNF	90.33	-83.98
8	MMV690727	90.07	-80.64
9	1A	89.39	-86.68
10	2A	89.23	-87.74

Los compuestos que resultaron unirse de mejor manera a la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2, pertenecen en su mayoría a la librería COVID Box. El mejor resultado corresponde al Ritonavir, con código MMV637861, que es un fármaco empleado para inhibir a la proteasa CYP3A del VIH y aprobado por la FDA. Este ligando presenta un puntaje de unión de 95.64, la mayor observada en este estudio, y ocupa toda la cavidad del sitio activo de M^{pro}. Se conoce que el Ritonavir tiene un alto grado de absorción oral, además de presentar resultados favorables disminuyendo la carga viral en plasma de pacientes con VIH tratados (Hsu et al., 1998). Según Cao et al. (2020), Ritonavir ha sido probado en conjunto con otros compuestos como lopinavir, interferón beta y ribavirin en pacientes hospitalizados a causa del COVID-19, como terapia antiviral para reducir los síntomas y disminuir el tiempo de hospitalización, obteniendo resultados prometedores. Estos datos fueron corroborados por Hung et al. (2020),

quien afirma que en conjunto estos compuestos actúan mejor para inhibir al SARS-CoV-2.

El segundo mejor inhibidor fue el Posaconazol, con código MMV688774, el cual es un compuesto antifúngico triazol de amplio espectro empleado contra gran variedad de hongos y mohos. El Posaconazol muestra una alta especificidad por varias especies de hongos de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*. Por esta razón ha sido aprobado por la FDA para tratar la candidiasis orofaríngea. Además se sabe que tiene actividad inhibitoria de la enzima CYP, una citocromo oxidasa, y presenta una unión del 98% a diferentes proteínas (Nagappan & Deresinski, 2007). También se han realizado estudios *in vitro* empleando este compuesto contra zigomicetos, para tratar la cigomicosis que es una infección con altos índices de mortalidad, afectando a la mayoría de pacientes inmunodeprimidos (Greenberg et al., 2006). Por otra parte, según Ellinger et al. (2020), el Posaconazole muestra actividad antiviral contra los parechovirus A3 pertenecientes a la familia *Picornaviridae*, exhibiendo un IC₅₀ de 2μM. En adición, Mohamed et al. (2020), menciona que este ligando es afín a la proteína Spike de los coronavirus.

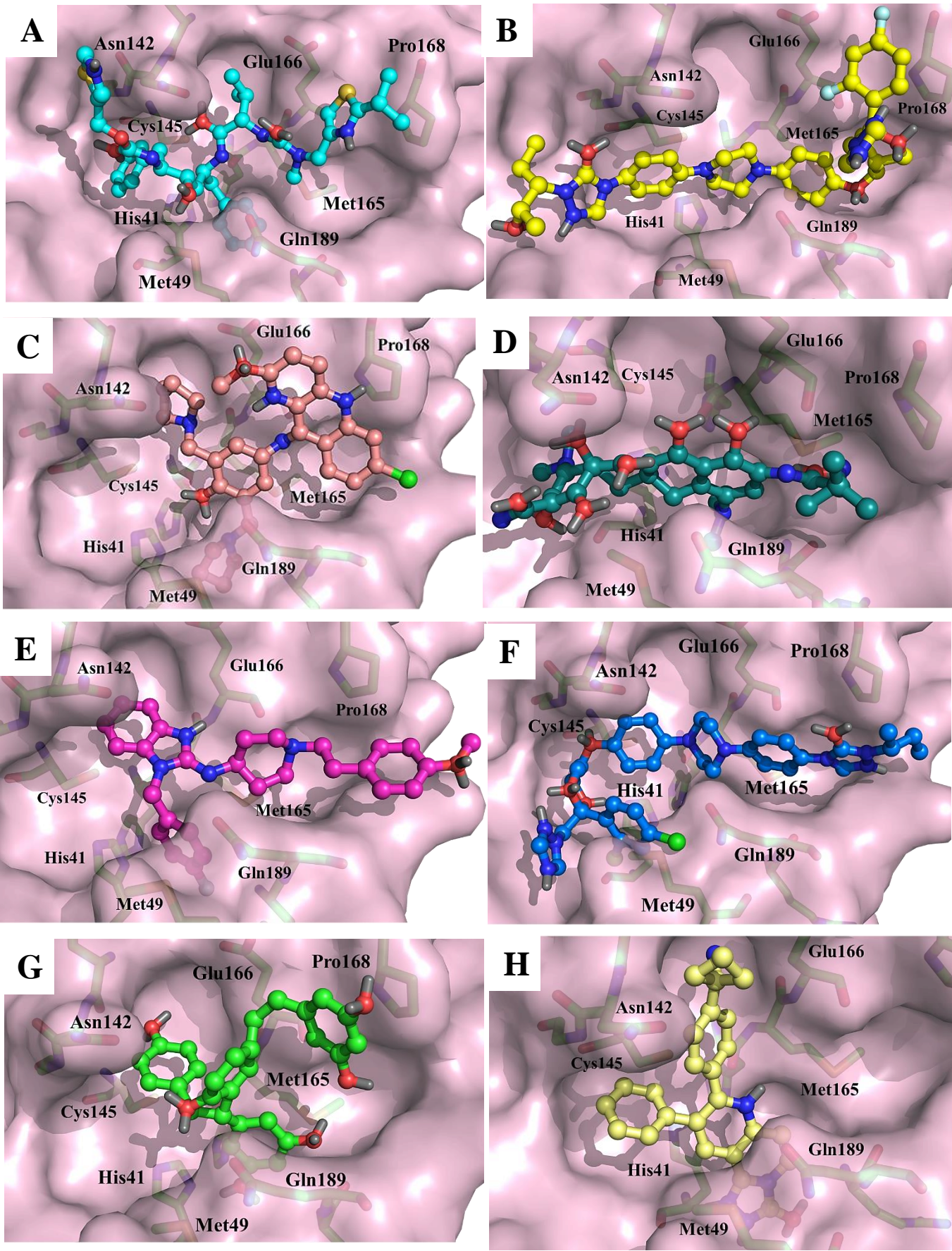
El tercer ligando, con un Score de 91.86 y código MMV000025, es un fármaco derivado de la benzonaftiridina, denominado Pironaridina, empleado para tratar la malaria, teniendo un elevado potencial contra *Plasmodium falciparum*, incluso en cepas resistentes (Croft et al., 2012). Se ha hecho estudios analizando que el target de este compuesto es la hematina, uniéndose a ella para inhibir la producción de β-hematina (Auparakkitanon et al., 2006). En un experimento realizado por Ray et al. (2020), en el cual identifica potenciales inhibidores de la proteasa principal de SARS-CoV-2, aprobados por la FDA, demuestra que la Pironaridina presenta una afinidad de unión a la enzima de -7.6 kcal/mol.

Los demás compuestos obtenidos de COVID Box, MMV1804180, MMV003162, MMV637528 y MMV690727, denominados Tygeciclina, Astemizole, Itraconazole y MK-2206, respectivamente, mostraron una especificidad similar por la proteasa. El primero es un antibacterial, mediante estudios se ha logrado determinar que este compuesto tiene como target la enzima PL^{pro} de SARS-CoV-2, razón por la que pudo haber tenido afinidad con M^{pro}, al ser enzimas que tienen la misma función (Mohamed

et al., 2020). El segundo compuesto, es un antihistamínico con propiedades antimaláricas, mencionado por **Riva et al. (2020)**, como posible antiviral contra SARS-CoV-2. El Itraconazole, es un antifúngico, probado con anterioridad en SARS-CoV-2 M^{pro}, mostrando un ΔG de -9.05 Kcal/mol, que interactúa con la Ser46 y Gly143, estableciendo puentes de hidrógeno, un enlace pi-sulfuro con la Cys145 y pi-alquil con la Pro168 (**Das et al., 2020**). Y, por último, MK-2206, que es un agente antitumoral, estudiado para tratar el cáncer de mama, ha presentado actividad antiviral disminuyendo hasta en un 50% la replicación del SARS-CoV-2 en células *in vitro* (**Gassen et al., 2013**).

δ -Viniferin, por su parte fue nombrado en la sección 3.1.3., antitusivo, antioxidante y antiviral, que, según **Joshi et al. (2020)**, presenta una energía de unión de -8.4 Kcal/mol a M^{pro} de SARS-CoV-2, enlazándose a los residuos Thr24, His163, His41 y Met165 (Anexo B.1). Y 1A Y 1B, inhibidores que actúan en M^{pro} de HKU4-CoV, a un IC₅₀ de 0,04 μ M (**John et al., 2015**). Estos compuestos generan interacciones con los residuos catalíticos en la proteasa de HKU4, datos que se encuentran en el Anexo B.2.

En cuanto al análisis de las interacciones que surgen en el complejo enzima-ligando, se muestran en la figura 9, el lugar y la posición que ocupa cada inhibidor en la proteasa principal de SARS-CoV-2. Además, mediante las herramientas PyMOL y WinCoot se pudo determinar que los aminoácidos que interactúan en la mayoría de los complejos son: His41, Met49, Leu141, Asn142, Gly143, Cys145, His164, Met165, Glu166, Pro168, Arg188, Gln189. Datos iguales a los obtenidos bibliográficamente de la librería de compuestos generada previamente, lo que corrobora y justifica los resultados recuperados después del docking, además, con esto se comprueba que estos residuos son parte del sitio activo de la enzima. Y que gracias a sus grupos funcionales como el grupo imidazol de la histidina, las amidas de la asparagina y glutamina, el grupo imino de la prolina y el guanidino de la arginina, les permite establecer puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos con el sustrato (**Rodríguez, 2011**).



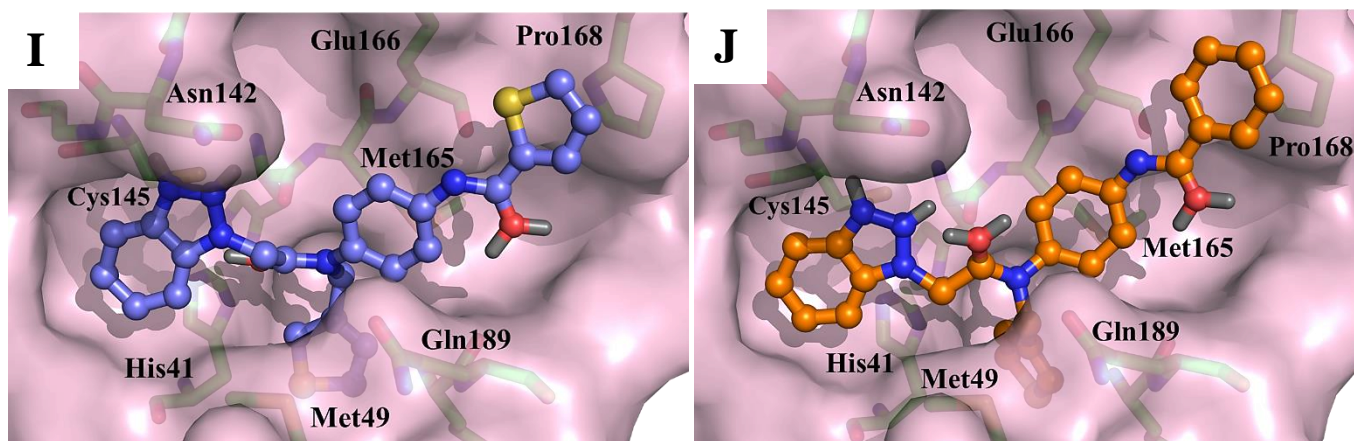


Figura 9. Representación de M^{pro} de SARS-CoV-2 en complejo con los mejores inhibidores. Se muestra a la enzima en superficie unida a los inhibidores representados mediante barras y esferas. Se señalan los aminoácidos que participan de las interacciones en la mayoría de los complejos (His41, Met49, Asn142, Cys145, Met165, Glu166, Pro168, Gln189). A. MMV637861 en color celeste. B. MMV688774 en amarillo. C. MMV000025 en tono rosa. D. MMV1804180 en verde oscuro. E. MMV003162 en fucsia. F. MMV637528 coloreado de azul. G. VNF en verde claro. H. MMV690727 en color crema. I. 1A en lila y J. 2A en un tono naranja.

Adicionalmente, se analizó la naturaleza de las interacciones no covalentes entre M^{pro} y los tres mejores resultados mediante la herramienta Arpeggio (Jubb et al., 2017). En el caso de MMV637861, este compuesto interactúa con los oxígenos del Glu166, de la Gln189, Thr26, Asn142, Phe140, Leu167, Pro168 e His164 el azufre de la Met49 y la Cys145, los grupos hidroxilo de la Tyr54 y la Ser46, y los nitrógenos de la His41, Gly143 y Cys145, formando puentes de hidrógeno. No obstante, la mayoría de estos residuos también participan en interacciones hidrofóbicas junto con otros residuos, como la Met165, His163, Thr25 y Leu27. Además, cabe recalcar que la His41 genera interacciones pi-pi con dos grupos aromáticos del inhibidor y un enlace pi-carbono, mientras que la Asn142 participa en una interacción pi-cación con otro grupo aromático del ligando, así mismo, los azufres de la Met49 y la Met165 generan una unión pi-sulfuro, esto se aprecia en la figura 10. Resultados similares a los encontrados por Muralidharan et al. (2020), quien demostró que Ritonavir se une a los residuos mencionados mediante interacciones polares e hidrofóbicas.

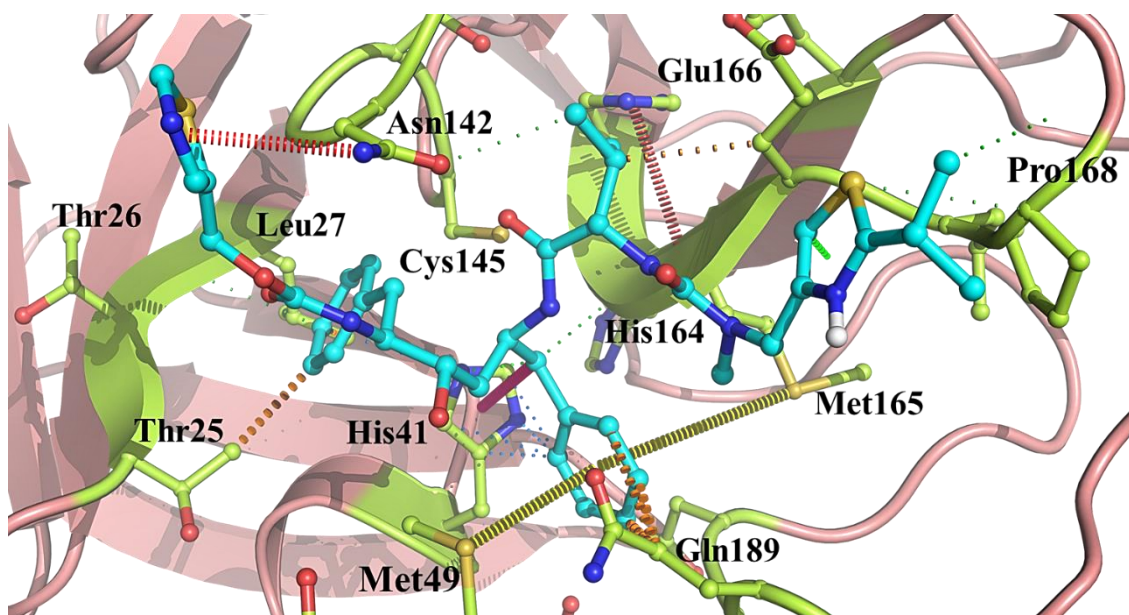


Figura 10. Interacciones entre los residuos de M^{pro} de SARS-CoV-2 y el inhibidor MMV637861. Se representa mediante cartoon a la proteasa principal en tono rosa y a los residuos que participan en las interacciones en un color verde claro en barras y esferas, el inhibidor MMV637861 en celeste. Los puentes de hidrógeno se señalan con líneas verdes oscuras, uniendo al ligando con los residuos Thr26, Pro168, His164, Cys145 y Asn142. Las interacciones hidrofóbicas en naranja con la Thr24, Gln189 y Glu166. En azul, las interacciones pi-pi y en rosado las pi-alkil con la His41. En rojo, las pi-cación con la Asn142 y en amarillo las pi-sulfuro con la Met49 y Met165.

Lo mismo ocurre con el compuesto MMV688774, el cual interactúa con M^{pro} mediante la mayoría de las interacciones observadas MMV637861, sumados algunos residuos que forman interacciones polares, como la Thr190, Asn119 y Thr24 con los cuales también existen ciertas interacciones hidrofóbicas. Como se observa en la Figura 11, se presentan puentes de hidrógeno entre los anillos del inhibidor y la Cys145, Glu166, Met165, His164, Thr25 y Thr26, His41 y Gln189. De igual manera, se muestran los enlaces no polares con los mismos residuos y la Met49 y Pro168. En este complejo, existen también uniones pi-pi con la His41, con la cual también comparte una interacción pi-alkil, además de la Pro168 y la Met165, la que a su vez propicia un enlace pi-sulfuro con el mismo grupo aromático del inhibidor.

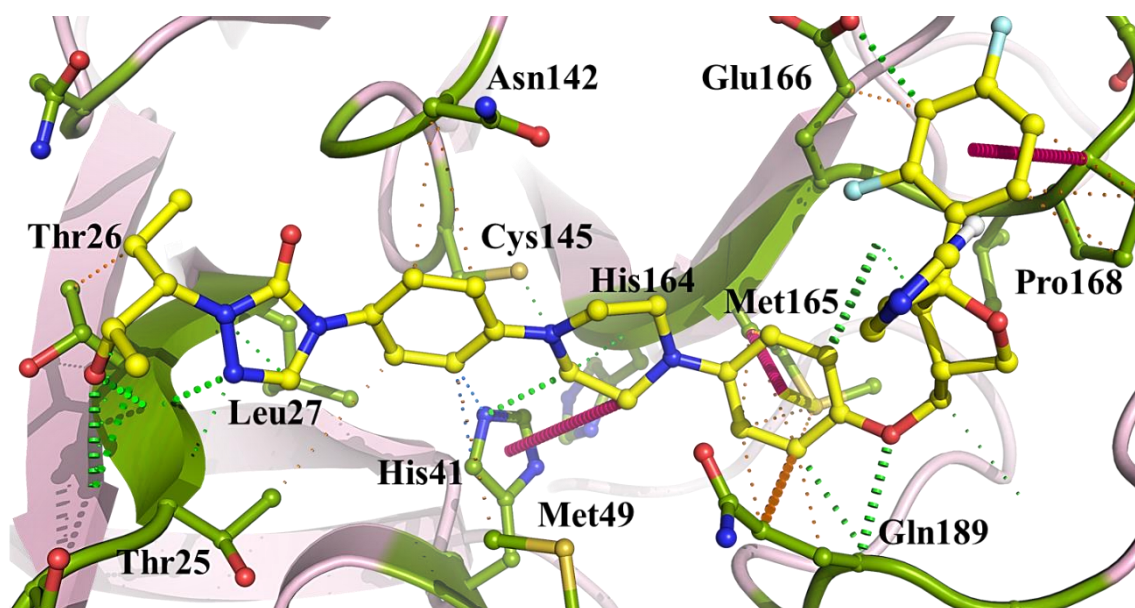


Figura 11. Interacciones entre los residuos de M^{Pro} de SARS-CoV-2 y el inhibidor MMV688774. Se representa mediante cartoon a la proteasa principal en tono rosa y a los residuos que participan en las interacciones en un color verde claro en barras y esferas, el inhibidor MMV688774 en amarillo. Los puentes de hidrógeno se señalan con líneas verdes oscuras, uniendo al compuesto con los aminoácidos Cys145, Glu166, Met165, His164, Thr25, Thr26, His41 y Gln189. Las interacciones hidrofóbicas en naranja con la Thr25, Thr26, Met49, Asn142, Met165, Pro168, Gln189 y Glu166. En azul, las interacciones pi-pi con la His41 y en rosado las pi-alkil con la misma y la Met165 y Pro168. Y en amarillo las pi-sulfuro con la Met165.

Mientras que MMV000025, no interactúa con la Thr25, Thr26, Leu27 y otros más. Pero en su lugar se une mediante un enlace polar y otro no polar a la Ser144, lo mismo ocurre con el Asp187 y la Ala191, además de formar un enlace pi-cación con la His41 (Figura 12). Las interacciones hidrofóbicas surgen entre el ligando y el azufre de la Met49, los residuos Gln189, Ala191, Pro168, Met165, Glu166 y Phe140. Y los puentes de hidrógeno con los aminoácidos His164, Met165, Thr190 e His172.

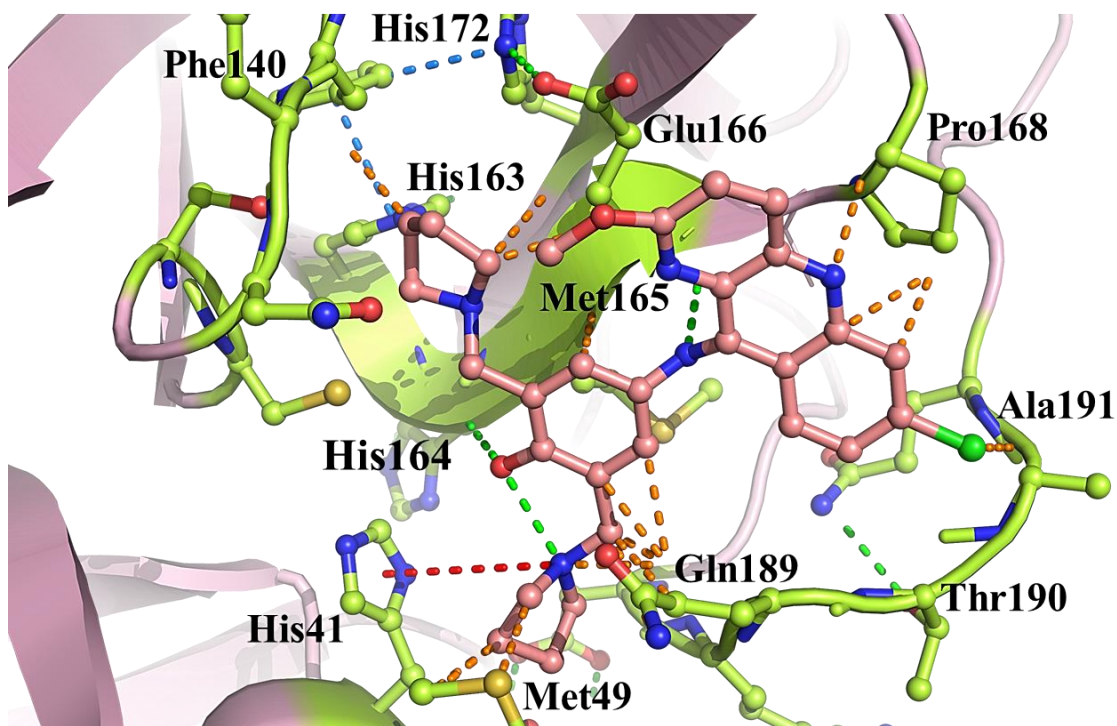


Figura 12. Interacciones entre los residuos de M^{pro} de SARS-CoV-2 y el inhibidor MMV000025. Se representa mediante cartoon a la proteasa principal en tono rosa y a los residuos que participan en las interacciones en un color verde claro en barras y esferas, el inhibidor MMV000025 en rosado. Los puentes de hidrógeno se señalan con líneas verdes oscuras, uniendo al compuesto con los aminoácidos His164, Met165, Thr190 e His172. Las interacciones hidrofóbicas en naranja con los residuos Met49, Gln189, Ala191, Pro168, Met165, Glu166 y Phe140. Y en rojo, el enlace pi-cación con la His41.

De igual manera sucede con los otros siete compuestos analizados, generando enlaces polares, no polares e interacciones pi gracias a la presencia de sus grupos aromáticos. En el Anexo D.2. se muestran todas las interacciones existentes entre los 10 mejores inhibidores encontrados mediante el docking y la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2.

3.2.Verificación de hipótesis

Los estudios realizados utilizando compuestos obtenidos de librerías como COVID Box, PDBeFold y revisión de la literatura, junto con las herramientas bioinformáticas T-Coffee, Boxshade, WinCoot, PyMOL, GOLD - Protein Ligand Docking Software,

Mercury y QtMG, resultaron exitosos, gracias a lo cual se pudo encontrar varios ligandos con afinidad por la proteasa principal del virus causante de COVID-19, por lo que se acepta la hipótesis alternativa: “Los análisis de acoplamiento molecular empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos de animales, permiten determinar nuevos inhibidores de la enzima M^{pro} de SARS-CoV-2” y se rechaza la hipótesis nula.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se analizó la homología estructural entre la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2 y proteasas de virus animales, mediante las herramientas PDBeFold y UniProt, tomando los resultados que presentaron mayor porcentaje de identidad, determinando que la proteasa principal de BtCoV-279 que infecta *Rhinolophus macrotis*, es 96.1% similar en cuanto a su estructura tridimensional y función, además de presentar secuencias altamente homólogas. Así también, se identificó que existen varios alfa, beta, gamma y deltacoronavirus que comparten similitud en cuanto a los aminoácidos de la cadena de la enzima y su plegamiento 3D, con lo que se puede concluir que M^{pro} se encuentra conservada en la mayoría de CoVs.
- Se determinaron los sitios de posible unión de inhibidores de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2, usando los programas WinCoot y PyMOL, en los que se pudieron apreciar las interacciones existentes entre los ligandos y las proteasas de este y otros coronavirus que infectan a animales. Con esto se logró identificar aquellos residuos que participan en la mayoría de los enlaces y que por lo tanto corresponden al sitio drogable de SARS-CoV-2 M^{pro}, estos aminoácidos son: His41, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Asp187, Arg188, Gln189.
- Se generó una librería de compuestos para experimentos de acoplamiento molecular, tomando ligandos del análisis de homología en PDBeFold y de revisión bibliográfica, en donde, se mostraban inhibidores que han sido estudiados en enfermedades causadas por CoVs, tanto en humanos, como en animales, algunos de los cuales ya habían sido probados en M^{pro} de SARS-CoV-2, mostrando un alto nivel de eficiencia. Tal es el caso de N3, carmofur, 11a, 11b y GC376, que presentan una alta actividad inhibitoria en las enzimas de algunos coronavirus. Además, se recolectaron moléculas de la librería COVID Box, que se encuentran en experimentación o ya han sido aprobadas para su empleo farmacológico, cuya estructura es apropiada para actuar en M^{pro}.

- Se determinaron los mejores inhibidores de la proteasa M^{PRO} mediante el análisis de las propiedades de su unión con la enzima, identificando que, en su mayoría, los compuestos de COVID Box son lo que se unen más adecuadamente a la enzima, algunos de los cuales ya han sido probados en SARS-CoV-2. De los diez ligandos con mejores puntuaciones de unión, siete fueron de COVID Box, presentando Scores entre 90 y 95, los restantes fueron aquellos empleados como antivirales, como 1A y 2A, usados en HKU4-CoV. Los tres mejores compuestos, MMV637861, MMV688774 y MMV000025, mostraban interacciones con la mayoría de los residuos del sitio activo de la proteasa, generando enlaces hidrofóbicos, polares y uniones pi.

4.2.Recomendaciones

- Se debe realizar análisis *in vitro* de los mejores inhibidores identificados en el presente estudio, puesto que, presentan alta afinidad de unión a la enzima M^{PRO} de SARS-CoV-2. De esta forma se puede determinar si efectivamente son inhibidores de la enzima y se puede calcular las constantes de inhibición de la enzima (K_i).
- Es necesario anticipar estudios relacionados con la inhibición enzimática de M^{PRO} de otros coronavirus, empleando la librería de compuestos generada en el presente proyecto, dado que pueden surgir nuevas enfermedades que pongan en riesgo a la población.
- En caso de realizar estudios con los inhibidores encontrados, tomar en cuenta que algunos presentan modificaciones que cambian su estructura original, lo que hace que se unan de mejor manera a la proteasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, B., Vargas, J., & García, J. (2020). Caracterización patogénica, clínica y diagnóstica de la pandemia por SARS-CoV-2. *Revista Chilena de Infectología*, 37(3), 265–275.
- Amanat, F., & Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity*, 52(4), 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.007>
- Andersen, K., Rambaut, A., Lipkin, W., Holmes, E., & Garry, R. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26(4), 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Anson, B., Chapman, M., Lendy, E., Pshenychnyi, S., D'Aquila, R., Satchell, K., & Mesecar, A. (2020). Broad-spectrum inhibition of coronavirus main and papain-like proteases by HCV drugs. *Research Square*, 1–20.
- Armijos, V., Yeager, J., Muslin, C., & Perez-Castillo, Y. (2020). SARS-CoV-2, an evolutionary perspective of interaction with human ACE2 reveals undiscovered amino acids necessary for complex stability. *Evolutionary Applications*, 2. <https://doi.org/10.1111/eva.12980>
- Auparakkitanon, S., Chapoomram, S., Kuaha, K., Chirachariyavej, T., & Wilairat, P. (2006). Targeting of hematin by the antimalarial pyronaridine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6), 2197–2200. <https://doi.org/10.1128/AAC.00119-06>
- Bharadwaj, S., Eun, K., Dhar, V., & Gu, S. (2020). Computational insights into tetracyclines as inhibitors against SARS-CoV-2 M pro via combinatorial molecular simulation calculations. *Life Sciences*, 257, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118080>
- Bzówka, M., Mitusińska, K., Raczyńska, A., Samol, A., Tuszyński, J., & Góra, A. (2020). Structural and evolutionary analysis indicate that the sars-COV-2 mpro is a challenging target for small-molecule inhibitor design. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093099>

- Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., Ruan, L., Song, B., Cai, Y., Wei, M., Li, X., Xia, J., Chen, N., Xiang, J., Yu, T., Bai, T., Xie, X., Zhang, L., Li, C., ... Wang, C. (2020). A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(19), 1787–1799. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001282>
- Córdoba, A., & Montaña, J. (2020). Cambios genéticos del SARS-CoV-2. *Salutem Scientia Spiritus*, 6(Suppl 1), 88–93.
- Croft, S., Duparc, S., Arbe, S., Craft, J., Shin, C., Fleckenstein, L., Borghini, I., & Rim, H. (2012). Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malaria Journal*, 11(270), 1–28. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-270>
- Cruz, A. (1 de septiembre de 2020). Mapa del coronavirus: expansión en cifras del Covid-19 en el mundo. *El Mundo*. Obtenido de <https://www.elmundo.es/ciencia-y-salud/salud/2020/03/02/5e5cd4ebfc6c83632e8b4644.html>
- Dai, W., Zhang, B., Jiang, X., Su, H., Li, J., Zhao, Y., Xie, X., Jin, Z., Peng, J., Liu, F., Li, C., Li, Y., Bai, F., Wang, H., Cheng, X., Cen, X., Hu, S., Yang, X., Wang, J., ... Liu, H. (2020). Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science*, 368(6497), 1331–1335. <https://doi.org/10.1126/science.abb4489>
- Das, S., Sarmah, S., Lyndem, S., & Singha, A. (2020). An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763201>
- Ellinger, B., Bojkova, D., Zaliani, A., Cinatl, J., Claussen, C., Westhaus, S., Reinshagen, J., Kuzikov, M., Wolf, M., Geisslinger, G., Gribbon, P., & Ciesek, S. (2020). Identification of inhibitors of SARS-CoV-2 in-vitro cellular toxicity in human (Caco-2) cells using a large scale drug repurposing collection. *Nature Research*, 1–19. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-23951/v1>

- Fu, L., Ye, F., Feng, Y., Yu, F., Wang, Q., Wu, Y., Zhao, C., Sun, H., Huang, B., Niu, P., Song, H., Shi, Y., Li, X., Tan, W., Qi, J., & Gao, G. (2020). SARS-CoV-2 by targeting its main protease. *Nature Communications*, *11*(4417), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18233-x>
- Gassen, N., Papies, J., Bajaj, T., Dethloff, F., Emanuel, J., Weckmann, K., Heinz, D., Heinemann, N., Lennarz, M., Richter, A., Niemeyer, D., Corman, V., Giavalisco, P., Drosten, C., & Müller, M. (2013). Analysis of SARS-CoV-2-controlled autophagy reveals spermidine, MK-2206, and niclosamide as putative antiviral therapeutics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9), 1689–1699.
- Gc, P. I. (n.d.). *Structural Basis for Inhibiting Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication with the 3C-Like*.
- Gentile, D., Patamia, V., Scala, A., Sciortino, M., Piperno, A., & Rescifina, A. (2020). Putative inhibitors of SARS-COV-2 main protease from a library of marine natural products: A virtual screening and molecular modeling study. *Marine Drugs*, *18*(225), 1–19. <https://doi.org/10.3390/md18040225>
- Giordano, G., Blanchini, F., Bruno, R., Colaneri, P., DI Filippo, A., Di Matteo, A., & Colaneri, M. (2020). Modelling the COVID-19 epidemic and implementation of population-wide interventions in Italy. *Nature Medicine*.
- Greenberg, R., Mullane, K., Van Burik, J., Raad, I., Abzug, M., Anstead, G., Herbrecht, R., Langston, A., Marr, K., Schiller, G., Schuster, M., Wingard, J., Gonzalez, C., Revankar, S., Corcoran, G., Kryscio, R., & Hare, R. (2006). Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(1), 126–133. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.126-133.2006>
- Hsu, A., Granneman, R., & Bertz, R. (1998). Ritonavir: Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents. *Clinical Pharmacokinetics*, *35*(4), 275–291. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed4&NEWS=N&AN=1998363177>

- Hung, I., Lung, K., Tso, E., Liu, R., Chung, T., Chu, M., Ng, Y., Lo, J., Chan, J., Tam, A., Shum, H., Chan, V., Wu, A., Sin, K., Leung, W., Law, W., Lung, D., Sin, S., Yeung, P., ... Yuen, K. (2020). Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir–ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet*, 395(10238), 1695–1704. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31042-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31042-4)
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., ... Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811), 1–28. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
- Jin, Z., Zhao, Y., Sun, Y., Zhang, B., Wang, H., Wu, Y., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Du, X., Duan, Y., Yu, J., Yang, X., Yang, X., Yang, K., Liu, X., Guddat, L., Xiao, G., Zhang, L., ... Rao, Z. (2020). Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(6), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0440-6>
- John, S., Tomar, S., Stauffer, S., & Mesecar, A. (2015). Targeting zoonotic viruses : Structure-based inhibition of the 3C-like protease from bat coronavirus HKU4 — The likely reservoir host to the human coronavirus that causes Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17), 6036–6048. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.039>
- Joshi, R., Jagdale, S., Bansode, S., Shankar, S., Tellis, M., Pandya, V., Chugh, A., Giri, A., & Kulkarni, M. (2020). Discovery of potential multi-target-directed ligands by targeting host-specific SARS-CoV-2 structurally conserved main protease. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1760137>
- Jubb, H., Higuero, A., Ochoa, B., Pitt, W., Ascher, D., & Blundell, T. (2017). Arpeggio: A Web Server for Calculating and Visualising Interatomic Interactions in Protein Structures. *Journal of Molecular Biology*, 429(3), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.004>

- Korb, O., Stützel, T., & Exner, T. E. (2009). Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *49*(1), 84–96. <https://doi.org/10.1021/ci800298z>
- Lárez, C., & Rojas, M. (2020). Los quitosanos y la lucha contra los coronavirus. *Avances En Química*, *15*(1), 23–34.
- Ma, C., Hu, Y., Townsend, J., Lagarias, P., Marty, M., Kolocouris, A., & Wang, J. (2020). Ebselen, Disulfiram, Carmofur, PX-12, Tideglusib, and Shikonin Are Nonspecific Promiscuous SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 1–13. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00130>
- Madjid, M., Safavi-Naeini, P., Solomon, S., & Vardeny, O. (2020). Potential Effects of Coronaviruses on the Cardiovascular System. *JAMA Cardiology*, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.1286>
- Mohamed, K., Yazdanpanah, N., Saghadzadeh, A., & Rezaei, N. (2020). Computational Drug Discovery and Repurposing for the Treatment of COVID-19: A Systematic Review. *SSRN Electronic Journal*, 1–42. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3583748>
- Muralidharan, N., Sakthivel, R., Velmurugan, D., & Gromiha, M. (2020). Computational studies of drug repurposing and synergism of lopinavir, oseltamivir and ritonavir binding with SARS-CoV-2 protease against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–14. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1752802>
- Nagappan, V., & Deresinski, S. (2007). Posaconazole: A broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(12), 1610–1617. <https://doi.org/10.1086/523576>
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*, *11*(1620). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>

- Pastrian, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International Journal of Odontostomatology*, 14(3), 331–337. <https://doi.org/10.4067/s0718-381x2020000300331>
- Piña, P., Monroy, A., Montesinos, J., Gutiérrez, M., Vadillo, E., Chávez, A., Ruiz, M., López, R., Salcedo, M., Avilés, A., & Mayani, H. (2020). Biología del SARS-CoV-2: hacia el entendimiento y tratamiento de COVID-19. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 58, 1–19.
- Quito suma 21 739 casos de covid-19 este 1 de septiembre; se registran 114 309 contagios en Ecuador. (1 de septiembre de 2020). *El Comercio*. Obtenido de https://www.elcomercio.com/app_public.php/actualidad/quito-contagios-coronavirus-septiembre-ecuador.html
- Ray, A. K., Gupta, P. S. Sen, Panda, S. K., Biswal, S., & Rana, M. K. (2020). Repurposing of FDA Approved Drugs for the Identification of Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Main Protease. *Indian Institute of Science Education and Research (IISER)*, 1–15. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12278066>
- Riva, L., Yuan, S., Yin, X., Martin, L., Matsunaga, N., Burgstaller, S., Pache, L., De Jesus, P., Hull, M., Chang, M., Chan, J., Cao, J., Poon, V., Herbert, K., Nguyen, T., Pu, Y., Nguyen, C., Rubanov, A., Martinez, L., ... Chanda, S. (2020). A Large-scale Drug Repositioning Survey for SARS-CoV-2 Antivirals. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*, 1–43. <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.044016>
- Rodríguez, F. (2011). *Estructura y propiedades de aminoácidos y péptidos*. Obtenido de https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52159154/aminoacidos.pdf?1489553209=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DESTRUCTURA_Y_PROPIEDADES_DE_AMINOACIDOS.pdf&Expires=1606155212&Signature=QeOL5PUCO1FDJ2mKYXkzmJQq1xXpj0q-uMjKliHV4Y44lhogmIhbbuGyY

- Shamsi, A., Mohammad, T., Anwar, S., AlAjmi, M., Hussain, A., Tabish, R., Islam, A., & Imtaiyaz, H. (2020). Glecaprevir and Maraviroc are high-affinity inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: Possible implication in COVID-19 therapy. *Bioscience Reports*, *40*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1042/BSR20201256>
- Świderek, K., & Moliner, V. (2020). Revealing the molecular mechanisms of proteolysis of SARS-CoV-2 M pro by QM/MM computational methods. *Chemical Science*. <https://doi.org/10.1039/d0sc02823a>
- Tahir, M., Alqahtani, S., Alamri, M., & Chen, L. (2020). Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>
- Tillett, R., Sevinsky, J., Hartley, P., Kerwin, H., Crawford, N., Gorzalski, A., Laverdure, C., Verma, S., Rossetto, C., Jackson, D., Farrell, M., Van Hooser, S., & Pandori, M. (2020). Genomic Evidence for a Case of Reinfection with SARS-CoV-2. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3680955>
- To, K., Hung, I., Ip, J., Chu, A., Chan, W., Tam, A., Fong, C., Yuan, S., Tsoi, H., Ng, A., Lee, L., Wan, P., Tso, E., To, W., Tsang, D., Chan, K., Huang, J., Kok, K., Cheng, V., & Yuen, K. (2020). COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 1–25.
- Ullrich, S., & Nitsche, C. (2020). The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *30*(17), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>
- Vuong, W., Khan, M. B., Fischer, C., Arutyunova, E., Lamer, T., Shields, J., Saffran, H. A., McKay, R. T., Belkum, M. J. Van, Joyce, M., Young, H. S., Tyrrell, D. L., Vederas, J. C., & Lemieux, M. J. (2020). *replication*.
- Walls, A., Park, Y., Tortorici, M., Wall, A., McGuire, A., & Veerler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *180*, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>

- Wang, F., Chen, C., Liu, X., Yang, K., Xu, X., & Yang, H. (2016). Crystal Structure of Feline Infectious Peritonitis Virus Main Protease in Complex with Synergetic Dual Inhibitors. *Journal of Virology*, *90*(4), 1910–1917. <https://doi.org/10.1128/JVI.02685-15>. Editor
- World Health Organization (WHO). (2020). Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). In *The WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019*. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
- Yang, H., Xie, W., Xue, X., Yang, K., Ma, J., Liang, W., Zhao, Q., Zhou, Z., Pei, D., Ziebuhr, J., Hilgenfeld, R., Yuen, K. Y., Wong, L., Gao, G., Chen, S., Chen, Z., Ma, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Design of Wide-Spectrum Inhibitors Targeting Coronavirus Main Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(10), 3103–3108. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030324>
- Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. *Science*, *368*(6489), 409–412. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
- Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology*, *30*(7), 1346–1351. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022>
- Zhou, H., Chen, X., Hu, T., Li, J., Song, H., Liu, Y., Wang, P., Liu, D., Yang, J., Holmes, E., Hughes, A., Bi, Y., & Shi, W. (2020). A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current Biology*, *30*(19), 2196–2203. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.030>

ANEXOS

Anexo A. Análisis de homología de la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2 mediante la herramienta PDBeFold

Anexo A.1. Resultados obtenidos en el análisis de homología de M^{pro} de SARS-CoV-2 y proteasas de virus animales en PDBeFold

SIMILITUDES EN VIRUS ANIMALES																	
##	Q-Score	P-score	E-score	RMSD	Nalgn	Nsse	Ngaps	Seq-%	Nmd	Nres-Q	Nsse-Q	Nres-T	Nsse-T	Query	Target	Título	
75	0.9868	62.61	23.93	0.348	306	21	0	1	0	306	22	306	21	PDB 6yb7:A	PDB 6wtm:B	DROGA DE CORONAVIRUS FELINO INHIBE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL SARS-COV-2 Y BLOQUEA LA REPLICACIÓN DEL VIRUS	
83	0.9832	62.72	23.84	0.392	306	22	0	1	0	306	22	306	22	PDB 6yb7:A	PDB 6wtm:A	DROGA DE CORONAVIRUS FELINO INHIBE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL SARS-COV-2 Y BLOQUEA LA REPLICACIÓN DEL VIRUS	
112	0.9705	53.28	21.98	0.462	305	21	0	1	0	306	22	306	22	PDB 6yb7:A	PDB 6wtk:A	DROGAS DE CORONAVIRUS FELINO INHIBE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL SARS-COV-2 Y BLOQUEA LA REPLICACIÓN DEL VIRUS	
135	0.9639	52.86	21.98	0.581	306	21	0	1	0	306	22	306	22	PDB 6yb7:A	PDB 6wtj:A	DROGA DE CORONAVIRUS FELINO INHIBE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL SARS-COV-2 Y BLOQUEA LA REPLICACIÓN DEL VIRUS	
298	0.8378	37.41	18.47	1.149	296	20	4	0.4527	0	306	22	298	20	PDB 6yb7:A	PDB 4zuh:A	ESTRUCTURA COMPLEJA DEL MUTANTE PEDV 3CLPRO (C144A) CON UN SUSTRATO PEPTÍDICO (VIRUS DE LA DIARREA PORCINA)	
299	0.8371	34.66	17.98	1.153	296	19	3	0.4527	0	306	22	298	19	PDB 6yb7:A	PDB 4xfq:A	BASE DE ESTRUCTURA DE CRISTAL PARA PEDV 3C COMO PROTEASA (VIRUS DE LA DIARREA PORCINA)	
300	0.8296	36.4	18.22	1.179	296	20	4	0.4561	0	306	22	299	20	PDB 6yb7:A	PDB 6l70:A	ESTRUCTURA COMPLEJA DE PEDV 3CLPRO CON GC376	
301	0.8293	36.96	18.36	1.134	291	20	4	0.457	0	306	22	292	20	PDB 6yb7:A	PDB 5zqg:A	ESTRUCTURA COMPLEJA DEL MUTANTE PEDV 3CLPRO (C144A) CON SUSTRATO DE PEPTITA NEMO-231	
314	0.8118	36.4	18.22	1.257	293	20	4	0.4573	0	306	22	294	20	PDB 6yb7:A	PDB 4xfq:B	BASE DE ESTRUCTURA DE CRISTAL PARA PROTEASA PEDV 3C	
316	0.8091	36.29	18.19	1.271	293	20	4	0.4539	0	306	22	294	20	PDB 6yb7:A	PDB 4zuh:B	ESTRUCTURA COMPLEJA DEL PEDV 3CLPRO MUTANT (C144A) CON UN SUSTRATO DE PEPTIDO.	
318	0.8068	27.69	16.08	1.325	296	18	3	0.5068	0	306	22	297	18	PDB 6yb7:A	PDB 6jij:A	ESTRUCTURA DE CRISTAL DE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL VIRUS DE HEPATITIS DE RATÓN A59 EN COMPLEJO CON UN INHIBIDOR	
320	0.8055	35.75	18.06	1.289	293	20	4	0.4539	0	306	22	294	20	PDB 6yb7:A	PDB 5zqg:B	ESTRUCTURA COMPLEJA DEL MUTANTE PEDV 3CLPRO (C144A) CON SUSTRATO DE PEPTITA NEMO-231	
327	0.8012	34.57	17.76	1.325	296	20	5	0.4561	0	306	22	299	20	PDB 6yb7:A	PDB 6l70:B	ESTRUCTURA COMPLEJA DE PEDV 3CLPRO CON GC376	
338	0.7912	29.78	16.56	1.348	294	19	5	0.5102	0	306	22	297	20	PDB 6yb7:A	PDB 6jij:B	LA ESTRUCTURA DE CRISTAL DE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL VIRUS DE HEPATITIS DE RATÓN A59 EN COMPLEJO CON UN INHIBIDOR	
339	0.7894	33.85	17.57	1.385	297	20	3	0.4512	0	306	22	301	20	PDB 6yb7:A	PDB 5hyo:A	ESTRUCTURA DE RAYOS X DE VIRUS EPIDÉMICO PORCINO SIN LÍMITE 3CLPRO	

346	0.7828	24.16	15.1	1.351	293	17	5	0.5051	0	306	22	298	18	PDB 6yb7:A	PDB 6jij:C	LA ESTRUCTURA DE CRISTAL DE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL VIRUS DE HEPATITIS DE RATÓN A59 EN COMPLEJO CON UN INHIBIDOR
349	0.7818	32.88	17.52	1.370	295	19	5	0.4576	0	306	22	301	19	PDB 6yb7:A	PDB 5hyo:B	ESTRUCTURA DE RAYOS X DE VIRUS EPIDÉMICO PORCINO SIN LÍMITE 3CLPRO
367	0.7419	26.63	15.78	1.569	294	18	6	0.4558	0	306	22	299	18	PDB 6yb7:A	PDB 4zro:A	ESTRUCTURA DE RAYOS X DE FIPV-3CLPRO FELINO UNIDA AL INHIBIDOR COVALENTE
371	0.7339	23.59	15.39	1.533	291	18	6	0.4433	0	306	22	299	20	PDB 6yb7:A	PDB 2amp:B	ESTRUCTURA DE CRISTAL DE VIRUS MPRO GASTROENTERITIS PORCINO TRANSMISIBLE EN COMPLEJO CON UN INHIBIDOR N1
380	0.7044	26.3	15.51	1.705	292	19	6	0.4486	0	306	22	299	20	PDB 6yb7:A	PDB 2amp:A	ESTRUCTURA CRISTALINA DEL VIRUS DE LA GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE PORCINA MPRO EN COMPLEJO CON UN INHIBIDOR N1
381	0.7031	28.03	16.01	1.735	293	20	6	0.4573	0	306	22	299	20	PDB 6yb7:A	PDB 5gwz:B	ESTRUCTURA DE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL VIRUS EPIDEMICO PORCINO DE LA DIARREA EN COMPLEJO CON UN INHIBIDOR
382	0.6919	21.57	14.47	1.779	293	17	6	0.4437	0	306	22	300	17	PDB 6yb7:A	PDB 1lvo:B	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINO REVELA LA COMBINACIÓN DE UN PLEGAMIENTO DE QUIMOTRPSINA CON UN DOMINIO ALFA- HELICO
383	0.6914	20.3	14.08	1.758	292	17	8	0.4452	0	306	22	300	17	PDB 6yb7:A	PDB 1p9u:C	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS (3CLPRO)PORCINO: BASE PARA EL DISEÑO DE DROGAS ANTI-SARS
384	0.6886	27.58	15.89	1.688	288	20	7	0.4479	0	306	22	299	20	PDB 6yb7:A	PDB 5gwz:A	ESTRUCTURA DE LA PROTEASA PRINCIPAL DEL VIRUS EPIDEMICO PORCINO DE LA DIARREA EN COMPLEJO CON UN INHIBIDOR
385	0.6864	24.74	15.15	1.794	291	19	7	0.4433	0	306	22	297	20	PDB 6yb7:A	PDB 4f49:B	ESTRUCTURA DE LA RESOLUCIÓN DE LA PROTEASA DE VIRUS DE GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE QUE CONTIENE UN INHIBIDOR DE DIPEPTIDILO COVALENTEMENTE LIMITADO
386	0.676	27.38	16.03	1.507	282	19	6	0.4291	0	306	22	307	19	PDB 6yb7:A	PDB 2q6d:B	ESTRUCTURA DE CRISTAL DE LA PROTEASA PRINCIPAL DE VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR (IBV)
387	0.6759	22.48	14.65	1.717	287	18	9	0.439	0	306	22	300	19	PDB 6yb7:A	PDB 1lvo:C	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINO REVELA LA COMBINACIÓN DE UN PLEGAMIENTO DE QUIMOTRPSINA CON UN DOMINIO ALFA- HELICO
388	0.6749	20.4	14.08	1.840	292	17	7	0.4315	0	306	22	300	17	PDB 6yb7:A	PDB 1p9u:B	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINO (3CLPRO): DISEÑO DE DROGAS ANTI-SARS
389	0.6735	19.98	13.92	1.835	291	18	8	0.4399	0	306	22	299	19	PDB 6yb7:A	PDB 4f49:D	ESTRUCTURA DE LA RESOLUCIÓN DE LA PROTEASA DE VIRUS DE GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE QUE CONTIENE UN INHIBIDOR DE DIPEPTIDILO COVALENTEMENTE LIMITADO
393	0.6678	24.07	15.17	1.633	280	19	7	0.4179	0	306	22	296	20	PDB 6yb7:A	PDB 2q6d:A	ESTRUCTURA DE CRISTAL DE LA PROTEASA PRINCIPAL DE VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR (IBV)
395	0.6635	21.34	14.4	1.885	291	17	10	0.4467	0	306	22	299	17	PDB 6yb7:A	PDB 4zro:D	ESTRUCTURA DE RAYOS X DE FIPV-3CLPRO VINCULADA AL INHIBIDOR COVALENTE
396	0.6597	21.3	14.03	1.881	290	19	8	0.4345	0	306	22	299	19	PDB 6yb7:A	PDB 4zro:C	ESTRUCTURA DE RAYOS X DE FIPV-3CLPRO VINCULADA AL INHIBIDOR COVALENTE
397	0.6565	18.29	13.44	1.887	290	16	7	0.431	0	306	22	300	17	PDB 6yb7:A	PDB 5eu8:A	ESTRUCTURA DE LA PROTEASA PRINCIPAL FIPV EN COMPLEJO CON INHIBIDORES DOBLES
398	0.6541	21.15	14.15	1.922	291	18	6	0.4467	0	306	22	300	18	PDB 6yb7:A	PDB 4f49:A	ESTRUCTURA DE LA RESOLUCIÓN DE LA PROTEASA DE VIRUS DE GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE QUE CONTIENE UN INHIBIDOR DE DIPEPTIDILO COVALENTEMENTE LIMITADO
399	0.6537	19.14	13.71	1.946	292	17	7	0.4384	0	306	22	300	17	PDB 6yb7:A	PDB 4f49:C	ESTRUCTURA DE LA RESOLUCIÓN DE LA PROTEASA DE VIRUS DE GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE QUE CONTIENE UN INHIBIDOR DE DIPEPTIDILO COVALENTEMENTE LIMITADO
400	0.6536	23.48	14.68	1.912	290	19	10	0.4483	0	306	22	299	19	PDB 6yb7:A	PDB 4zro:B	UNA ESTRUCTURA DE RAYOS X DE FIPV-3CLPRO VINCULADA AL INHIBIDOR COVALENTE

401	0.6506	21.53	14.37	1.811	285	18	11	0.4281	0	306	22	299	19	PDB 6yb7:A	PDB 1lvo:F	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINO REVELA LA COMBINACIÓN DE UN PLEGAMIENTO DE QUIMOTRPSINA CON UN DOMINIO ALFA- HELICO
402	0.6506	20.84	14.15	1.847	287	18	10	0.4286	0	306	22	300	19	PDB 6yb7:A	PDB 1p9u:F	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINA (3CLPRO) : DISEÑO DE DROGAS ANTI-SARS
403	0.6453	20.9	14.18	1.910	289	18	8	0.4325	0	306	22	301	19	PDB 6yb7:A	PDB 1lvo:D	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINO REVELA LA COMBINACIÓN DE UN PLEGAMIENTO DE QUIMOTRPSINA CON UN DOMINIO ALFA- HELICO
404	0.6414	21.53	14.27	1.907	288	18	9	0.4306	0	306	22	301	18	PDB 6yb7:A	PDB 1p9u:D	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINA (3CLPRO) : DISEÑO DE DROGAS ANTI-SARS
405	0.6276	19.65	13.77	1.955	286	18	9	0.4266	0	306	22	299	19	PDB 6yb7:A	PDB 1lvo:A	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINO REVELA LA COMBINACIÓN DE UN PLEGAMIENTO DE QUIMOTRPSINA CON UN DOMINIO ALFA- HELICO
406	0.6199	18.2	13.3	2.040	288	18	9	0.4271	0	306	22	299	19	PDB 6yb7:A	PDB 1p9u:A	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINA (3CLPRO) : DISEÑO DE DROGAS ANTI-SARS
407	0.6069	19.4	13.61	2.086	287	18	11	0.4251	0	306	22	299	18	PDB 6yb7:A	PDB 1p9u:E	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINA (3CLPRO) : DISEÑO DE DROGAS ANTI-SARS
408	0.6051	19.41	13.61	2.051	285	18	11	0.4211	0	306	22	299	18	PDB 6yb7:A	PDB 1lvo:E	ESTRUCTURA DE LA PROTEINASA PRINCIPAL DE CORONAVIRUS PORCINO REVELA LA COMBINACIÓN DE UN PLEGAMIENTO DE QUIMOTRPSINA CON UN DOMINIO ALFA- HELICO

Anexo B. Identificación de los sitios drogables de la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2

Anexo B.1. Interacciones de inhibidores con los residuos de M^{pro} de SARS-CoV-2

Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de SARS-CoV-2 que interactúan con inhibidores																														
	Thr 24	Thr 25	Thr 26	Leu 27	His41	Thr 45	Ser46	Met 49	Pro 52	Tyr 54	Phe 140	Leu 141	Asn 142	Gly 143	Ser144	Cys 145	His163	His164	Met 165	Glu 166	Leu 167	Pro 168	His172	Val 186	Asp 187	Arg 188	Gln 189	Thr 190	Ala 191	Gln 192	
N3			x	x	x			x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x	x	x	x		x	
Carmofur					x			x						x	x	x		x	x							x					
13b			x		x			x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x				
11a					x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x		x	x	x				
11b					x			x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x				
X77		x	x	x	x			x			x	x	x	x		x	x	x	x	x		x			x	x	x				
Boceprevir			x	x	x			x		x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x			x	x	x	x		x	
GC376					x			x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x		x		x	x	x	x	
*δ-Viniferin	x	x	x		x			x			x		x	x	x		x	x	x	x		x	x			x	x	x		x	
*Myricitrin			x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x		x	x	x				
*Lactucopirin 15-oxalate					x			x				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x		x	
*Doxycycline	x	x	x	x	x	x		x				x	x	x	x	x	x		x	x							x				
*Tetracycline		x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x	x								x			
*Demeclocycline		x	x	x	x		x	x				x	x	x	x	x		x	x	x						x	x	x	x		x
*Minocycline		x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x						x	x	x			
*Glecaprevir		x	x	x	x		x	x					x	x		x				x	x	x	x					x			
*Maraviroc		x	x	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x	x								x			

Los compuestos señalados con asterisco (*) no presentan estructura tridimensional obtenida mediante cristalografía de rayos X

Anexo B.2. Interacciones de inhibidores con los residuos de M^{pro} de HKU4-CoV

Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de HKU4-CoV que interactúan con inhibidores																														
	Ser1	Ser24	Met25	Thr26	Leu27	His41	Cys44	Pro45	Ala46	Leu49	Tyr54	Phe143	Leu144	Cys145	Gly146	Ser147	Cys148	His166	Gln167	Met168	Glu169	Leu170	His175	Phe188	Asp190	Lys191	Gln192	Thr193	His194	Gln195	
SG85			X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3B	X		X			X	X		X	X		X	X	X			X	X		X	X					X	X	X			
1A		X	X			X	X		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X					X	X	X			
2A		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X				X	X	X			

Anexo B.3. Interacciones de inhibidores con los residuos de M^{pro} de MHV

Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de MHV que interactúan con inhibidores																		
	Met25	His41	Phe138	Leu139	Cys140	Gly141	Ser142	Cys143	His161	Gln162	Leu163	Glu164	Leu165	His170	Asp185	Gln187	Val188	Val189	
<u>N3</u>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Anexo B.4. Interacciones de inhibidores con los residuos de M^{pro} de PEDV

Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de PEDV que interactúan con inhibidores																									
	Met25	Ala26	Leu27	His41	Thr47	Ile51	Tyr53	Phe139	Ile140	Asn141	Gly142	Ala143	Cys144	His162	Gln163	Leu164	Glu165	Gly167	His171	Asp186	Gln187	Pro188	Thr189	Leu190	Gln191	
GC376				X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X				
N3	X	X	X	X		X		X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Anexo B.5. Interacciones de inhibidores con los residuos de M^{pro} de TGEV

Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de TGEV que interactúan con inhibidores																						
	His41	Thr47	Ile51	Tyr53	Phe139	Ile140	Ala141	Gly142	Thr143	Cys144	His162	His163	Leu164	Glu165	Leu166	Gly167	His171	Asp186	Glu187	Pro188	Ser189	Met190	Gln191
CH2-QLTSNV-Z	x		x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
N1	x	x	x		x	x		x		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
GC376	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x			

Anexo B.6. Interacciones de inhibidores con los residuos de M^{pro} de FIPV

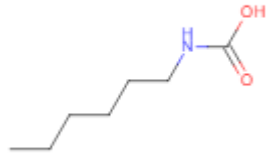
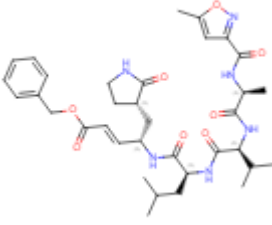
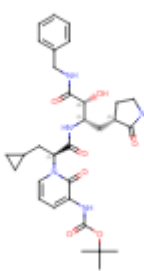
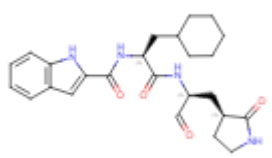
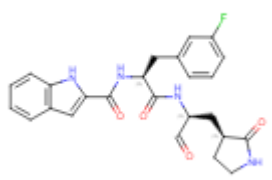
Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de FIPV que interactúan con inhibidores																								
	Asn25	Val26	Leu27	His41	Thr47	Ile51	Tyr53	Phe139	Ile140	Ala141	Gly142	Cys144	His162	His163	Leu164	Glu165	Leu166	Gly167	His171	Asp186	Gln187	Pro188	Ser189	Met190	Gln191
PRD_002174	x			x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
N3	x	x	x	x	x		x	x				x	x	x	x	x		x			x	x	x	x	

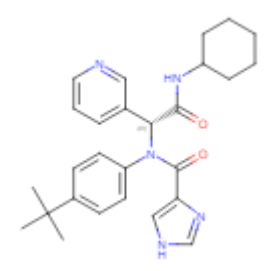
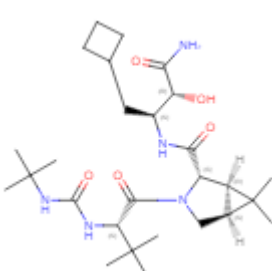
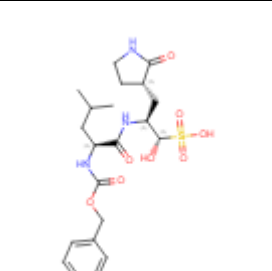
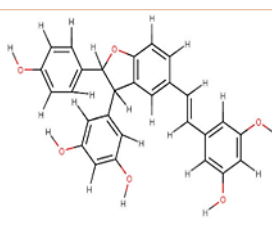
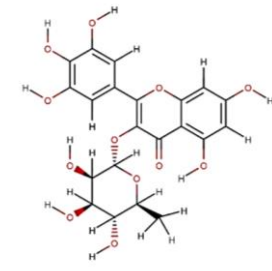
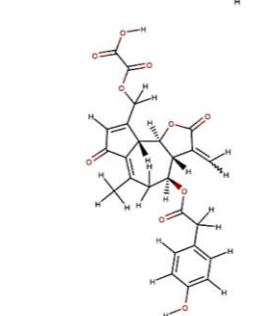
Anexo B.7. Interacciones de inhibidores con los residuos de M^{pro} de IBV

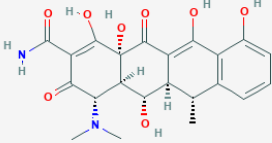
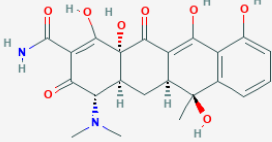
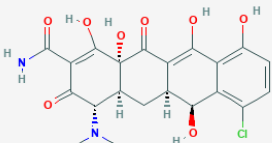
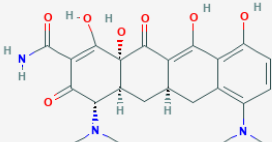
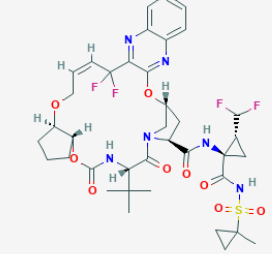
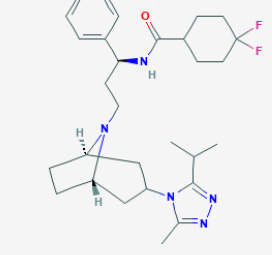
Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de IBV que interactúan con inhibidores																							
	Asn25	Asn26	Leu27	His41	Lys45	Phe138	Leu139	Gly141	Ala142	Cys143	His161	His162	Leu163	Glu164	Leu165	Pro166	His170	Asp185	Glu186	Glu187	Val188	Ala189	Gln190	
N3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

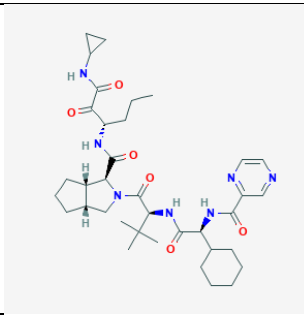
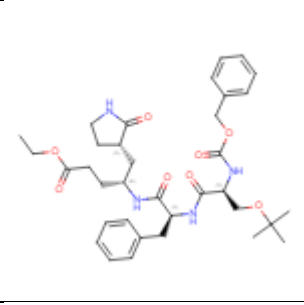
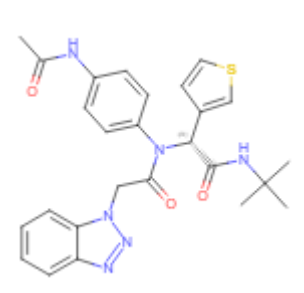
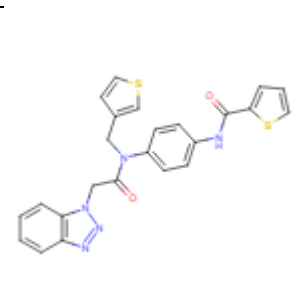
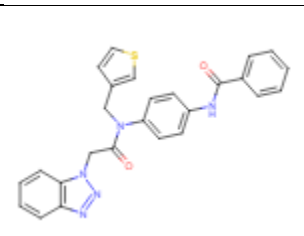
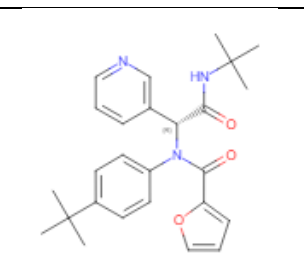
Anexo C. Librería de ligandos generados para realizar el acoplamiento molecular

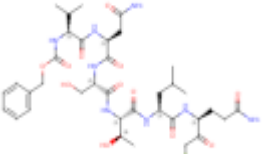
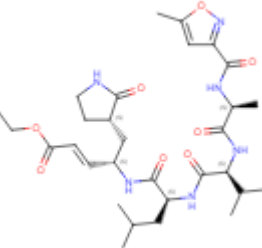
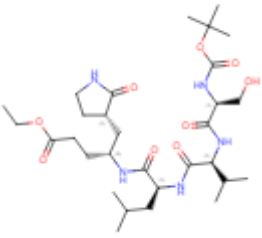
Anexo C.1. Ligandos obtenidos de la página PDB y de revisión de literatura.

Nombre del Ligando	Código de 3 letras	Enlace covalente	Nomenclatura SMILES	Estructura química
Carmofur	CMF	SI	<chem>CCCCCCNC(O)=O</chem>	
N3	N3	SI	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c1cc(C)on1)C(C)C)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)\C=C/C(=O)OCc3ccccc3</chem>	
13b	13B	SI	<chem>CC(C)(C)OC(=O)NC1=CC=CN([C@@H](CC2CC2)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]3CCNC3=O)[C@@H](O)C(=O)NCc4ccccc4)C1=O</chem>	
11a	11A	SI	<chem>O=C[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](CC2CCCCC2)NC(=O)c3[nH]c4ccccc4c3</chem>	
11b	11B	SI	<chem>Fc1cccc(C[C@H](NC(=O)c2[nH]c3ccccc3c2)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]4CCNC4=O)C(=O)c1</chem>	

X77	X77	NO	<chem>CC(C)(C)c1ccc(cc1)N([C@@H](C(=O)NC2CCCCC2)c3ccnc3)C(=O)c4c[nH]cn4</chem>	
Boceprevir	BPV	SI	<chem>CC(C)(C)NC(=O)N[C@H](C(=O)N1C[C@H]2[C@@H]([C@H]1)C(=O)N[C@@H](CC3CCCC3)[C@@H](O)C(N=O)C2(C)C)C(C)(C)C</chem>	
GC376	GC3	SI	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)OCc1cccc1)C(=O)N[C@@H](C[C@@H]2CCNC2=O)[C@@H](O)[S](O)(=O)=O</chem>	
δ-Viniferin	VNF	NO	<chem>C1=CC(=CC=C1C2C(C3=C(O)C=CC(=C3)C=CC4=CC(=CC(=C4)O)O)C5=CC(=CC(=C5)O)O)O</chem>	
Myricitrin	MCT	NO	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2=C(OC3=C(C(=CC(=C3)C2=O)O)O)C4=CC(=C(C(=C4)O)O)O)O)O)O</chem>	
Lactucopicrin 15-oxalate	LCO	NO	<chem>CC1=C2C(C3C(C(C1)OC(=O)CC4=CC=C(C=C4)O)C(=C)C(=O)O3)C(=CC2=O)COC(=O)C(=O)O</chem>	

Doxycycline	DXC	NO	<chem>CC1C2C(C3C(C(=O)C(=C(C3(C(=O)C2=C(C4=C1C=CC=C4O)O)O)O)C(=O)N)N(C)C)O</chem>	
Tetracycline	TTC	NO	<chem>CC1(C2CC3C(C(=O)C(=C(C3(C(=O)C2=C(C4=C1C=CC=C4O)O)O)O)C(=O)N)N(C)C)O</chem>	
Demeclocycline	DCC	NO	<chem>CN(C)C1C2CC3C(C4=C(C=CC(=C4C(=C3C(=O)C2(C(=C(C1=O)C(=O)N)O)O)O)O)Cl)O</chem>	
Minocycline	MNC	NO	<chem>CN(C)C1C2CC3CC4=C(C=CC(=C4C(=C3C(=O)C2(C(=C(C1=O)C(=O)N)O)O)O)O)N(C)C</chem>	
Glecaprevir	GPV	NO	<chem>CC1(CC1)S(=O)(=O)NC(=O)C2(C2C(F)F)NC(=O)C3CC4CN3C(=O)C(NC(=O)OC5CCCC5OCC=CC(C6=NC7=CC=CC=C7N=C6O4)(F)F)C(C)(C)C</chem>	
Maraviroc	MVC	NO	<chem>CC1=NN=C(N1C2CC3CCC(C2)N3CCC(C4=CC=CC=C4)NC(=O)C5CCC(CC5)(F)F)C(C)C</chem>	

*Telaprevir	TPV	NO	<chem>CCCC(C(=O)C(=O)NC1CC1)NC(=O)C2C3CCCC3CN2C(=O)C(C(C)(C)C)NC(=O)C(C4CCCCC4)NC(=O)C5=NC=CN=C5</chem>	
SG85	G85	SI	<chem>CCOC(=O)CC[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](Cc2ccc(cc2)NC(=O)[C@H](COC(C)(C)C)NC(=O)OCc3ccccc3</chem>	
3B	3B	NO	<chem>CC(=O)Nc1ccc(cc1)N([C@@H](C(=O)NC(C)(C)C)c2csc2)C(=O)Cn3nnc4ccccc34</chem>	
1A	1A	NO	<chem>O=C(Cn1nnc2ccccc12)N(Cc3sc3cc3)c4ccc(NC(=O)c5sccc5)cc4</chem>	
2A	2A	NO	<chem>O=C(Cn1nnc2ccccc12)N(Cc3sc3cc3)c4ccc(NC(=O)c5ccccc5)cc4</chem>	
*(R)-16	R16	NO	<chem>CC(C)(C)NC(=O)[C@H](N(C(=O)c1ccc1)c2ccc(cc2)C(C)(C)C)c3ccn3</chem>	

<p>INHIBITOR CH2- QLTSNV-Z</p>	<p>CQZ</p>	<p>SI</p>	<chem>CC(C)C[C@H](NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](CO)NC(=O)[C@H](CC(N)=O)NC(=O)[C@@H](NC(=O)OCc1ccccc1)C(C)C)[C@@H](C)O)C(=O)N[C@@H](CCC(N)=O)C(=O)CCl</chem>	
<p>N1</p>	<p>N1</p>	<p>SI</p>	<chem>CCOC(=O)/C=C/[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](C)NC(=O)c2cc(C)on2)C(C)C</chem>	
<p>N-(tert-butoxycarbonyl)-L-seryl-L-valyl-N-{(2S)-5-ethoxy-5-oxo-1-[(3S)-2-oxopyrrolidin-3-yl]pentan-2-yl}-L-leucinamide</p>	<p>BOL</p>	<p>SI</p>	<chem>CCOC(=O)CC[C@H](C[C@@H]1CCNC1=O)NC(=O)[C@H](CC(C)C)NC(=O)[C@@H](NC(=O)[C@H](CO)NC(=O)OC(C)(C)C)C(C)C</chem>	

Anexo D. Análisis de acoplamiento molecular entre la enzima M^{pro} y los ligandos
obtenidos de las librerías

Anexo D.1. Resultados del docking entre los inhibidores determinados y la proteasa
principal M^{pro} de SARS-CoV-2.

Nº	Ligando	Score	S(PLP)	S(hbond)	S(cho)	DE(clash)	DE(tors)	S(protein)	intcor
1	MMV637861	95.64	-98.71	0.00	0.75	0.00	4.20	1.52	3.80
2	MMV688774	95.17	-89.23	1.86	1.00	0.00	2.39	0.00	1.36
3	MMV000025	91.86	-91.15	1.69	0.00	0.00	1.95	1.51	1.06
4	MMV1804180	91.64	-82.85	3.93	0.00	0.00	2.55	0.00	2.07
5	MMV003162	91.21	-90.33	1.21	0.00	0.00	0.66	1.55	0.10
6	MMV637528	91.02	-89.46	1.00	0.90	0.04	1.94	1.51	1.31
7	VNF	90.33	-83.98	3.00	0.00	0.00	1.04	1.29	0.71
8	MMV690727	90.07	-80.64	4.22	0.00	0.00	2.15	2.46	3.53
9	1A	89.39	-86.68	1.00	1.00	0.00	1.72	1.43	1.58
10	2A	89.23	-87.74	0.67	0.84	0.16	1.83	1.43	2.23
11	MMV001829	88.33	-87.30	1.00	0.00	0.07	0.48	1.14	0.20
12	MMV659028	88.31	-93.58	0.00	0.00	0.00	3.49	2.50	3.76
13	MMV1804244	87.57	-88.99	0.94	0.00	0.00	1.97	1.50	0.97
14	MMV637677	87.39	-81.99	2.82	0.00	0.00	3.18	0.00	1.56
15	MMV000012	87.08	-87.93	1.00	0.00	0.00	2.37	0.00	0.89
16	MMV1804187	86.84	-89.71	0.00	0.00	0.00	0.76	1.48	0.14
17	MVC	86.44	-89.41	0.00	0.00	0.00	1.65	1.36	1.17
18	MMV1804186	85.98	-88.74	0.00	0.00	1.00	2.62	1.14	4.42
19	X77	85.33	-83.28	0.00	1.98	0.00	2.52	2.67	1
20	MMV1803859	85.02	-84.05	2.00	0.00	0.00	2.25	2.81	3
21	3B	84.89	-83.02	1.00	2.00	0.00	3.15	3.36	2.53

22	TTC	82.08	-72.60	4.40	0.00	0.00	1.33	1.31	0.26
23	MMV001860	82.05	-90.47	0.00	0.00	0.00	3.76	3.14	2.25
24	MMV637572_	81.09	-79.38	0.98	0.00	0.00	3.41	0.00	2.73
25	MMV009948	81.09	-76.09	0.00	2.95	0.00	2.48	0.00	0.98
26	MMV1804189	80.86	-78.47	1.00	0.99	0.00	2.14	0.00	0.69
27	GPV	80.78	-84.89	0.00	0.00	0.00	3.27	2.36	4.75
28	16R	80.74	-76.41	1.00	1.99	0.00	2.92	1.52	2.73
29	MMV1804227	80.51	-81.62	0.00	1.00	0.00	2.19	2.62	2.89
30	MMV1804226	80.45	-82.83	1.00	0.00	26.70	3.70	1.44	26.05
31	MMV001992	80.38	-77.41	1.98	0.00	1.16	1.80	1.12	2.62
32	MMV688731	79.32	-84.08	0.00	0.00	0.00	1.67	2.55	1.12
33	MMV003140	79.22	-78.05	0.00	1.48	0.00	1.76	1.39	1.63
34	MMV672931	79.00	-85.27	2.90	0.00	0.00	3.84	7.48	0.19
35	MMV1804194	78.92	-79.11	1.00	0.00	0.03	2.25	1.12	0.96
36	MMV1580187	78.61	-77.66	1.00	0.00	0.00	0.60	1.17	0.27
37	LCO	78.61	-72.18	2.97	0.00	0.00	1.42	0.00	0.33
38	TPV	77.98	-68.94	2.66	1.00	0.00	2.42	0.00	2.92
39	MMV1804175	76.88	-79.20	0.00	0.00	0.00	1.18	1.35	0.92
40	MMV1804177	76.82	-75.98	0.88	0.00	0.00	1.03	0.00	0.27
41	MMV1804191	76.81	-63.76	4.67	0.00	0.00	0.71	0.00	0.47
42	MMV1804243	76.61	-73.54	0.00	2.00	0.01	0.93	1.56	0.46
43	DCC	76.50	-71.33	2.66	0.00	0.00	1.06	1.39	0.71
44	MMV002832	75.97	-72.93	2.00	0.00	0.00	1.70	0.00	0.36
45	MMV637533	75.95	-76.56	0.00	0.94	0.00	0.74	2.46	0.37
46	MMV1804174	75.82	-74.54	1.00	0.00	0.00	1.71	0.00	1.69
47	MMV000001	75.76	-76.18	1.00	0.00	0.00	1.41	1.53	0.93

48	MMV1804192	75.55	-77.72	0.00	0.90	0.07	3.05	2.63	3.93
49	MMV002398	75.07	-76.87	1.00	0.00	2.40	2.32	1.49	3.55
50	MMV1804249	75.05	-72.88	0.40	0.99	0.00	0.63	1.32	0.58
51	MMV010288	74.98	-79.02	0.00	0.00	0.00	1.38	3.34	2.07
52	MMV000013	74.98	-73.93	1.00	1.82	0.00	1.75	4.17	0.26
53	MMV001635	74.46	-73.03	1.22	0.00	0.00	1.28	0.00	0.20
54	MMV1804173	74.93	-76.96	0.77	0.00	0.00	0.76	2.96	0.11
55	MMV1804178	74.20	-69.92	1.36	1.00	0.00	0.85	1.31	0.12
56	MMV1804248	74.10	-69.18	1.00	0.96	0.00	2.71	0.00	4.43
57	MMV000029	72.93	-69.27	2.25	35	0.00	1.41	4.42	0.04
58	MMV659065	72.69	-68.67	0.99	1.69	0.00	0.91	2.80	0.59
59	MMV1634362	72.40	-65.92	1.92	1.34	0.00	1.26	1.49	0.72
60	MMV1804176	72.22	-69.20	1.57	0.00	0.00	0.31	1.20	0.12
61	MMV1580492	72.02	-67.86	2.00	0.00	0.00	1.22	0.00	0.61
62	MMV1804225	71.86	-70.42	0.99	0.00	0.00	0.77	0.00	0.01
63	MMV690777	71.60	-73.89	0.46	0.00	0.00	2.03	1.34	1.66
64	MMV658920	71.50	-73.50	0.00	0.00	0.00	0.71	1.42	0.85
65	MCT	71.33	-60.45	4.72	0.00	0.00	2.46	0.42	7.645
66	MMV1804190	71.30	-74.56	0.00	0.00	0.00	0.35	2.67	0.12
67	MMV001977	70.98	-73.65	0.00	0.00	0.00	1.42	0.00	0.16
68	MMV690621	70.76	-69.83	0.00	0.98	0.00	0.34	1.35	0.03
69	MMV002295	70.66	-72.26	0.85	0.00	0.00	3.18	2.64	4.57
70	MMV1804242	70.56	-63.76	4.27	0.00	0.00	1.44	3.42	0.28
71	MMV002813	70.50	-69.44	1.00	0.00	0.21	1.25	1.39	2.15
72	MMV1804179	70.48	-68.93	1.00	1.00	0.00	2.03	1.23	0.82
73	MMV002092	70.11	-70.09	0.75	0.00	0.00	0.46	1.36	0.01

74	MNC	69.77	-61.19	3.50	0.00	0.00	0.87	1.12	0.93
75	MMV852425	69.26	-72.31	0.00	0.00	0.91	1.55	1.53	2.44
76	MMV001871	68.46	-67.14	1.00	0.00	0.00	0.16	1.39	0.02
77	MMV003277	67.79	-71.01	0.00	0.00	0.00	0.52	2.61	0.44
78	MMV002229	67.68	-67.94	0.00	0.47	0.00	0.45	1.41	0.64
79	MMV000011	67.08	-57.53	3.22	0.00	0.00	0.32	0.00	0.53
80	MMV1804185	66.31	-66.38	0.17	0.00	2.98	0.94	0.00	4.28
81	MMV010306	66.02	-64.16	1.81	0.00	0.00	1.75	1.12	0.88
82	MMV1804184	65.95	-62.34	1.95	0.00	0.00	0.73	1.20	0.42
83	MMV1804113	65.78	-67.28	0.00	0.00	0.00	0.59	1.47	1.11
84	MMV002798	64.82	-65.96	0.00	0.00	0.73	1.04	0.00	1.66
85	MMV637496	63.13	-61.73	1.00	0.00	0.00	0.06	1.53	0.06
86	DXC	61.18	-56.02	2.10	0.00	0.00	0.51	1.05	0.90
87	MMV003461	56.20	-55.82	0.35	0.00	0.00	0.48	0.00	0.30
88	MMV1804183	51.94	-47.90	1.91	0.00	0.00	0.25	1.20	0.01
89	MMV688991	51.39	-48.05	1.49	0.00	0.00	0.73	0.00	0.29
90	MMV001439	47.55	-34.28	4.89	0.00	0.00	0.73	0.00	0.06
91	MMV003305	47.11	-44.77	1.00	0.00	0.00	0.34	0.00	0.01
92	MMV002086	44.26	-41.27	1.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.33
93	MMV688370	38.34	-23.52	2.98	1.99	0.00	0.09	0.00	0.08
94	MMV662539	32.91	-29.86	1.38	0.09	0.00	0.00	1.37	0.00

Anexo D.2. Interacciones entre los mejores inhibidores determinados mediante docking y la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2.

Inhibidores	Aminoácidos de M ^{pro} de SARS-CoV-2 que interactúan con los mejores inhibidores																													
	Thr 24	Thr 25	Thr 26	Leu 27	His4 1	Cys 44	Thr 45	Ser4 6	Met 49	Pro 52	Tyr 54	Asn 119	Phe 140	Leu 141	Asn 142	Gly 143	Ser1 44	Cys 145	His1 63	His1 64	Met 165	Glu 166	Leu 167	Pro 168	Asp 187	Arg 188	Gln 189	Thr 190	Ala 191	Gln 192
MMV637861		x	x	x	x			x	x		x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x			
MMV688774	x	x	x	x	x				x			x			x	x		x		x	x	x	x	x		x	x	x		
MMV000025					x				x		x		x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	
MMV1804180		x	x	x	x			x	x						x	x		x			x	x	x	x	x	x	x	x		x
MMV003162					x				x		x		x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	
MMV637528		x	x	x	x	x	x	x	x					x	x	x	x	x		x	x	x		x			x	x	x	x
VNF					x		x						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		
MMV690727			x		x	x			x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x				x	x			
1A		x	x	x	x				x		x			x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			
2A		x	x	x	x				x		x			x	x	x	x					x	x	x	x	x	x			