

Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo



Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas
Área temática Microbiología Celular y Genética Molecular

TESIS

“ANÁLISIS POR DINÁMICA MOLECULAR ATOMÍSTICA DE LOS CAMBIOS CONFORMACIONALES DEL SITIO ACTIVO DE LA PROTEASA PRINCIPAL M^{PRO} de SARS- CoV-2, MEDIADOS POR LOS INHIBIDORES ALOSTÉRICOS RS-102895 Y AT7519”

Presenta

IBT. Oriana Carey Manríquez Lúa

Para Obtener el Grado de

Maestría en Ciencias Biológicas

Director de Tesis

Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre

Co-Director de Tesis

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

T [| ^ | ã | Á | & | Q | æ | } | L | æ | [| • | ç | Á | C | E | G |
Á

Análisis por dinámica molecular atomística de los cambios conformacionales del sitio activo de la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2, mediados por los inhibidores alostéricos RS-102895 y AT7519.

ORIANA CAREY MANRIQUEZ LUA

AGOSTO, 2024

Oriana Carey Manríquez Lúa

Análisis por dinámica molecular atomística de los cambios conformacionales del sitio activo de la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2, mediados por los inhibidores alostéricos RS-102895 y AT7519.

Tesis, junio, 2024.

Director de Tesis: Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre.

Codirector de Tesis: Dr. Jose Manuel Pérez Aguilar.

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología Programa de Maestría en Ciencias Biológicas Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria Tarímbaro, Michoacán, México.

Resumen

SARS-CoV-2 es un virus perteneciente a la familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*. Durante el ciclo de replicación de SARS-CoV-2, la proteasa principal *M^{pro}* desempeña una función clave generando un número importante de proteínas no estructurales que participan en la transcripción del genoma viral. Esto significa que la inhibición de *M^{pro}* provocaría la interrupción de la replicación de SARS-CoV2. Esto ha motivado la búsqueda de alternativas diferentes a los inhibidores con afinidad al sitio activo. Una de estas alternativas involucra el descubrimiento de compuestos con afinidad por sitios alostéricos en la estructura de *M^{pro}*, de tal forma que su unión inhiba su actividad al modificar la conformación del sitio activo. Recientemente, se publicó un cribado de estructuras de *M^{pro}* co-cristalizadas con diferentes fármacos, resueltas por difracción de rayos X, donde los autores identificaron compuestos unidos a dos sitios alostéricos, denominados I y II (*Günther et al., 2021*). Observaron que en el sitio alostérico I se unió el compuesto *RS-102895* y en el sitio alostérico II se unió el compuesto *AT7519*. Esto sugiere que la unión de un compuesto a una región diferente al sitio activo podría afectar la actividad catalítica de *M^{pro}*. Este proyecto tiene como objetivo dilucidar la manera en que la interacción de *RS-102895* en el sitio alostérico I y *AT7519* en el sitio alostérico II de *M^{pro}* causan inhibición de la actividad catalítica. Para ello se utilizó un algoritmo llamado "Ohm" el cual es un modelo de red, mediante este se identificaron en ambos sitios alostéricos residuos relevantes los cuales participarían en los cambios conformacionales del sitio activo. Actualmente, en conjunto con los resultados obtenidos del análisis de RMSF se trabajó en dilucidar el mecanismo de inhibición alostérica provocado por la unión de estos inhibidores alostéricos en sitios diferentes al sitio activo de la proteasa *M^{pro}*. Para ello se realizó el análisis de ángulos diedros, nos permitió visualizar los cambios que ocurren en la cadena lateral del residuo His41 el cual forma parte del sitio activo y que también resultó ser importante en las redes de comunicación alostérica identificadas mediante el algoritmo Ohm. Así mismo nos permitió identificar los cambios de orientación de la His41 en presencia de ambos ligantes alostéricos *RS102895* y *AT7519* demostrando que, los cambios rotaméricos de la His41 son más notables con el compuesto *AT7519*.

Palabras clave: Conectividades alostéricas, algoritmo Ohm, RMSD, RMSF, radio de giro.

Abstract

SARS-CoV-2 is a virus belonging to the Coronaviridae family, Betacoronavirus genus. During the SARS-CoV-2 replication cycle, the main protease M^{pro} plays a key role by generating a significant number of non-structural proteins that participate in the transcription of the viral genome. This means that inhibition of M^{pro} would result in disruption of SARS-CoV2 replication. This has motivated the search for alternatives other than inhibitors with affinity to the active site. One of these alternatives involves the discovery of compounds with affinity for allosteric sites in the structure of M^{pro}, in such a way that their binding inhibits its activity by modifying the conformation of the active site. Recently, a screening of M^{pro} structures co-crystallized with different drugs, resolved by X-ray diffraction, was published, where the authors identified compounds bound to two allosteric sites, designated I and II (Günther et al., 2021). They observed that in the allosteric site I the compound RS-102895 was bound and in the allosteric site II the compound AT7519 was bound. This suggests that binding of a compound to a region other than the active site could affect the catalytic activity of M^{pro}. This project aims to elucidate how the interaction of RS-102895 at allosteric site I and AT7519 at allosteric site II of M^{pro} cause inhibition of catalytic activity. For this, an algorithm called “Ohm” was used, which is a network model, through which relevant residues were identified in both allosteric sites which would participate in the conformational changes of the active site. Currently, in conjunction with the results obtained from the RMSF analysis, work was carried out to elucidate the mechanism of allosteric inhibition caused by the binding of these allosteric inhibitors at sites other than the active site of the M^{pro} protease. For this, the analysis of dihedral angles was carried out, it allowed us to visualize the changes that occur in the side chain of the His41 residue which is part of the active site and which also turned out to be important in the allosteric communication networks identified by the Ohm algorithm. Likewise, it allowed us to identify the orientation changes of His41 in the presence of both allosteric binders RS102895 and AT7519, demonstrating that the rotameric changes of His41 are more notable with the compound AT7519.

Keywords: Allosteric connectivity, Ohm algorithm, RMSD, RMSF, radius of gyration.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre por abrirme paso en este campo espectacular de conocimiento. Por su exigencia, gracias a ello fui capaz de comprender los conceptos necesarios para el desarrollo de esta tesis. Gracias por confiar en mí, su conocimiento fue una guía invaluable.

Agradezco al Dr. Jose Manuel Pérez Aguilar ya que, a pesar de la distancia estuvo presente y activo. Siempre recibí una cordial y paciente orientación, pero, sobre todo, gracias por ser el origen de lo que espero sea una larga y exitosa trayectoria en mi vida profesional.

Al CMEB y Dres., miembros de mi comité, así como a todos los profesores que fueron parte de mi formación profesional.

A mis compañeros de maestría, fueron pieza clave para que esta experiencia fuera realmente memorable.

A la UMSNH por brindarme los recursos necesarios para lograr culminar este paso en mi camino profesional.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado durante 24 meses siendo becario con número de CVU: 1186994.

A mis padres y hermanos a los cuales les debo mi formación me han enseñado más de lo que ustedes creen; es un honor ser su hija. Y en especial a mi hijo Jose Alberto eres mi fuerza e inspiración.

A todos, ¡Gracias!

Índice

Contenido

Resumen	3
Abstract.....	4
Agradecimientos.....	5
Índice.....	6
1.Introducción.....	8
2. Marco teórico	9
2.1 Características generales de SARS-CoV-2 y su impacto en la salud	9
2.2 El SARS-CoV-2 y las proteasas.....	11
2.3 Función de la proteasa principal M ^{pro} en la replicación viral	12
2.4 Estructura de la proteasa principal M ^{pro} de SARS-CoV-2	13
2.5 Mecanismo catalítico de M ^{pro} de SARS-CoV-2.....	14
2.6 Inhibidores del SARS-CoV M ^{pro}	15
2.7 Inhibidores del SARS-CoV-2 M ^{pro}	17
2.8 Inhibidores de SARS-CoV-2 M ^{pro} (diseño asistido por computadora)	17
3. Regulador alostérico, simulación atomística de dinámica molecular y algoritmo Ohm..	18
3.1 El concepto de regulador alostérico y sitios alostéricos de M ^{pro}	18
3.2 Importancia de la simulación atomística de dinámica molecular	20
3.3 Campo de fuerza (CHARM).....	22
3.4 Algoritmo de propagación de perturbaciones OHM y conectividad alostérica	23
3.5.1 Flujo de trabajo de Ohm	24
4. Justificación.....	26
5. Hipótesis	27
6. Objetivo general	28
6.1 Objetivos específicos	28
7. Metodología.....	29
8. Diagrama de flujo.....	29
9. Características de los compuestos RS-102895 Y AT7519.	30
9.1. Estructuras cristalizadas de M ^{PRO} y resueltas por difracción de rayos X.....	31

10. Análisis de conectividades alostéricas y residuos de aminoácidos participantes.....	33
11. Simulaciones atomísticas de dinámica molecular	34
11.1 Propiedades básicas derivadas del análisis de SADP que caracterizan una estructura	36
12. Resultados.....	40
12.1 Datos obtenidos del algoritmo Ohm	40
12.2 Análisis de los valores de RMSF	47
12.3 Modelo mecanístico estructural probable de la inhibición alostérica de M ^{pro} por el inhibidor alostérico RS-102895 y AT7519	53
13. Discusión	70
14. Conclusiones	78
15. Anexos.....	80
16. Bibliografía	81

“...Model makers are storytellers ...”

Ken Dill

1.Introducción

Durante el ciclo de replicación de SARS-CoV-2, la proteasa principal homodimérica M^{pro} desempeña una función clave, porque genera un número importante de proteínas no estructurales que participan en la transcripción del genoma viral. Esto significa que la inhibición de M^{pro} tendría como consecuencia la interrupción de la replicación de SARS-CoV-2. Por lo tanto, se ha convertido en uno de los principales objetivos moleculares en la búsqueda de antivirales efectivos para detener la pandemia. A pesar de que se han publicado numerosos estudios sobre moléculas con potencial de inhibir la actividad de M^{pro} por su unión al sitio activo (Günther *et al.*, 2021) muy pocas han mostrado actividad biológica y ninguna ha progresado a fases clínicas II o III. Tal situación ha motivado la búsqueda de alternativas diferentes para inhibir la actividad de M^{pro}. Una de estas opciones involucra el descubrimiento de compuestos con afinidad por otros sitios en la estructura de M^{pro}, de tal forma que su unión inhiba su actividad al modificar la conformación del sitio activo o la región de dimerización. Con esta idea, recientemente Günther *et al.* (2021) realizaron un cribado de estructuras de M^{pro}, resueltas por cristalografía de rayos X con diferentes fármacos, y pudieron identificar varios compuestos unidos a dos sitios alostéricos, denominados I y II.

En lo que concierne al sitio alostérico I, el compuesto RS-102895 unido a este sitio, se diseñó teniendo como referencia el sitio activo del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tirosina cinasa (Günther *et al.*, 2021). En relación con el sitio alostérico II, los autores detectaron la interacción del compuesto AT7519, que es un potente inhibidor de varias proteínas cinasas dependientes de ciclina y actualmente se encuentra en fase inicial de desarrollo clínico. Ambos compuestos inhibieron la actividad catalítica de M^{pro}. Si bien el mecanismo alostérico de inhibición de la actividad de esta enzima por estos compuestos aún no se ha elucidado, se sabe que la actividad enzimática de M^{pro} depende de la arquitectura del sitio activo, la cual a su vez está condicionada por la dimerización de la enzima y la correcta orientación de sus subdominios. Esta información sugiere que la unión de un compuesto en una región distante al sitio activo podría afectar la actividad

catalítica de M^{pro} , ya que las perturbaciones derivadas de la unión de estos inhibidores en los sitios alostéricos de M^{pro} podrían alterar la arquitectura del sitio activo o la dimerización de la enzima. Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos investigar por métodos computacionales si los compuestos RS-102895 y AT7519 son inhibidores de la actividad enzimática de M^{pro} debido a que causan una alteración conformacional de su sitio activo.

2. Marco teórico

**“La ciencia nos ha hecho dioses incluso
antes de ser dignos de ser hombres”**

Jean Rostand

(Biólogo y filósofo francés).

2.1 Características generales de SARS-CoV-2 y su impacto en la salud

SARS-CoV-2 es un virus que pertenece a la familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*, subgénero *Sarbecovirus* y orden *Nidovirales*, que tiene ARN monocatenario positivo. Es causante del síndrome respiratorio agudo severo conocido como COVID-19. Esta enfermedad fue reportada por primera vez en la ciudad de Wuhan, China, el 31 de diciembre del 2019 para después esparcirse a la mayoría de los países del mundo. Ante esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de pandemia el 11 de marzo del 2020. Actualmente, las cifras oficiales en México registran 4,117,013 casos positivos confirmados, 308,214 defunciones confirmadas y 21,579 casos activos. En lo que se refiere a escala mundial, a la fecha del 2 de diciembre del 2021 se registraron 264'462,232 casos y 5'240,240 muertes. La OMS ha determinado que su número reproductivo básico (R_0) el cual describe la capacidad del virus para propagarse, se encuentra entre 1.4 y 3.5. Cuando el número de reproducción es mayor que 1, entonces la cantidad de

casos aumenta exponencialmente. Además, según estudios epidemiológicos, el tiempo de incubación del virus es de 2 a 14 días, siendo el quinto día en el que empieza la aparición de los primeros síntomas (Pastrian, 2020). SARS-CoV-2 es un virus de origen zoonótico, ya que su hospedero principal es un animal (murciélago), a partir del cual se transmitió a humanos. Su genoma fue secuenciado por primera vez de una muestra de uno de los primeros pacientes de Wuhan que presentó este tipo de neumonía (World Health Organization, 2020). En la Imagen 1 se ilustra el ciclo de replicación de SARS-CoV-2, así como la función que desempeña la proteasa principal M^{Pro}, objetivo de este proyecto (ver sección siguiente).

La enfermedad de COVID-19 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, por ello los esfuerzos iniciales se enfocaron en tratarlo únicamente como un virus respiratorio; pero a medida que la pandemia progresó y se incrementaron los casos, el virus causó un espectro mayor de manifestaciones clínicas. Otros síntomas identificados, pero menos frecuentes, son problemas gastrointestinales, afecciones cardíacas, neurológicas, renales, erupciones cutáneas, conjuntivitis y el síndrome inflamatorio multisistémico en infantes. Las personas que sufren más afecciones y presentan síntomas graves pertenecen a poblaciones vulnerables, que cursan con sistema inmunitario deprimido, problemas cardíacos y pulmonares, diabetes e hipertensión arterial (Gentile *et al.*, 2020). De igual manera, se ha reportado que la recuperación puede dejar secuelas en los pulmones o incluso en el sistema nervioso central, además de que recientemente han surgido casos de reinfección (Tillett *et al.*, 2020). El SARS-CoV-2 es altamente transmisible, razón por la cual el número de casos confirmados ha ido incrementándose exponencialmente. Este virus se transmite por estar en contacto con una persona infectada, a través de las gotículas que se esparcen al toser, estornudar y hablar. Así mismo, estas gotículas pueden caer sobre superficies y objetos que, al ser tocados por un individuo, pueden transmitirle el virus, si éste se lleva las manos a la nariz, boca, ojos u oídos (World Health Organization, 2020). Por microscopía electrónica se observa que su forma general es redonda con espículas dispuestas en una estructura superficial que recuerda una corona, por lo

que de ahí toma el nombre de coronavirus. Al tener RNA monocatenario, es decir, una cadena simple que está unida a la proteína N (Nucleocápside) esto le ayuda a camuflar el RNA del sistema inmune. La proteína E (envoltura) es la más pequeña y ayuda a infectar a la célula; la proteína M (membrana) es la más abundante finalmente, la proteína S (spike, espícula) se une al receptor de la célula ACE₂.

2.2 El SARS-CoV-2 y las proteasas

Todos los coronavirus descubiertos hasta la actualidad, incluido el SARS-CoV-2, se caracterizan porque presentan un genoma de RNA de una sola cadena (de unos 30,000 nucleótidos, aproximadamente) de tipo RNA-mensajero (con un extremo 5'-Cap y un extremo 3'-poliA), es decir de tipo positivo. A diferencia de otros virus de RNA, el SARS-CoV-2 se transcribe dando lugar a una poliproteína de una sola cadena que es hidrolizada por las proteasas virales, produciendo cada una de las diferentes proteínas que lo constituyen. El SARS-CoV-2 produce, a partir de la zona replicativa las poliproteínas derivadas del marco de lectura abierta ORF1a y ORF1b, las proteínas designadas como pp1a (nsp1-nsp11) y pp1ab (nsp1-16) (Reina & Iglesias, 2022). Estas proteínas son procesadas inicialmente por dos proteasas de cisteína virales específicas nombradas como proteasa papaína-like (PLpro) (nsp3) y proteasa quimotripsina-like (3CLpro o main proteasa, M^{pro}) (nsp5) dando lugar a unas 11-16 proteínas intermediarias y no estructurales.

La integridad y funcionalidad de estas proteasas es esencial en el proceso replicativo de SARS-CoV-2. La proteasa principal M^{pro} se ha constituido como una de las dianas terapéuticas de elección para el desarrollo de fármacos antivirales contra SARS-CoV-2, debido a su secuencia y estructura altamente conservada entre todos los coronavirus.

2.3 Función de la proteasa principal M^{pro} en la replicación viral

SARS-CoV-2 M^{pro} es una cisteína proteasa (EC 3.4.22.69). Las proteasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos y, por lo tanto, pertenecen a la categoría de hidrolasas. La primera estructura cristalina de la SARS-CoV-2 M^{pro} se determinó mediante difracción de rayos X, a una resolución de 2.16 Å, fue depositada en el Protein Data Bank (PDB) por Jin et al. y publicada el 5 de febrero de 2020, con el código 6LU7. (Sapountzaki *et al.*,2022). La proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2 es la encargada de escindir proteolíticamente los polipéptidos pp1a y pp1ab generados durante la transcripción, para formar un complejo entre la replicasa y la transcriptasa, es decir, genera proteínas no estructurales, que son indispensables para que los virus se repliquen (Imagen 1). Debido a esto, M^{pro} es una enzima clave en la supervivencia de los coronavirus, constituyéndose como uno de los principales objetivos en la búsqueda de inhibidores contra SARS-CoV-2. Por lo que representa un desafío importante debido a su plasticidad conformacional y su flexibilidad propensa a mutaciones. Por lo tanto, las investigaciones referenciadas demuestran que utilizar la enzima M^{pro} como blanco terapéutico inhibirá la maduración viral y mejorará la respuesta inmune innata del huésped contra COVID 19.

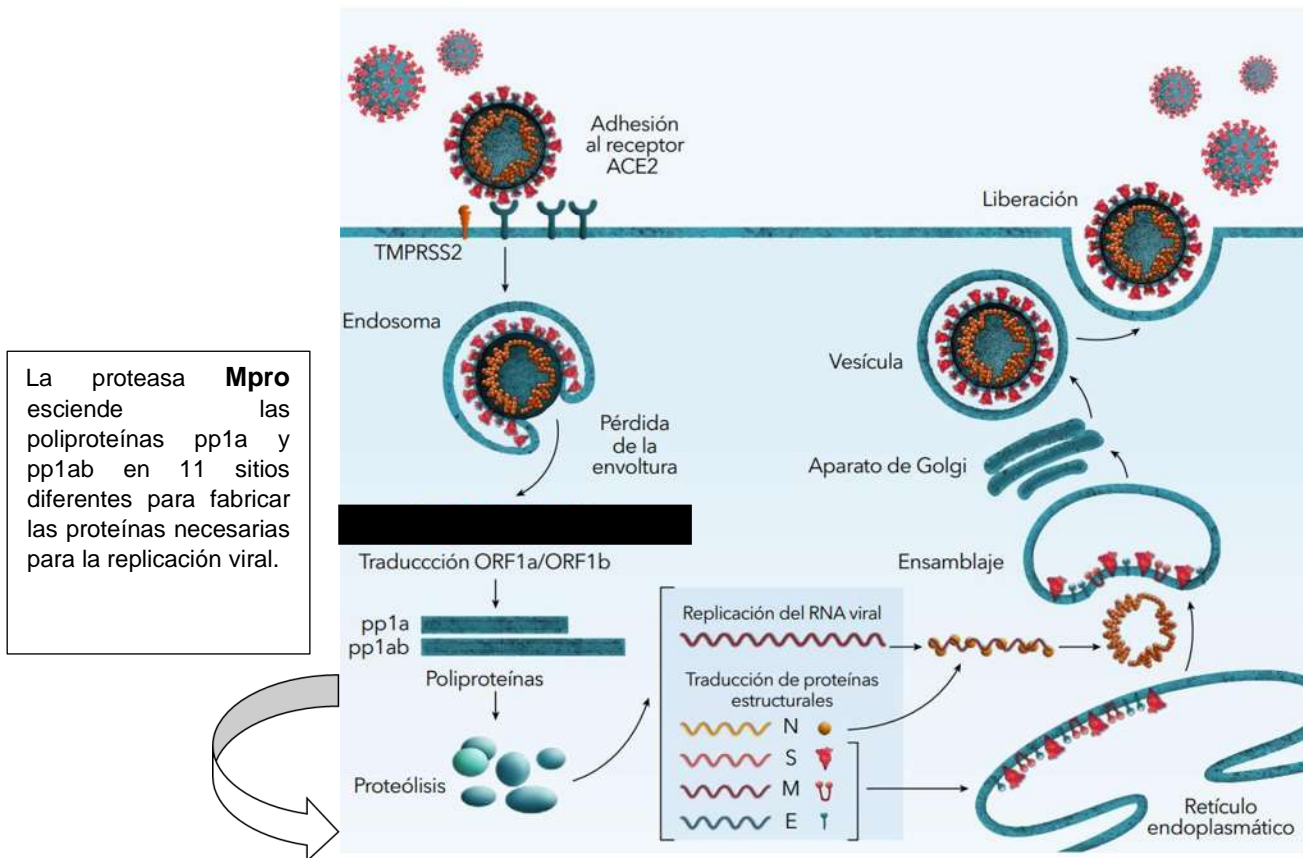


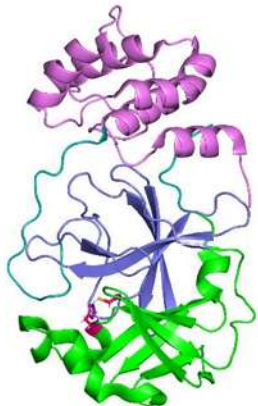
Imagen 1. Ciclo de replicación del SARS-CoV-2 y la función de la proteasa principal M^{pro} (Tomado y modificado de Zhu *et al.*, 2013). Utilizando la maquinaria de nuestras células el virus fabrica proteínas necesarias para la replicación. Entre ellas la M^{pro}, si se evita su funcionamiento el virus no se puede replicar.

2.4 Estructura de la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2

La estructura tridimensional de M^{pro} se determinó en 2020 por Zhang *et al.* Las coordenadas obtenidas por difracción de rayos X indicaron que M^{pro} está conformada por un homodímero, cuyos protómeros se encuentran ortogonalmente alineados (Figura 1). Cada protómero está formado 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 donde el sitio de unión del sustrato está conformado entre estas hojas, mientras que el dominio III (residuos 201-306) adopta la forma de hélices α y tiene una función en la regulación de la dimerización de la enzima. El dominio III se une al dominio II por medio de una región bucle formada

por los aminoácidos 185-200. Los protómeros interactúan por los residuos 1-7 entre los dominios I y II, formando un dedo N-terminal que conforman el sitio activo. En el sitio activo de M^{pro} está presente la Cys145 que interactúa con la His41, formando una diada catalítica. No existen proteínas similares en la célula huésped, por lo que el descubrimiento o reposicionamiento de drogas que inhiban la actividad de M^{pro} en su sitio activo es uno de los temas principales para frenar la propagación del virus. Aunque se ha invertido mucho dinero y esfuerzo para encontrar la droga ideal anti- M^{pro} , la realidad es que al parecer la comunidad científica está lejos de conseguir tal objetivo. Una estrategia diferente para inhibir la actividad enzimática es alterar la conformación del sitio activo, mediante la interacción de moléculas que se unan con alta afinidad a un sitio alejado de esta región. Este concepto importante se refiere a la perturbación de la actividad por modulación alostérica.

A



B

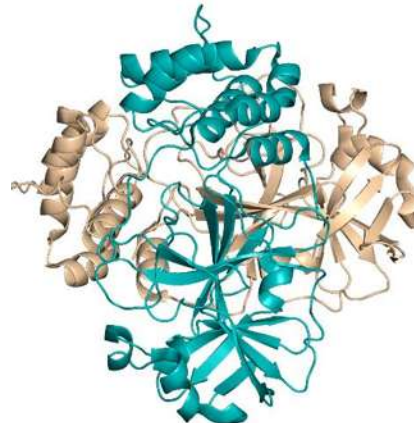


Figura 1. A. Protómero de M^{pro} . Los dominios están coloreados en verde (I), morado (II) y violeta (III). Los residuos que constituyen la diada catalítica His41 y Cys145 están representados en color rojo y se localizan entre los dominios I y II. **B.** Interacción ortogonal de los protómeros de la proteasa principal M^{pro} de SARS-CoV-2, representados en colores cian y dorado. (RCSB PDB 7AGA).

2.5 Mecanismo catalítico de M^{pro} de SARS-CoV-2

La diada catalítica His41 y Cys145 permanece cercana gracias a los enlaces por puente de hidrógeno, siendo la distancia más probable de 3.6 Å (unido el sustrato

al sitio activo). Los residuos Gly143 y Ser144 permiten la unión de los ligandos alostéricos interfiriendo en la correcta orientación en la región oxianión del sitio activo, lo cual conduce a una disminución de su actividad catalítica mientras que los residuos Thr24, Thr26, Asn142, Asn143, His163, His164, Glu166, Asp187, Gln189 y Thr190 forman enlaces de hidrógeno con el péptido, por lo cual permiten el anclaje, es decir, la correcta orientación y alineación del sitio activo. (Ramos-Guzmán *et. al.*, 2020).

Para dilucidar el mecanismo molecular de la proteólisis de M^{pro} de SARS-CoV-2 (Jackson, 2020) se utilizaron métodos computacionales multiescala QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics). Se observó que el residuo His41 le “roba” un protón a la Cys145 por lo cual el S queda cargado negativamente, permitiéndole generar un ataque nucleofílico al carbono del carbonilo del sustrato peptídico, dando como resultado la producción de un péptido con terminal amino – RNH₂ y a su vez se forma un tioéster, el cual reacciona con una molécula de agua H₂O en presencia de la His41 desprotonada. La molécula de agua se hidroliza, el hidrógeno protona a la histidina y el oxígeno al tioéster para formar ácido carboxílico y la enzima libre. Esto permite a la proteasa M^{pro} cortar en 11 sitios diferentes a la poliproteína pp1ab para facilitar el proceso de replicación y transcripción viral.

2.6 Inhibidores del SARS-CoV M^{pro}

El desarrollo de fármacos contra el SARS-CoV-2 ha sido un esfuerzo global y acelerado, Equipos de investigación científica que estudian las infecciones por Coronavirus se han dedicado al desarrollo de inhibidores peptidomiméticos y no peptidomiméticos contra M^{pro} desde el primer brote de SARS-CoV en el 2003. A continuación, mencionamos algunas de las moléculas clave que han sido descubiertas o desarrolladas para combatir esta enfermedad:

1. Remdesivir:
 - Estructura: Análogo de nucleósido.

- Mecanismo de acción: Inhibe la replicación del virus, interfiere en la síntesis de su ARN.
- Uso clínico: Autorizado para el tratamiento de pacientes hospitalizados con COVID-19.

2. Paxlovid:

- Composición: Combinación de nirmatrelvir y ritonavir.
- Mecanismo de acción: Inhibe la proteasa principal del virus.
- Uso clínico: Autorizado para el tratamiento temprano de COVID-19 en adultos con alto riesgo de hospitalización.

3. Molnupiravir:

- Estructura: Un análogo de nucleósido.
- Mecanismo de acción: Introduce errores en el genoma viral durante la replicación, lo que impide que el virus se reproduzca.
- Uso clínico: Autorizado para el tratamiento de COVID-19 leve a moderada en adultos con alto riesgo de hospitalización.

Inhibidores de la proteasa:

- Mecanismo de acción: Bloquean la proteasa del virus, una enzima esencial para su maduración.
- Ejemplos: nirmatrelvir (están en desarrollo).

La investigación en este campo continúa a un ritmo acelerado. Aunque se han logrado avances significativos, el desarrollo de tratamientos eficaces contra el SARS-CoV sigue siendo un área de investigación activa.

2.7 Inhibidores del SARS-CoV-2 M^{pro}

En vista de la gran similitud entre SARS-COV M^{pro} y SARS-COV-2 M^{pro}, el primero proporciona una referencia valiosa para el desarrollo de inhibidores de SARS-COV-2 M^{pro}. Al igual que el SARS-COV, los inhibidores del SARS-COV-2 M^{pro} se pueden clasificar como peptoides y no peptidomiméticos, y el mecanismo de acción de los inhibidores peptídicos incluye dos pasos. Los peptidomiméticos que imitan los sustratos peptídicos naturales se unen inicialmente a M^{pro} y forman un complejo no covalente que espacialmente está muy cerca del residuo catalítico y sufre un ataque nucleofílico para catalizar la formación de enlaces covalentes en los que participa la Cys145.

En la actualidad, se han publicado una gran cantidad de trabajos de investigación y revisiones relacionados con los inhibidores del SARS-CoV-2 M^{pro}. Recientemente, (Günther et al.,2021) utilizaron cristalografía de rayos X para detectar la forma en que interaccionan más de 5,000 compuestos con M^{pro} de SARS-CoV-2. Estos compuestos probados son medicamentos aprobados o medicamentos en ensayos clínicos. Identificaron 37 compuestos que se unen a M^{pro} y la mayoría de ellos interaccionan con el sitio activo. Además, su estudio reveló compuestos que se unen a dos sitios alostéricos, e inhiben la actividad de la enzima. Es posible que las interacciones de esos compuestos en los sitios alostéricos causen un cambio de conformación en el sitio activo de M^{pro}.

2.8 Inhibidores de SARS-CoV-2 M^{pro} (diseño asistido por computadora)

Con el fin de encontrar candidatos a fármacos contra el SARS-CoV-2 se realizó un cribado por cristalografía de rayos X a gran escala de M^{pro} contra 5,953 compuestos contenidos en dos bibliotecas Fraunhofer IME Reforposing (organización de investigación aplicada alemana) y la biblioteca Safe-in-man de Dompé Farmaceutici S.p.A (empresa farmacéutica italiana) de reposicionamiento. En lugar de desarrollar un fármaco completamente nuevo, se busca reutilizar uno existente para tratar una enfermedad diferente. Del total de compuestos probados, 2,381 se unieron a M^{pro}.

De éstos, 43 compuestos pudieron clasificarse como *hits*, de los cuales solo 37 estaban disponibles en las cantidades necesarias para probar su actividad antiviral contra el SARS-CoV-2. Finalmente, los autores centraron su atención en 11 compuestos que redujeron la replicación del ARN viral. De estos 11 compuestos, 7 (AT7519, calpeptina, ifenprodil, MUT056399, pelitinib, tolperisona e isocianurato de triglicidilo) se unen en una región diferente al sitio activo) y muestran actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 (Günther *et al.*,2021).

3. Regulador alostérico, simulación atomística de dinámica molecular y algoritmo Ohm

“Creo que he descubierto el segundo secreto de la vida”

Jacques Monod

(Biólogo y bioquímico francés, premio nobel de fisiología).

3.1 El concepto de regulador alostérico y sitios alostéricos de M^{pro}

La búsqueda de rutas terapéuticas alternativas ha conducido a la investigación de compuestos que son importantes por su capacidad para inhibir M^{pro}, incluidos fármacos reutilizados u otros inhibidores de proteasa principales de coronavirus, moléculas de fármacos diseñadas y optimizadas, así como compuestos naturales. La inhibición puede ocurrir a través de la unión covalente del inhibidor a la Cys145 en el sitio catalítico por un mecanismo de adición nucleofílica (Sapountzaki *et al.*,2022).

Las moléculas que actúan sobre sitios alostéricos causan cambios conformacionales en la estructura de las proteínas, que son imposibles de describir a detalle atómico por métodos experimentales. Esta unión provoca que la proteína pase de estar de un estado inactivo a un estado activo o viceversa. Ambas

conformaciones proteicas son distintas y estables. En ocasiones, por ejemplo, los sustratos de las enzimas se comportan como ligandos activadores que provocan un cambio conformacional, con lo cual aumenta la afinidad de la enzima por su sustrato. Si aumenta mucho la cantidad de productos, éstos se comportan como ligandos inhibidores que pueden unirse a algún sitio alostérico y la enzima puede transitar a una conformación inactiva.

De acuerdo con los datos del trabajo recientemente publicado por Günther et al. (2021) la proteasa M^{PRO} tiene dos sitios alostéricos, denominados I y II. El **sitio alostérico I** se localiza en un bolsillo hidrofóbico formado por los residuos Ile213, Leu253, Gln256, Val297 y Cys300, ubicados dentro del dominio de dimerización C-terminal. Estos autores identificaron que los compuestos Pelinitib, Ifenprodil, RS-102895, PD-168568 y Tofogliflozin, interaccionan con este sitio, insertando una fracción aromática en esta cavidad. En particular, el anillo de benceno halogenado del compuesto RS-102895 se une al surco hidrofóbico en el dominio helicoidal, que se vuelve accesible por el movimiento de la cadena lateral. Sin embargo, desde su posición de unión observada en el sitio alostérico I, es imposible que este bolsillo llegue al sitio activo, y no se encuentra evidencia de unión covalente a Cys145 en los mapas de densidad electrónica. RS-102895 muestra una actividad antiviral alta. El **sitio alostérico II** está formado por el surco profundo entre los dominios catalíticos y el dominio de dimerización. AT7519 es el único compuesto que se une a este sitio por lo que se ha seleccionado en este proyecto, aunque tiene una actividad antiviral moderada. Uno de los problemas no resueltos en el estudio que se cita se refiere al mecanismo alostérico de inhibición enzimática de RS-102895 y AT7519.

Los posibles mecanismos de inhibición de la actividad de M^{PRO} por la unión de RS-102895 al sitio alostérico I y AT7519 al sitio alostérico II pueden ser: 1) Perturbación del arreglo tridimensional en la zona de dimerización y 2) alteración de la conformación nativa del sitio activo, lo que impide o disminuye la unión del sustrato. En este proyecto se tratará de probar que la interacción de RS-102895 y AT7519 a sus correspondientes sitios alostéricos perturban la conformación del sitio activo (mecanismo 2). Al estudiar los movimientos atómicos de los residuos de

aminoácidos que conectan estas regiones (región alostérica y sitio activo) en la estructura de la proteína M^{pro}, cuando los compuestos RS-102895 y AT7519 se unen a sus respectivos sitios alostéricos, se podrían sentar las bases para el descubrimiento de nuevos y más potentes compuestos alostéricos (Gentile *et al.*, 2020). Una de las técnicas computacionales que permite observar estos cambios es la simulación atomística de dinámica molecular.

3.2 Importancia de la simulación atomística de dinámica molecular

Las simulaciones atomísticas de dinámica molecular (SADM) predicen cómo se moverá cada átomo de una proteína u otro sistema molecular a lo largo del tiempo y están basadas en un modelo general de física que rige las interacciones interatómicas. Estas simulaciones pueden capturar una amplia variedad de procesos biomoleculares importantes, incluido los cambios conformacionales, así como la unión de ligandos y el plegamiento de proteínas, revelando así las posiciones de todos los átomos a una resolución temporal de femtosegundos. Es importante destacar que estas simulaciones también pueden predecir cómo responderán las biomoléculas a perturbaciones como mutación, fosforilación, protonación o la adición-eliminación de un ligando. Las simulaciones de DM se utilizan a menudo en combinación con una amplia variedad de técnicas experimentales de biología estructural, que incluyen cristalografía de rayos X, microscopía crioelectrónica (crio-EM), resonancia magnética nuclear (RMN), resonancia paramagnética electrónica (EPR) y resonancia de transferencia de energía Förster (FRET) (Hollingsworth y Dror, 2018). Las simulaciones de DM son valiosas por varias razones. Primero, capturan la posición y el movimiento de cada átomo en cada momento, lo cual es muy difícil con cualquier técnica experimental. Segundo, las condiciones de simulación se conocen con precisión y se pueden controlar cuidadosamente, es decir, la conformación inicial de la proteína, qué ligandos están unidos a ella, si tiene mutaciones o modificaciones postraduccionales, qué otras moléculas están presentes en su entorno, su estado

de protonación, la temperatura, el voltaje a través de una membrana, etc. Las SADM se han usado también para determinar la manera en que los moduladores alostéricos se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCR), tal es el caso del receptor muscarínico M2 de acetilcolina, y cómo estos moduladores alostéricos aumentan o disminuyen la afinidad de unión de los ligandos ortostéricos (dirigidos al sitio de unión-sitio activo) (Hollingworth y Dror, 2018).

Desde un punto de vista **cualitativo**, las SADM pueden proporcionar una variedad de información para guiar el proceso de optimización del ligando. Pueden utilizarse para identificar las interacciones clave que establece un ligando con el bolsillo (*pocket*) de unión para predecir reordenamientos de éste inducidos por la unión de un ligando o para probar y refinar las poses potenciales del ligando (Hollingsworth y Dror, 2018). En algunos casos, las simulaciones del proceso completo de unión al ligando pueden revelar el sitio de unión y la posición espacial de un ligando. En el aspecto **cuantitativo**, los métodos basados en simulación proporcionan estimaciones sustancialmente más precisas de las afinidades de unión del ligando (energías libres) que otros enfoques computacionales como el acoplamiento molecular (*docking*) (Hollingsworth y Dror, 2018). La SADM también puede ser útil, pero de alto costo computacional para el cribado virtual, en el que se selecciona un conjunto inicial de ligandos que se predice que se unirán a un objetivo. Debido a este alto costo, el cribado virtual tradicional se realiza con software de *docking*, utilizando una única estructura de una proteína diana. Las SADM pueden ser particularmente útiles en el diseño de fármacos alostéricos, que se unen a un sitio diferente del ligando nativo. Estos compuestos son altamente valorados porque ofrecen el potencial de aumentar la selectividad entre subtipos de receptores estrechamente relacionados, modular los patrones de señalización natural del cuerpo y lograr eficacia en objetivos que de otro modo se considerarían no farmacológicos. Se ha demostrado que las DM son capaces de capturar estos “*pocket*” de unión en varias proteínas y descubrir sitios de unión de moduladores alostéricos conocidos, lo que facilita el diseño de nuevos moduladores alostéricos.

La SADM es una técnica computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema a través del tiempo. En esencia, genera las trayectorias de un sistema compuesto de N partículas por integración numérica directa de las ecuaciones de movimiento de Newton, las cuales son resueltas en tiempos pequeños, con condiciones iniciales y de frontera. Entonces la SADM es un método apropiado para la generación de ensambles de no-equilibrio y para el análisis de eventos dinámicos a escalas atomísticas. Al aumentar la capacidad de cómputo, las SADM se han hecho cada vez más útiles, y precisas al comparar los resultados con trabajos experimentales. La búsqueda de modelos teóricos que puedan reproducir y explicar los fenómenos experimentales, presenta una gran ventaja puesto que permite explicar lo que ocurre a niveles atomísticos, permitiendo predecir lo que ocurre a escalas más grandes sin necesidad del desarrollo experimental, para así tener mayor control en los experimentos o procesos industriales. (Ramírez, 2016). El entendimiento de las propiedades estructurales y de las interacciones físicas de una estructura con el medio donde se encuentra, son esenciales para poder diseñar adecuadamente los experimentos y técnicas a utilizar, disminuyendo los tiempos, costos y a su vez aumentando el entendimiento sobre el sistema. Teniendo modelos teóricos que puedan predecir las características esenciales del sistema, permitirá el avance del entendimiento en los procesos, la mejora en el rendimiento de estos y el ahorro de materiales. La SADM permite tender un puente entre el experimento, las interacciones moleculares y los modelos teóricos de primeros principios.

3.3 Campo de fuerza (CHARM)

En las simulaciones por computadora, el movimiento de los sistemas simulados está determinado por los "campos de fuerza". Estos campos de fuerza son conjuntos de parámetros y funciones matemáticas que describen la energía potencial de un sistema de partículas. Las interacciones que describen los campos de fuerza incluyen enlaces covalentes, ángulos de torsión, interacciones electrostáticas y fuerzas de van Der Waals.

Los campos de fuerza se parametrizan típicamente para reproducir propiedades estructurales conocidas. Un ejemplo de este tipo de parametrización es el campo de fuerza AMBER, que se utiliza comúnmente para simular biomoléculas como proteínas y ADN. La ecuación que se muestra a continuación ilustra la forma general de un campo de fuerza.

$$E(R) = \sum_{uniones} \frac{k_i}{2} (d_i - d_{i,0})^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{torsiones} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \lambda)) + E_{no-union}$$

donde

$$E_{no-union} = \sum_i \sum_j 4\epsilon_{ij} \left[\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right] + \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

La ecuación de la energía potencial del sistema está compuesta por cuatro términos, donde: el primero describe las energías asociadas a estiramiento de enlaces covalentes; el segundo describe las energías asociadas a los enlaces covalentes; el tercero está relacionado con movimientos torsionales y el cuarto se aplica a los átomos distantes, usualmente se describe mediante un potencial electrostático sumado a uno de Lennard Jones (Ramírez, 2016).

3.4 Algoritmo de propagación de perturbaciones OHM y conectividad alostérica

Las proteínas son moléculas complejas que desempeñan roles esenciales en diversos procesos biológicos. A pesar de su apariencia rígida, las proteínas poseen una gran flexibilidad que les permite cambiar de forma en respuesta a estímulos externos. Esta flexibilidad es crucial para su función, ya que permite la regulación de la actividad enzimática, el transporte de ligandos y otros procesos biológicos esenciales. En este sentido la flexibilidad proteica es un factor clave que contribuye a la regulación de la actividad proteica a través de un mecanismo conocido como **alostería**. Este es un fenómeno por el cual un cambio en un sitio específico de una proteína, denominado **sitio alostérico**, puede afectar la función de otro sitio

distante, denominado **sitio activo**. Esta comunicación a distancia se produce a través de una red de interacciones entre residuos de la proteína, lo que permite amplificar o modular la señal original. Recientemente se han desarrollado y utilizado métodos computacionales como OHM para identificar y caracterizar redes de comunicación alostéricas dentro de las proteínas. Este método, al igual que otros, se basa en la perturbación de las interacciones dentro de una red de residuos de la proteína, con el objetivo principal de propagar la perturbación y así identificar sitios alostéricos nuevos o existentes. (Wang *et al.*, 2021).

3.5.1 Flujo de trabajo de Ohm

El algoritmo de Ohm es un método computacionalmente eficiente cuyo principal objetivo es la propagación de perturbaciones con el fin de identificar los residuos que forman parte de la red de comunicación alostérica (ver Imagen 2).

Etapas:

- **Extracción de contactos:** Se obtienen los contactos a partir de la estructura terciaria de la proteína.
- **Cálculo de contactos atómicos:** El algoritmo determina la cantidad de contactos atómicos que existen entre cada par de residuos. Posteriormente, divide este número por la cantidad total de contactos atómicos de cada residuo.
- **Obtención de matrices:** Con la información obtenida en el paso anterior, se generan dos matrices: la matriz de contacto y la matriz de probabilidad de propagación de la perturbación. Cada elemento en la matriz de probabilidad indica la posibilidad de que una perturbación específica se propague a través de la red de residuos.

- **Cálculo de la Intensidad de Acoplamiento Alostérico (ACI):** Se determina la frecuencia con la que cada residuo se ve afectado por las perturbaciones. Este valor se conoce como Intensidad de Acoplamiento Alostérico (ACI).
- **Identificación de sitios alostéricos:** Se identifican como sitios alostéricos aquellos residuos que presentan una mayor capacidad para propagar la perturbación a través de la red.

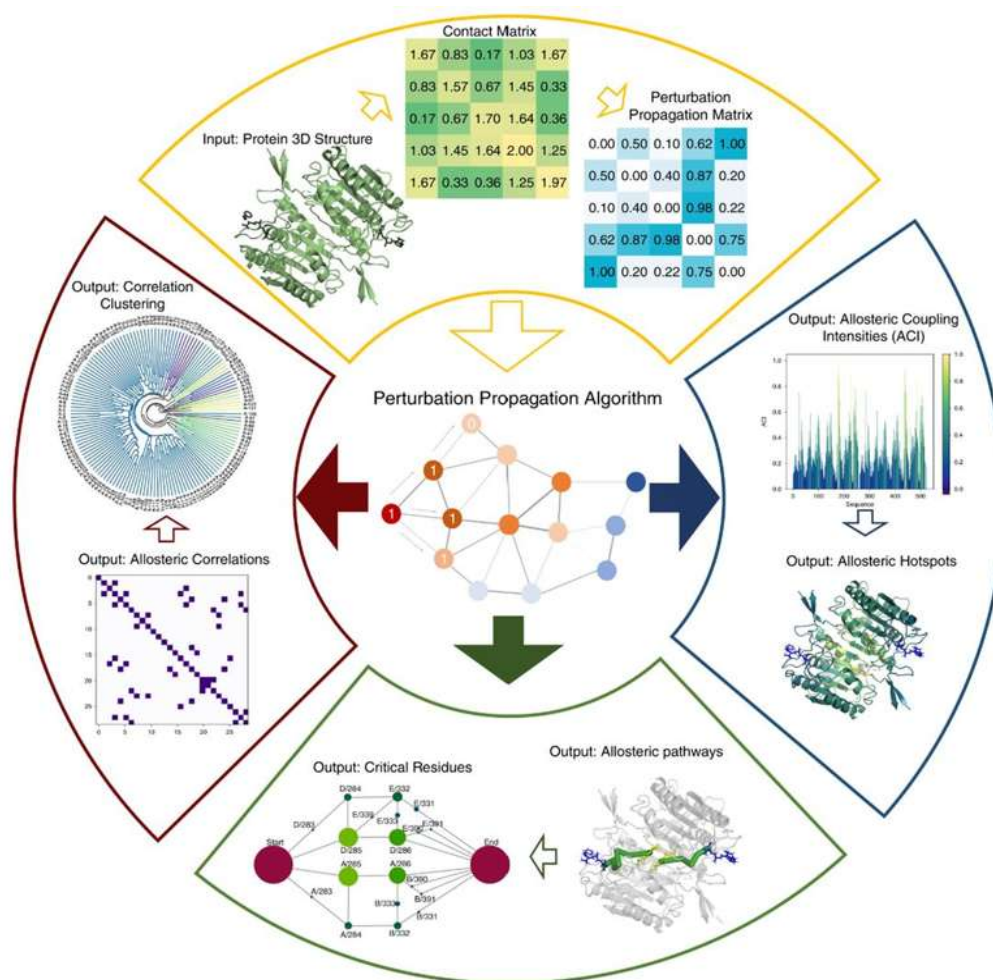


Imagen 2. Flujo de trabajo del algoritmo Ohm (tomado de Wang *et al.*, 2020).

En resumen, el algoritmo de Ohm implementa un proceso estocástico para propagar perturbaciones en una red de residuos que interactúan dentro de una proteína específica.

4. Justificación

La proteasa principal M^{pro} del SARS-CoV-2 es una enzima fundamental para la replicación del virus por su actividad proteolítica. Aunque el compuesto Paxlovid diseñado por la empresa Pfizer resulta efectivo en etapas críticas de COVID-19, su eficacia aún no es óptima para frenar la propagación del virus. Los estudios de potenciales inhibidores que se unen al sitio activo de la proteasa principal M^{pro} aún siguen su curso, pero los resultados han sido desalentadores. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas para inhibir M^{pro} e incluso otras moléculas importantes en la replicación de SARS-CoV-2 son temas de vanguardia, no solo para frenar la pandemia actual, sino también para desarrollar estrategias que permitan enfrentar pandemias en un futuro. De estos esfuerzos, recientemente se han identificado dos sitios alostéricos en M^{pro} que podrían ser la alternativa para generar inhibidores con alta selectividad y potencial. Tal es el caso de los compuestos alostéricos RS-102895 y AT7519. En este proyecto, los movimientos atómicos derivados del análisis en la estructura de M^{pro}, cuando RS-102895 y AT7519, se unen en los sitios alostéricos I y II, respectivamente, y la identificación de los residuos de aminoácidos que conectan estas regiones por simulaciones atomísticas de dinámica molecular, permitirá sentar las bases para descubrir compuestos alostéricos nuevos y con potencial de inhibir la actividad de la proteasa principal del SARS-CoV-2.

Los modelos *in silico* han sido de gran utilidad para evaluar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de fármacos con actividad biológica demostrada y aprobada. Una técnica innovadora ha permitido descubrir la existencia de múltiples "*puertas ocultas*" que controlan la función de algunas proteínas,

conocidas como sitios alostéricos. Estos sitios alostéricos se presentan como prometedores blancos farmacológicos con el potencial de transformar radicalmente el tratamiento de enfermedades. Su explotación podría conducir al desarrollo de nuevas terapias con medicamentos más seguros (que minimicen los efectos secundarios), más inteligentes (que actúen específicamente sobre las proteínas causantes de la enfermedad) y más eficientes (que detengan la progresión de la enfermedad).

Las ventajas que representa la utilización de los moduladores alostéricos como agentes terapéuticos también radica en la capacidad que tienen de regular la actividad catalítica y procesos metabólicos, ya sea forzando o inhibiendo la curva sigmoidea. Estos inhibidores alostéricos nuevos podrían ser la clave para frenar el ciclo replicativo de SARS-CoV-2, por lo que tendrían un impacto positivo en la salud pública.

Por lo tanto, este proyecto busca dilucidar la manera en que la interacción de RS-102895 en el sitio alostérico I y AT7519 en el sitio alostérico II de M^{pro} causan inhibición de la actividad catalítica. El análisis teórico-computacional de conectividades alostéricas, complementado por simulaciones atomísticas de dinámica molecular permitirán proponer un modelo mecanístico estructural probable de la inhibición alostérica de la proteasa M^{pro}.

5. Hipótesis

El sitio activo de la proteasa M^{pro} de SARS-CoV-2 experimenta cambios conformacionales por efecto de la interacción de los inhibidores RS-102895 y AT7519 en los sitios alostéricos I y II, respectivamente, que explica la inhibición de su actividad.

6. Objetivo general

Identificar, analizar e interpretar los cambios conformacionales en el sitio activo de M^{pro} por efecto de los inhibidores alostéricos RS-102895 y AT7519.

6.1 Objetivos específicos

1. Mapear las conectividades alostéricas y los residuos de aminoácidos que intervienen entre el sitio activo de M^{pro} y los sitios alostéricos I y II cuando los compuestos RS-102895 y AT7519 están unidos.
2. Diseñar, preparar y obtener las trayectorias atómicas del sistema de interacción entre M^{pro}-RS-102895 y M^{pro}-AT7519.
3. Analizar e interpretar los cambios conformacionales en el sitio activo de M^{pro} en presencia de RS-102895 y AT7519.

7. Metodología

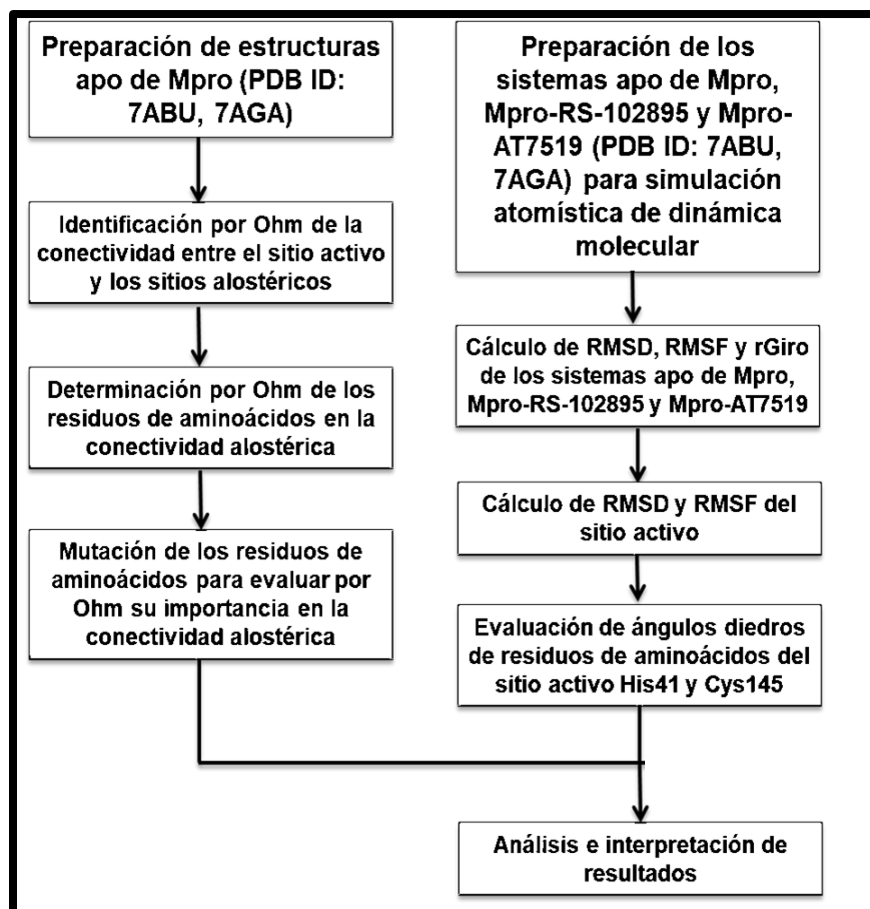
A. Identificación de conectividad y residuos participantes aplicando el algoritmo Ohm.

B. Cálculos de RMSF y Radio de Giro de M^{pro}, M^{pro}-RS-102895 y M^{pro}-AT7519.

C. Evaluación de ángulos diedros.

Los puntos A, B y C son claves del trabajo que se evaluarán en los diferentes sistemas estructurales: APO-M^{pro}, M^{pro}-RS-102895, M^{pro}-AT7519 y M^{pro}-RS-102895/AT7519.

8. Diagrama de flujo



9. Características de los compuestos RS-102895 Y AT7519.

“No me preocupa que hayan robado mi idea,
me preocupa que no tengan ninguna propia”

Nikola Tesla.

(Inventor e ingeniero eléctrico serbio).

El compuesto **RS-102895** (IUPAC, 1'-[2-[4-(trifluorometil) fenil]etil]espiro[1*H*-3,1-benzoxazina-4,4'-piperidina]-2-ona). Su código SMILES isomérico es C1CN(CCC12C3=CC=CC=C3NC(=O)O2)CCC4=CC=C(C=C4)C(F)(F)F y tiene una masa monoisotópica de 390.1 g/mol (Figura 2A). Presenta un coeficiente de partición XLogP de 4.3, un número de donadores y aceptores de hidrógeno de 1 y 6, respectivamente, un número de enlaces rotables de 3 y un área topológica superficial polar de 41.6 Å (PubChem). Los valores calculados de actividad biológica por (Günther *et al.*, 2021) para este compuesto son: EC₅₀ = 19.8 μM (partículas virales); EC₅₀ = 1.24 μM (copias de RNA viral); CC₅₀ = 54.8 μM (concentración citotóxica) y un índice de selectividad CC₅₀/EC₅₀ = 11.17.

El compuesto **AT7519** (IUPAC, 4-[(2,6-dichlorobenzoyl) amino]-*N*-piperidin-4-yl-1*H*pyrazole-5-carboxamide) es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclina (CDK) con actividad antineoplásica (Figura 2B). Su código SMILES canónico es C1CNCCC1NC(=O)C2=C(C=NN2)NC(=O)C3=C(C=CC=C3Cl)Cl y tiene una masa monoisotópica de 382.2 g/mol. Presenta un coeficiente de partición XLogP de 2.6, un número de donadores y aceptores de hidrógeno de 4 y 4, un número de enlaces rotables de 4 y un área topológica superficial polar de 98.9 Å (PubChem). Los valores calculados de actividad biológica reportados por (Günther *et al.*, 2021) para este compuesto son: EC₅₀ = 25.16 μM (partículas virales); EC₅₀ = 43.95 μM (copias de RNA viral); CC₅₀ = 100 μM (concentración citotóxica) y un índice de selectividad CC₅₀/EC₅₀ = 3.98. Ambos compuestos se seleccionaron para este estudio con base en sus parámetros de actividad biológica y por su afinidad para interactuar con los sitios alostéricos I (RS-102895) y II (AT7519) de M^{pro}, identificados por (Günther *et al.*, 2021).

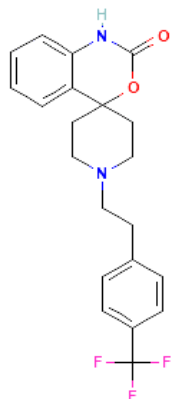
A**A. RS-102895****B****B. AT7519**

Figura 2. Estructura de los inhibidores alostéricos. A. Inhibidor del alostérico I y **B.** Inhibidor del sitio alostérico II.

9.1. Estructuras cristalizadas de M^{PRO} y resueltas por difracción de rayos X

Para analizar el efecto alostérico de RS-102895 y AT7519 sobre el sitio activo de M^{PRO} se usarán en este proyecto las estructuras de M^{PRO} co-cristalizadas con cada uno de estos compuestos reportadas por (Günther et al. 2021) en la página web RCSB (<https://www.rcsb.org/>). En particular, el efecto de RS-102895 se analizará con la estructura PDB 7ABU (Figura 3A), mientras que el efecto de AT7519 se analizará con la estructura PDB 7AGA (Figura 3B).

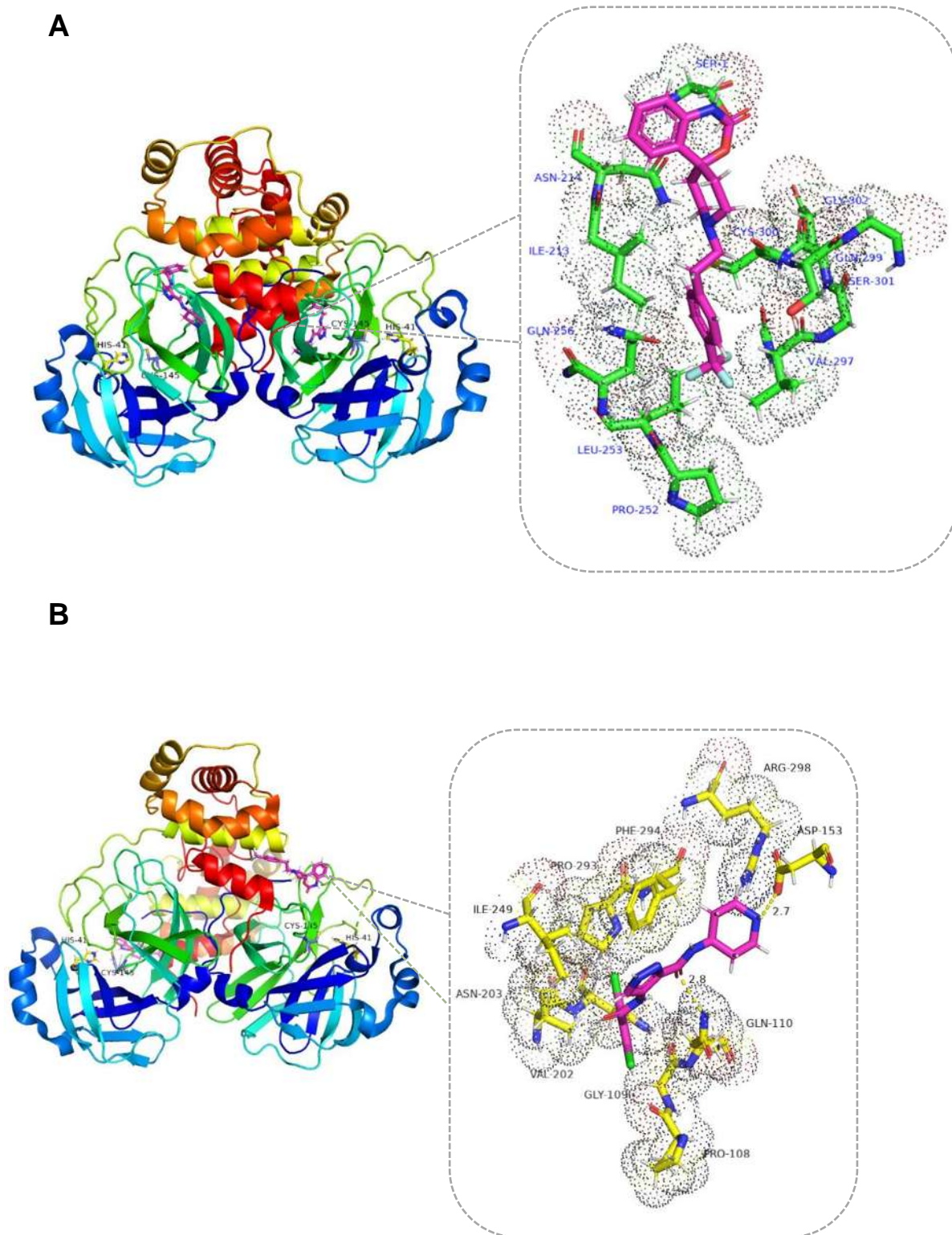


Figura 3. A. Cristal de M^{pro} PDB 7ABU con 2 moléculas de RS-102895 (magenta) unidas al sitio alostérico I. B. Cristal de M^{pro} PDB 7AGA con 2 moléculas de AT7519 (magenta) unidas al sitio alostérico II. Los residuos His41 y Cys145 del sitio activo se destacan en color amarillo y morado, respectivamente. A la derecha en A y B se muestran detalles de las interacciones que establecen los inhibidores alostéricos.

10. Análisis de conectividades alostéricas y residuos de aminoácidos participantes

“El objetivo de la ciencia es descubrir e iluminar la verdad”

Rachel Carson

(Bióloga marina estadounidense).

La identificación de nuevos sitios alostéricos en M^{pro} y el análisis de conectividad entre los sitios alostéricos I y II, y el sitio activo, se realizará de acuerdo con los protocolos establecidos por (Wang et al. 2021). Para ello se utilizó el programa de libre acceso Explore Allosterity: Identify Allosteric Sites and Pathways (<https://dokhlab.med.psu.edu/ohm/#/>). Este algoritmo Ohm calcula la distancia entre cada par de átomos de acuerdo con la ecuación:

$$C_{ij} = \sum_{a,b} H\left(r_0 - \left| \vec{r}_a^i - \vec{r}_b^j \right| \right)$$

Donde C_{ij} es el número de contactos atómicos entre el residuo i y el residuo j , mientras que a y b son los átomos en los residuos i y j , respectivamente; r_0 es la distancia límite, r_a^i es la posición vectorial del átomo a en el residuo i , y r_b^j es la posición vectorial del átomo b en el residuo j . H es la función de escalón “Heaviside” o de escalón unitario cuyo valor es 0 para cualquier argumento negativo y 1 para cualquier argumento positivo, incluido el cero. El número de contactos que establece el residuo i con los átomos del residuo j se calcula en el algoritmo Ohm con la ecuación siguiente:

$$N_{ij} = \frac{C_{ij}}{C_i}, N_{ji} = \frac{C_{ij}}{C_j},$$

Donde N_{ij} es el número promedio de contactos atómicos que establece el residuo i con los átomos del residuo j ; C_{ij} es el número de contactos entre el residuo i y el j ;

C_i es el número de átomos en el residuo i , y C_j es el número de átomos en el residuo j . El valor de C_{ij} es siempre igual a C_{ji} , mientras que el valor de N_{ij} no necesariamente es igual al valor de N_{ji} . (Wang *et al.*, 2021). Con base en la matriz que proporciona el promedio del número de contactos atómicos, el algoritmo Ohm calcula una matriz de la probabilidad de propagación de la perturbación (conectividad alostérica). Las ecuaciones que calculan esta matriz son:

$$P_{ij} = 1 - p_{ij} = 1 - e^{-\alpha \cdot N_{ij}}$$
$$P_{ji} = 1 - p_{ji} = 1 - e^{-\alpha \cdot N_{ji}}$$

Donde P_{ij} es la probabilidad de que la perturbación del residuo i sea propagada al residuo j ; p_{ij} es la probabilidad de que la perturbación del residuo i no sea propagada al residuo j ; α tiene un valor de inicio de 3.0, que puede ser cambiado por el usuario para amplificar o reducir la probabilidad.

11. Simulaciones atomísticas de dinámica molecular

**“En algún lugar, algo increíble está
esperando ser descubierto”**

Carl Sagan

(Astrónomo y escritor estadounidense ganador del premio Pulitzer)

Una de las aplicaciones más importantes de las simulaciones atomísticas de dinámica molecular es el diseño de fármacos. Esta técnica facilita la identificación de compuestos líderes que pueden ser optimizados para convertirse en nuevos agentes terapéuticos. Las SADM, basadas en la mecánica, se han utilizado en el diseño de fármacos asistido por computadora DIFAC para predecir conformaciones de unión y proporcionar información termodinámica, es decir, predicción de la afinidad de unión de ligandos.

Las SAMD se basan en la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton, las fuerzas requeridas se obtienen a partir de una mecánica molecular o en su caso de un campo de fuerzas empírico.

Hoy en día, los campos de fuerza que se utilizan para moléculas pequeñas son OPLS-All-Atom (OPLS-AA), OPLS3, el campo de fuerza CHARMM (CGenFF), la fuerza AMBER general Campo (GAFF), MMFF de Merck y GROMOS. Estos campos de fuerza se han mantenido activamente y se han mejorado para incluir nuevos parámetros que incluyen una gama más amplia de entidades químicas (Lin & MacKerell, 2019).

Las SAMD de M^{pro} en un ambiente fisiológico relevante, se realizaron en el software nanoscale molecular dynamics (NAMD) que usa el campo de fuerza Charmm, desarrollado por el Theoretical and Computational Biophysics Group y el Parallel Programming Laboratory (Jackson *et al.*, 2020). Los resultados de estas simulaciones proporcionarán información muy detallada con respecto a los movimientos que ocurran en el sitio alostérico, en relación con las conformaciones adoptadas por el sitio activo. Se analizará la relevancia de algunos residuos de aminoácidos en la trayectoria alostérica entre los sitios alostéricos y el sitio activo. También se realizarán cálculos de energías de unión de cada una de las partes estructurales del ligando, para analizar su contribución relativa. Además, se calcularán los parámetros estadísticos RMSD (Root Mean Square Deviation), RMSF (Root Mean Square Fluctuation) y Radio de Giro (Gentile *et al.*, 2020).

En el caso particular de los residuos de aminoácidos His41 y Cys145, importantes en el sitio activo, se calcularán sus ángulos diedros en la forma APO M^{pro}, M^{pro}RS-102895 y M^{pro}-AT7519. Esto permitirá saber con precisión si el residuo de His41 y/o Cys145 adoptan posiciones espaciales diferentes en presencia de los compuestos que interaccionan con el sitio alostérico I (RS-102895) y II (AT7519) respectivamente.

11.1 Propiedades básicas derivadas del análisis de SADM que caracterizan una estructura

A continuación, se hace una breve descripción de los análisis típicos realizados en la SADM y el tipo de información que arrojan dichos análisis.

Angulo diedro

Se denomina ángulo diedro a las porciones espaciales que se encuentran limitadas por un par de semiplanos originados en la misma recta. Para ello es necesario recurrir a dos paralelogramos que cuenten con un lado en común. (García *et al.*, 2021).

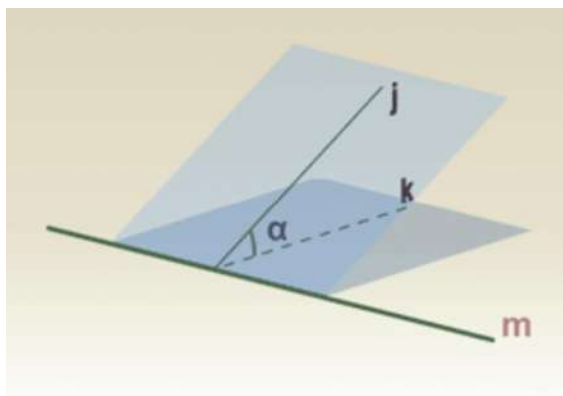


Imagen 3. Figura formada por dos planos que se cortan. El tamaño del ángulo diedro se define como el tamaño del ángulo formado entre dos líneas que se cortan (una en cada plano) que son ambas perpendiculares a la arista a lo largo de la cual se cortan los dos planos. Angulo diedro = α .

Los ángulos diedros se deben a una acción giratoria alrededor de un solo enlace y son los principales responsables de definir la posición de los átomos de la cadena principal en el espacio tridimensional; sin embargo, es importante considerar que los cambios en los ángulos diedros no afectan los valores de los ángulos de enlace entre los átomos sucesivos de la cadena principal.

Angulo diedro Psi ψ

Este ángulo se forma por los átomos $C\alpha_i C_i N_i C_{i-1}$, los cuales tienen como eje de giro el enlace $C - N$ y es llamado omega (ω) (Imagen 4). El enlace peptídico tiene un carácter parcial de doble enlace y por lo general tiene una configuración trans u $\omega = 180^\circ$.

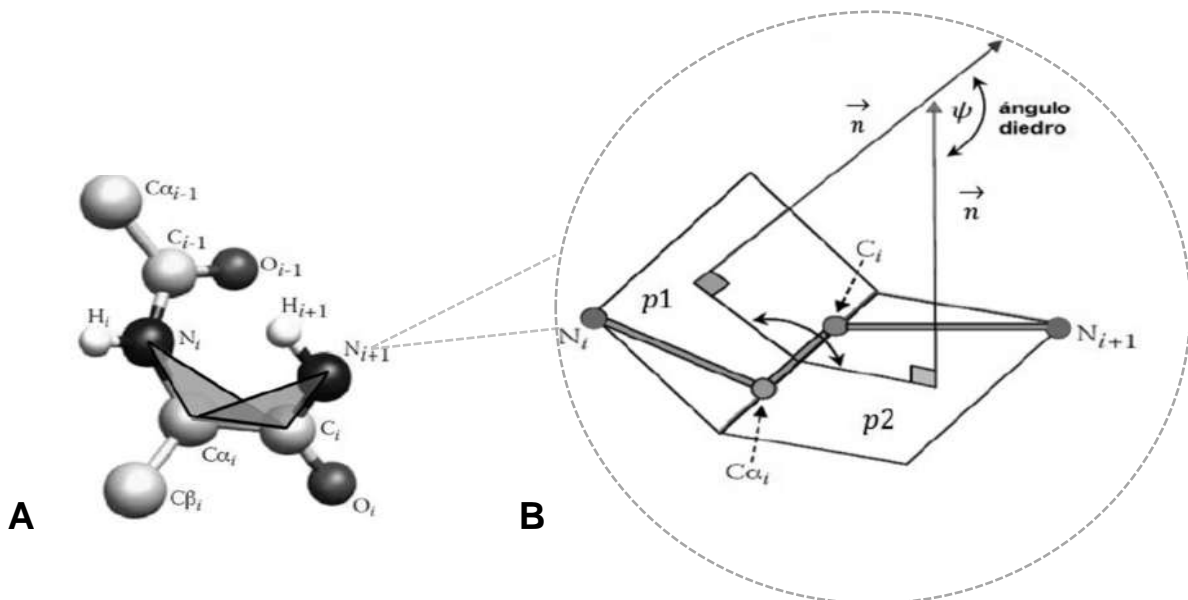


Imagen 4. Ángulo diedro Psi. (A) Representación de la disposición tridimensional de los átomos y la formación del ángulo alrededor del enlace $C\alpha-C$ y (B) El ángulo ψ formado por la intersección de la normal del plano $N_i, C\alpha_i C_i$ y la normal al plano $C\alpha_i, C_i, N_{i+1}$.

Angulo diedro Phi φ

La secuencia de los átomos que definen los dos planos que se interceptan en una línea que coincide con el enlace $N - C_{\alpha}$ y al ángulo que se forma entre esos dos planos es llamado ángulo φ (phi) (Imagen 5).

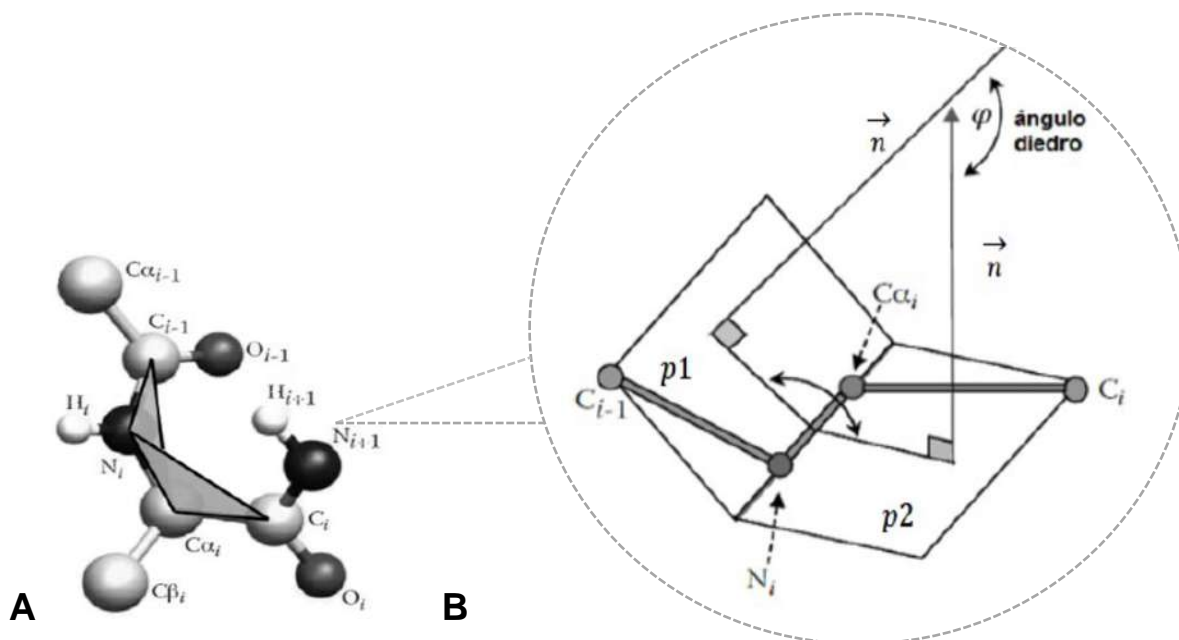


Imagen 5. Ángulo diedro Phi. (A) Representación de la disposición tridimensional de los átomos y la formación del ángulo alrededor del enlace $N - C_{\alpha}$. (B). El ángulo φ está formado por la intersección de la normal del plano $C_{i-1} N_i, C_{\alpha_i}$ y la normal del plano $N_i, C_{\alpha_i} C_i$.

Distancia cuadrática media de las fluctuaciones (RMSF)

La distancia cuadrática media de las fluctuaciones (RMSF), es una medida de la flexibilidad local de una estructura. El RMSF del átomo i da cuenta del grado de fluctuación de las coordenadas de dicho átomo respecto a su promedio temporal y se puede calcular de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$RMSF(i) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \langle x_i \rangle)^2 + (y_i - \langle y_i \rangle)^2 + (z_i - \langle z_i \rangle)^2}$$

Esta ecuación considera las diferencias individuales entre las coordenadas x, y, y z de un par de moléculas para elevarse al cuadrado (con la finalidad que el signo sea siempre positivo). Se suman y se divide entre el número total de intervalos de tiempo considerados (t) para tomar un promedio. Finalmente, se obtiene la raíz cuadrada.

Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD)

El parámetro estadístico RMSD cuantifica la distancia entre cada residuo después de una alineación entre dos estructuras, y también se pueden comparar dos estructuras proteicas a lo largo de toda la trayectoria de una SADM. Se trata de un ajuste de mínimos cuadrados de la estructura, tomando de referencia a otra estructura ($t_2 = 0$) y consecuentemente calcular la RMSD.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ y $r_i(t)$ es la posición del átomo i al tiempo t .

El resultado del cálculo de RMSD indica la distancia entre los mismos residuos con respecto al tiempo, después de haber alineado dos estructuras, es decir, da una idea del cambio conformacional que sufre la estructura a lo largo del tiempo.

12. Resultados

**“A las personas les encanta hacerse preguntas
y esa es la semilla de la ciencia”**

Ralph Waldo Emerson

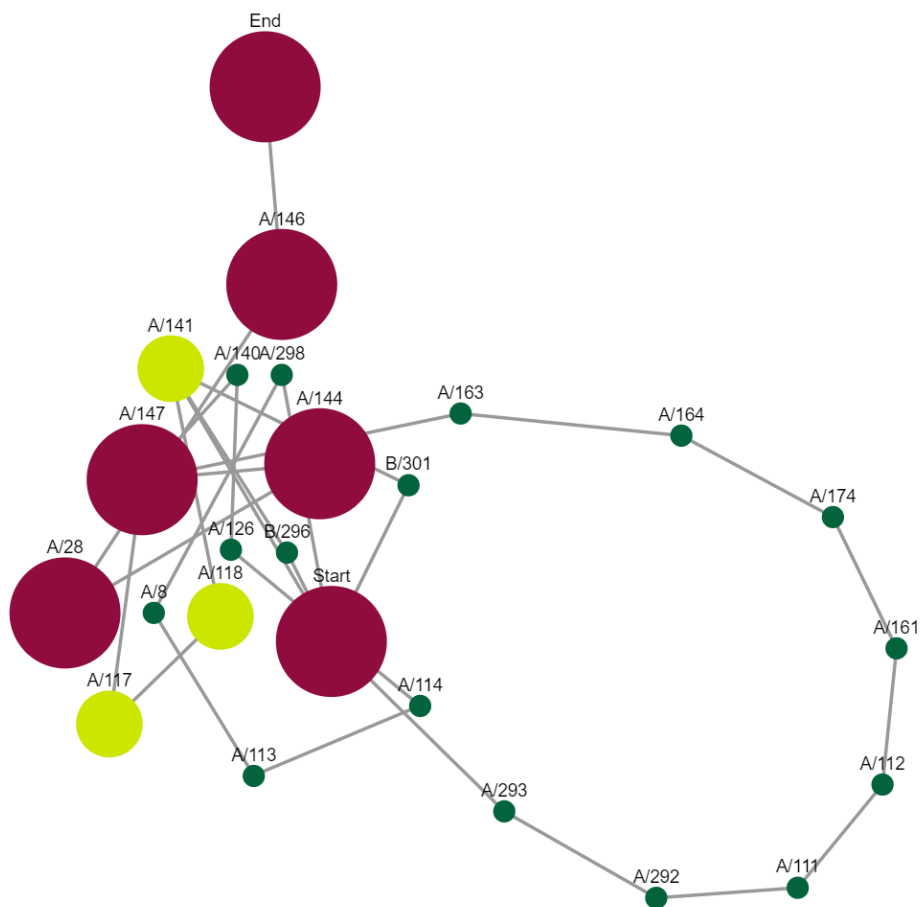
(Escritor, filósofo y poeta estadounidense)

12.1 Datos obtenidos del algoritmo Ohm

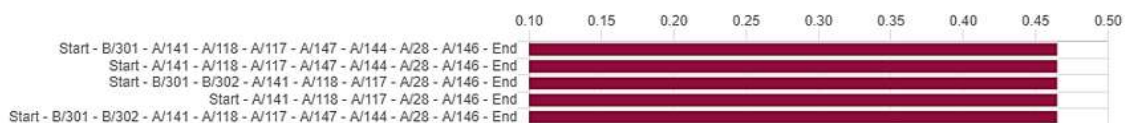
Para comprender la red de interacciones entre los sitios alostéricos y cómo estos desencadenan cambios conformacionales que afectan al sitio activo, se utilizó el algoritmo de Ohm que identifica la red de residuos que forman la ruta de comunicación desde el sitio alostérico hasta el sitio activo.

Las rutas alostéricas se identifican mediante el algoritmo de propagación de perturbaciones y residuos críticos. Las Figuras 4-9 A y B muestran la red de residuos de las conectividades entre los sitios alostéricos I y II, y el sitio activo, obtenidas a partir de SADMs de las estructuras Apo de M^{pro}, seleccionadas en cinco momentos específicos: 60 ns, 120 ns, 180 ns, 240 ns y 300 ns

A continuación, se muestran las gráficas obtenidas mediante el algoritmo Ohm. Los análisis se realizaron tomando la estructura de M^{pro} Apo con los residuos del ligante RS102895 del primer sitio alostérico en ambas cadenas del homodímero, elegidas en el tiempo de la SADM de 60 ns, 180 ns y 300 ns:



A



B

Figura 4. A) Red alostérica 1 tomada a los 60 ns de la SADM. Muestra los residuos críticos en las vías alostéricas de M^{pro} Apo con el ligante RS102895 predichas por Ohm. El radio de cada nodo nos indica la importancia del residuo en cuanto a su comunicación alostérica. El color rojo nos indica alta importancia mientras que el verde significa poca importancia. Cada nodo está etiquetado por el nombre de la cadena seguido del número de residuo. B) Pesos de las vías alostéricas más importantes de M^{pro} Apo.

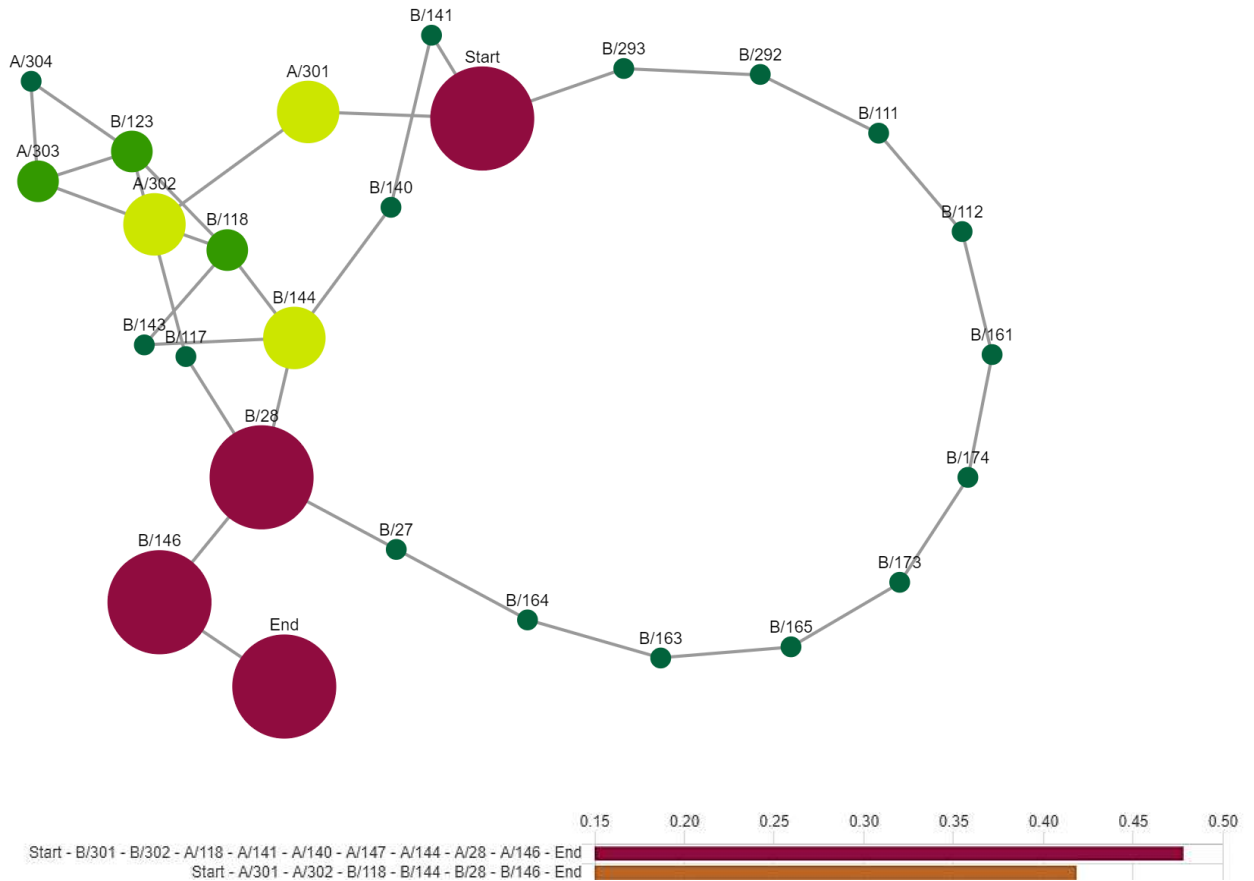
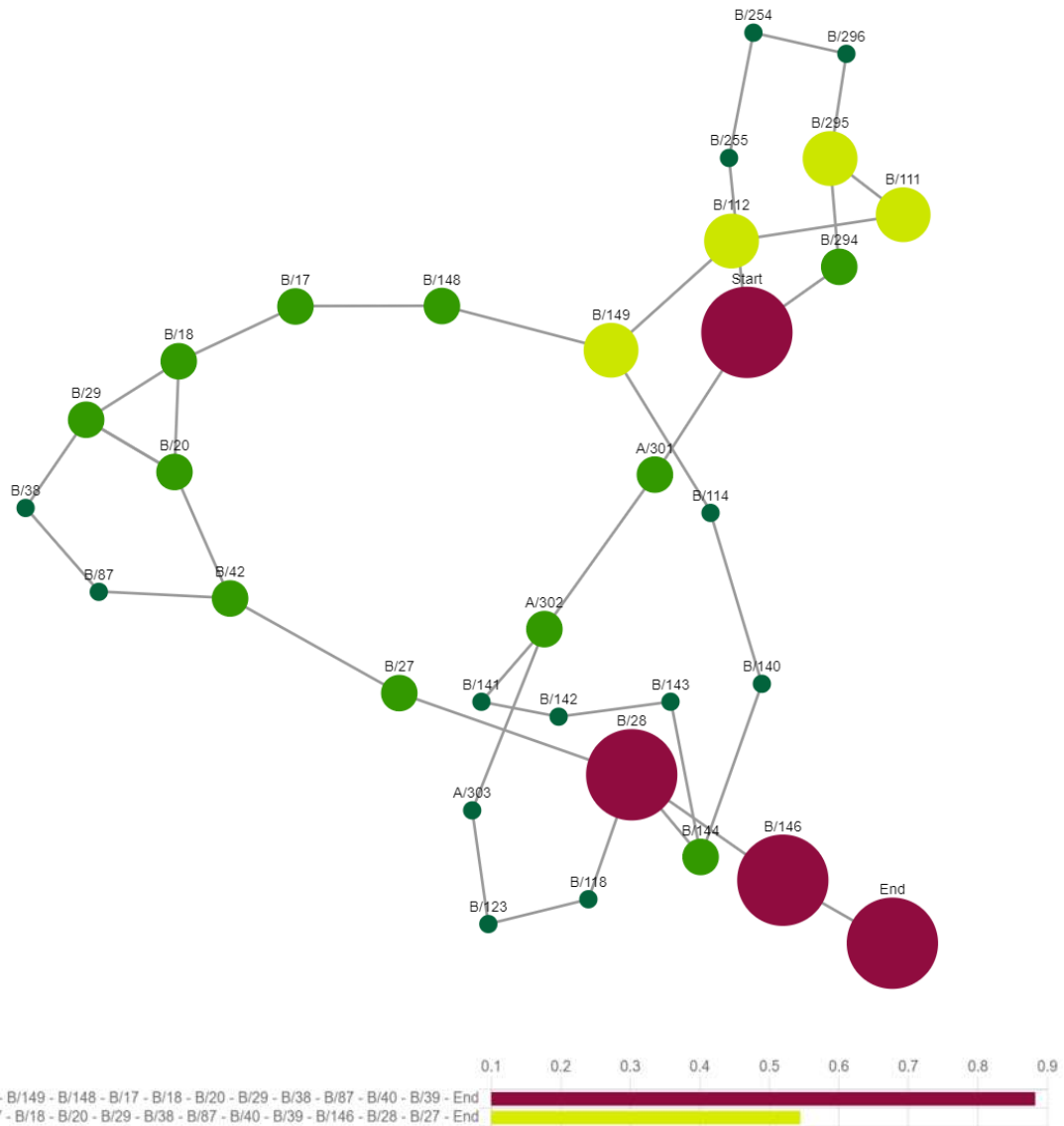


Figura 5. A) Red alostérica 2 tomada a los 120 ns de la SADM. Muestra los residuos críticos en las vías alostéricas de M^{pro} Apo con el ligante RS102895 predichas por Ohm. El radio de cada nodo nos indica la importancia del residuo en cuanto a su comunicación alostérica. El color rojo nos indica alta importancia mientras que el verde significa poca importancia. Cada nodo está etiquetado por el nombre de la cadena seguido del número de residuo. B) Pesos de las vías alostéricas más importantes de M^{pro} Apo.

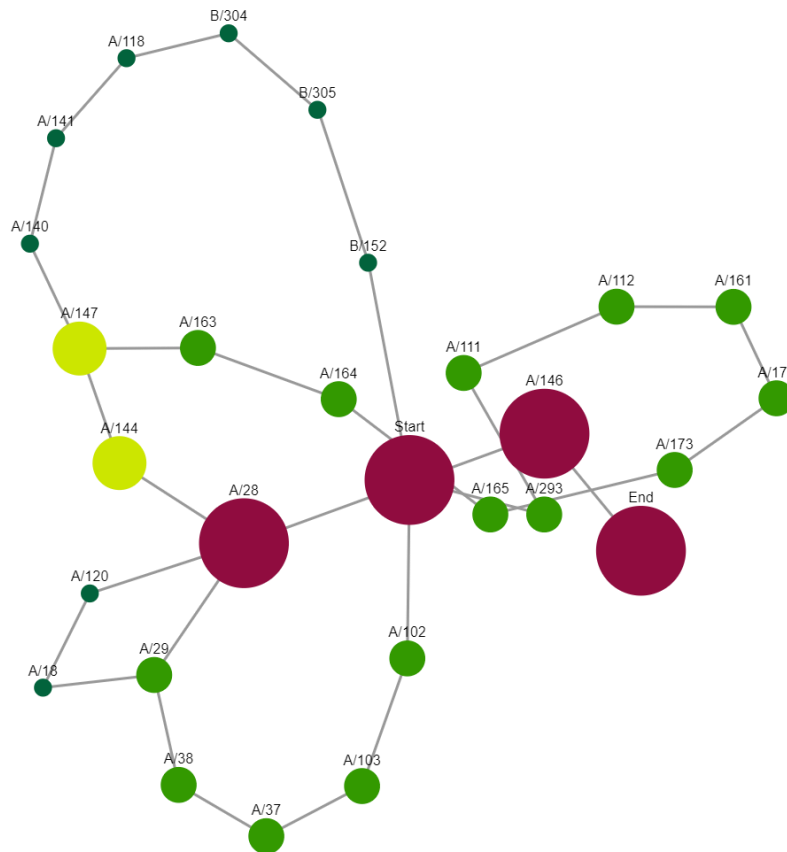


A

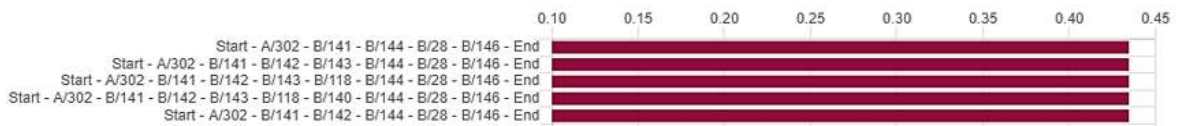
B

Figura 6. A) Red alostérica 3 tomada a los 300 ns de la SADM. Muestra los residuos críticos en las vías alostéricas de M^{pro} Apo con el ligante RS102895 predichas por Ohm. El radio de cada nodo nos indica la importancia del residuo en cuanto a su comunicación alostérica. El color rojo nos indica alta importancia mientras que el verde significa poca importancia. Cada nodo está etiquetado por el nombre de la cadena seguido del número de residuo. B) Pesos de las vías alostéricas más importantes de M^{pro} Apo.

A continuación, se muestran las gráficas obtenidas mediante el algoritmo Ohm. Los análisis se realizaron tomando la estructura de M^{pro} Apo con los residuos del ligante AT7519 del segundo sitio alostérico en ambas cadenas del homodímero elegidas en el tiempo de la SADM de 60 ns, 180 ns y 300 ns:

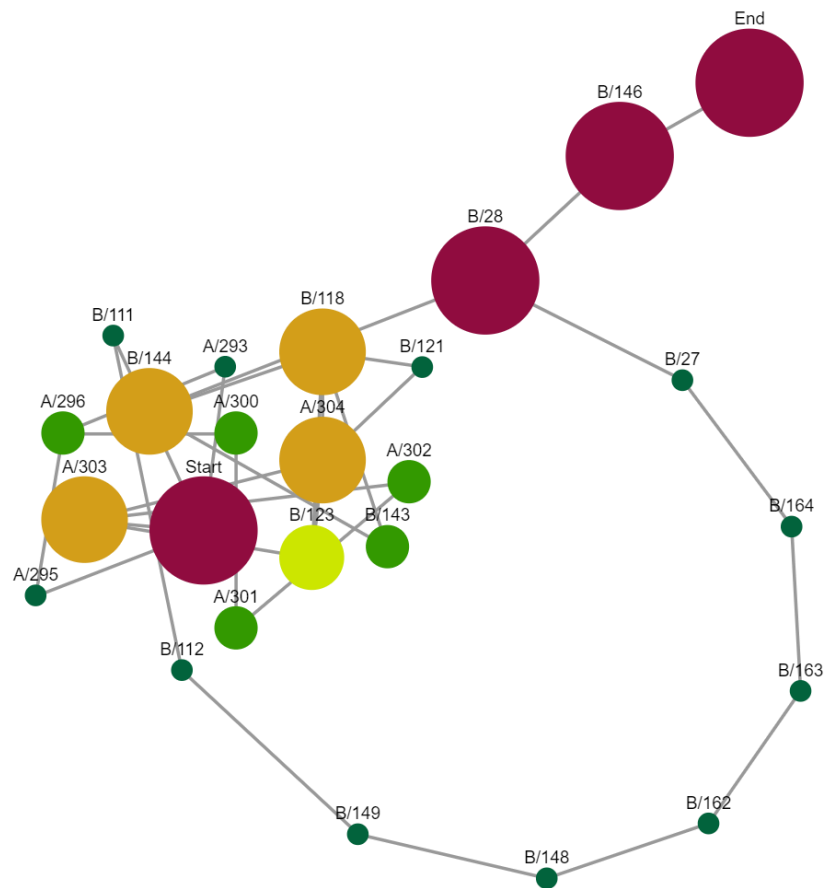


A

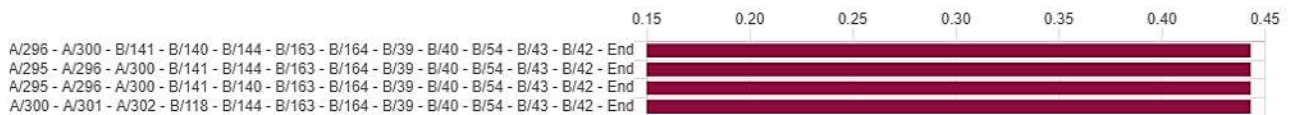


B

Figura 7. A) Red alostérica 1 tomada a los 60 ns de la SADM. Muestra los residuos críticos en las vías alostéricas de M^{pro} Apo con el ligante AT7519 predichas por Ohm. El radio de cada nodo nos indica la importancia del residuo en cuanto a su comunicación alostérica. El color rojo nos indica alta importancia mientras que el verde significa poca importancia. Cada nodo está etiquetado por el nombre de la cadena seguido del número de residuo. B) Pesos de las vías alostéricas más importantes de M^{pro} Apo.

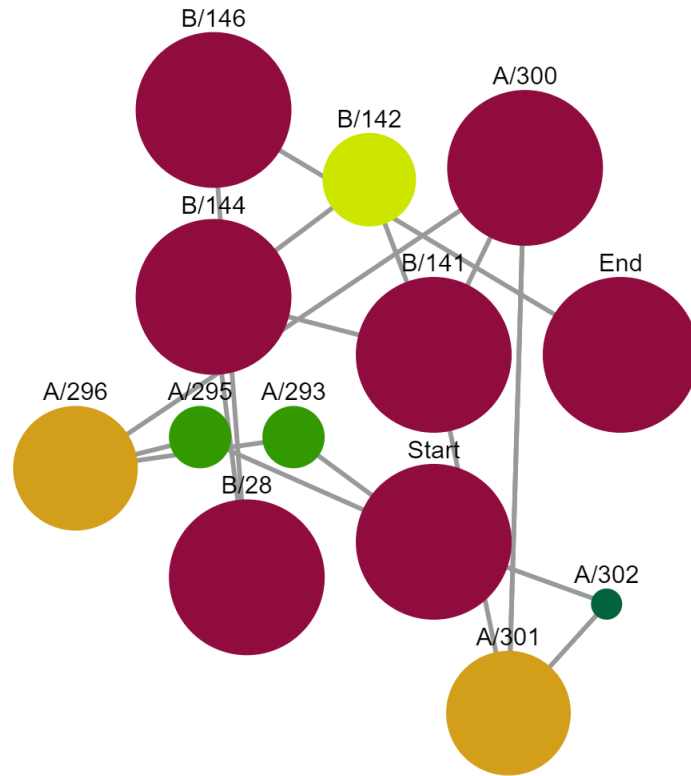


A



B

Figura 8. A) Red alostérica 2 tomada a los 120 ns de la SADM. Muestra los residuos críticos en las vías alostéricas de M^{pro} Apo con el ligante AT7519 predichas por Ohm. El radio de cada nodo nos indica la importancia del residuo en cuanto a su comunicación alostérica. El color rojo nos indica alta importancia mientras que el verde significa poca importancia. Cada nodo está etiquetado por el nombre de la cadena seguido del número de residuo. B) Pesos de las vías alostéricas más importantes de M^{pro} Apo.



A



B

Figura 9. A) Red alostérica 3 tomada a los 300 ns de la SADM. Muestra los residuos críticos en las vías alostéricas de M^{pro} APO con el ligante AT7519 predichas por Ohm. El radio de cada nodo nos indica la importancia del residuo en cuanto a su comunicación alostérica. El color rojo nos indica alta importancia mientras que el verde significa poca importancia. Cada nodo está etiquetado por el nombre de la cadena seguido del número de residuo. B) Pesos de las vías alostéricas más importantes de M^{pro} Apo.

La vía identificada con más frecuencia se considera la vía alostérica más probable. Para determinar la importancia relativa de cada vía alostérica en la comunicación, se asigna un peso específico a cada una. Estos pesos funcionan como indicadores de la relevancia de cada vía en la transmisión de señales alostéricas. Con base en la magnitud de los pesos asignados a cada vía alostérica, se identifican los residuos críticos que forman parte de las vías más importantes. Estos residuos críticos son aquellos que presentan un mayor impacto en la comunicación alostérica debido a su ubicación estratégica dentro de las vías de mayor relevancia.

Mediante el algoritmo se identificaron en el sitio alostérico I y II de M^{pro} Apo residuos relevantes: **Asn28, Tyr118, Leu141, Ser144, Gly146, Ser301, Gly302**. Los cuales participarían en los cambios conformaciones en el sitio activo de la proteasa M^{pro} y sus fluctuaciones transmitirían los cambios al sitio alostérico. Tras identificar los residuos críticos involucrados en las vías alostéricas más importantes, se llevó a cabo el análisis de RMSF para cada residuo crítico en los cinco tiempos de simulación seleccionados (60 ns, 120 ns, 180 ns, 240 ns y 300 ns). Este análisis permitió evaluar la flexibilidad individual de cada residuo crítico y su relación con la comunicación alostérica, proporcionando información sobre la estabilidad local de cada residuo y su potencial participación en la transmisión de señales alostéricas.

Este análisis se realizó considerando los residuos críticos identificados por el algoritmo Ohm: Asn28, Tyr118, Leu141, Ser144, Gly146, Ser301 y Gly302. Se incluyeron también los dos residuos del sitio activo, His41 y Cys145. El cálculo de RMSF se utilizó para corroborar la importancia de estos residuos en la comunicación alostérica. El análisis de las fluctuaciones del átomo C α de cada residuo permitió obtener valores que cuantificaron los cambios en la flexibilidad individual de cada residuo. A continuación, se presentan los resultados del análisis RMSF.

12.2 Análisis de los valores de RMSF

Las Figuras 10-13 representan los valores de RMSF calculados para cada residuo crítico en las diferentes condiciones de simulación M^{pro} Apo vs M^{pro} con inhibidor unido en el sitio alostérico I o II). Estas gráficas permiten visualizar los cambios en la flexibilidad individual de cada residuo y compararlos entre diferentes condiciones. De esta manera, se puede analizar si los residuos relevantes identificados por el algoritmo Ohm presentan valores de RMSF significativamente diferentes cuando M^{pro} tiene un inhibidor unido en su respectivo sitio alostérico I o II. Esto podría indicar que estos residuos participan en la transmisión de señales alostéricas y son sensibles a la presencia de inhibidores.

RMSF(CADENA A Y B)

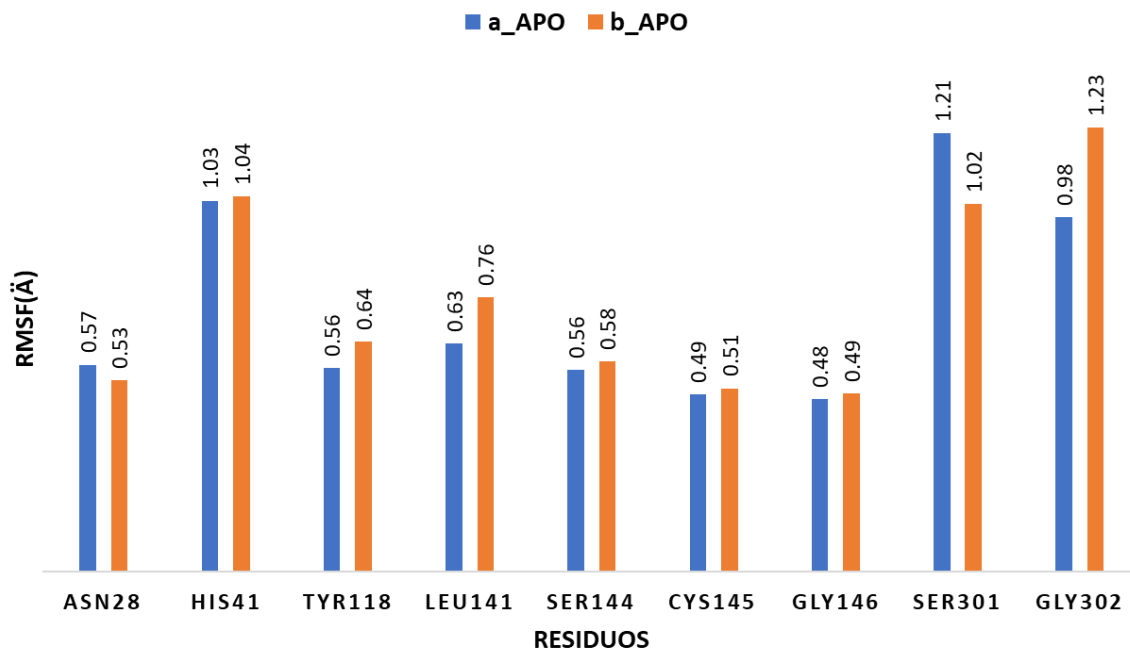


Figura 10. RMSF de los residuos de las cadenas a y b de la estructura de M^{pro} Apo. Cadena a (azul), cadena b (naranja).

RMSF_RS

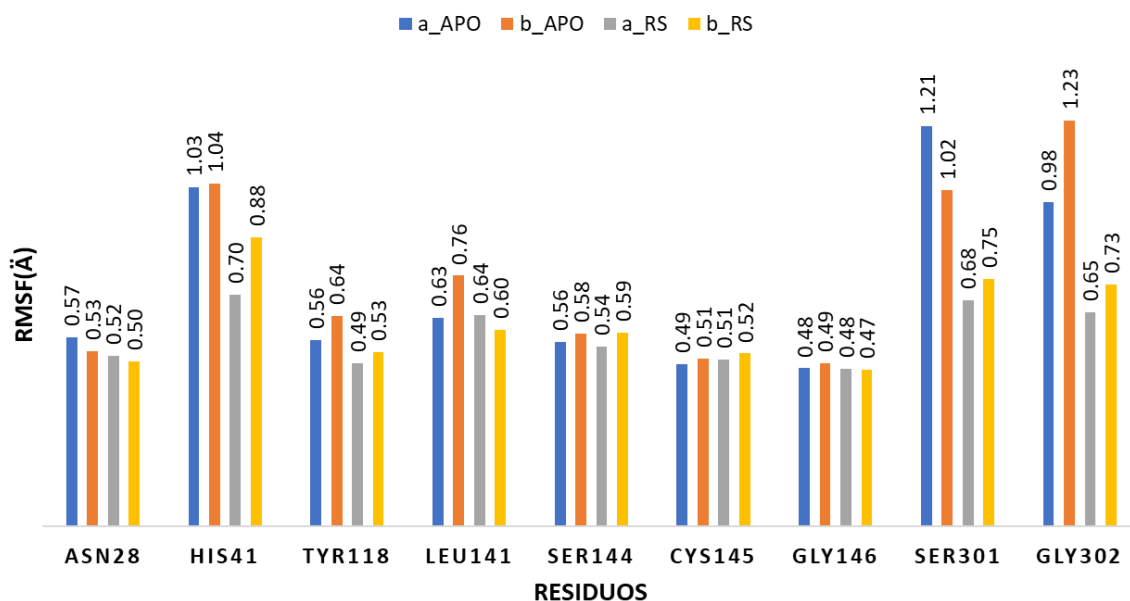


Figura 11. RMSF de los residuos de las cadenas a y b de M^{pro} unida al ligante RS102895 en el primer sitio alostérico I. En los residuos His41(sito activo), Ser301 (residuo obtenido en Ohm) y Gly302 (residuo obtenido en Ohm) se observa una disminución de hasta 30% de su valor de RMSF comparado con la estructura de M^{pro} Apo.

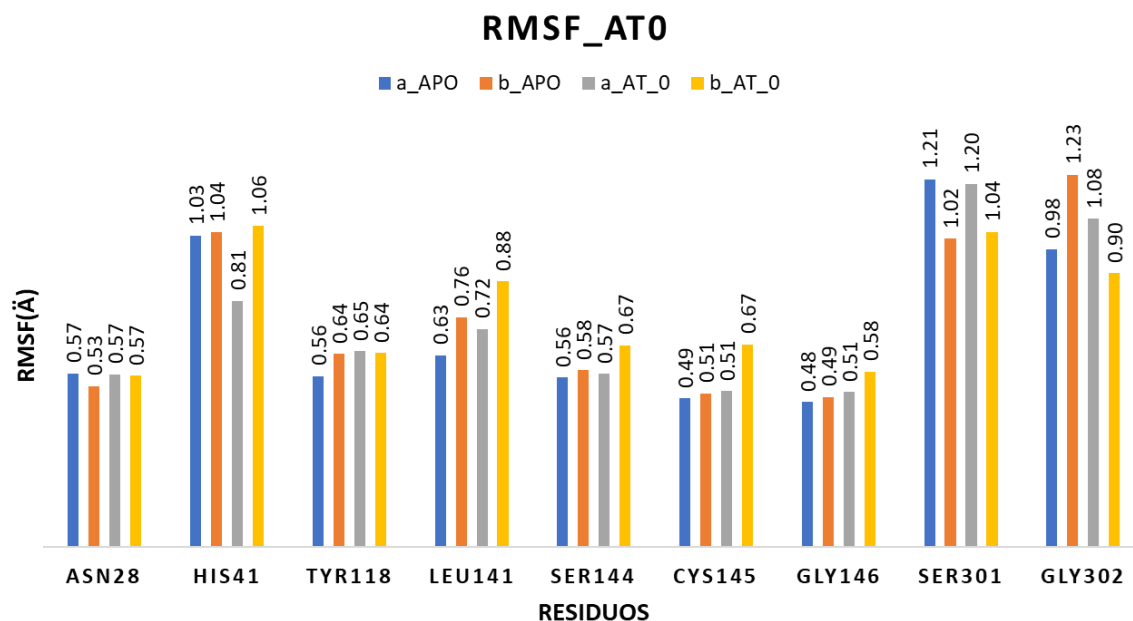


Figura 12. RMSF de los residuos de las cadenas a y b de M^{pro} unida al ligante AT7519 en el sitio alostérico II. En los residuos His41 (sitio activo), Ser301 (residuo obtenido en Ohm) y Gly302 (residuo obtenido en Ohm) se observa una disminución mínima de su valor de RMSF comparado con la estructura de M^{pro} Apo. Nótese que en el residuo de His41 continúa presentándose una disminución aproximada de 30% cuando el ligante está unido en la cadena a.

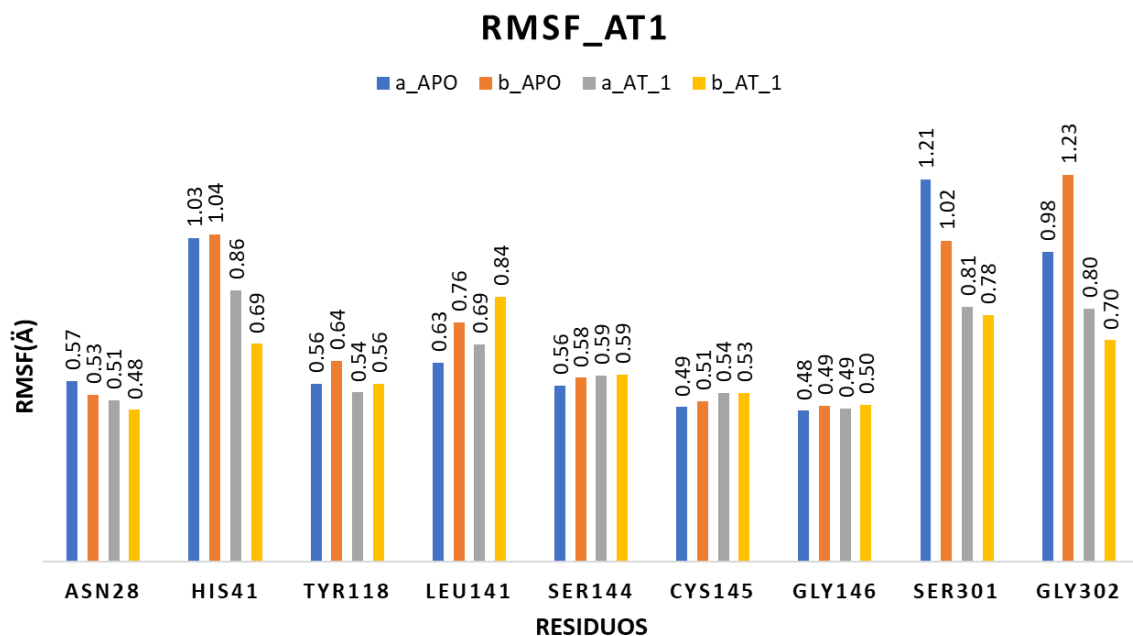


Figura 13. RMSF de los residuos de las cadenas a y b de M^{pro} unida al ligante AT7519 que tiene una carga neta de 1+ en el sitio alostérico II. En los residuos His41, Ser301 (residuo obtenido en Ohm) y Gly302 (residuo obtenido en Ohm) se observa una disminución significativa de su valor de RMSF comparado con la estructura de M^{pro} Apo. El residuo de His41 tuvo una disminución aproximada de 30% cuando el ligante está unido en la cadena a y del 67% en la cadena b.

Los resultados indican que los residuos His41 (sitio activo), Ser301 y Gly302 (ambos obtenidos en Ohm) experimentan alteraciones significativas tras la unión de los inhibidores alostéricos RS102895 y AT7519 en ambas cadenas de la estructura de M^{pro} (Figuras 10-13). Esta observación se fundamenta en la disminución del valor de RMSF, lo que sugiere una menor fluctuación de estos residuos, es decir, una reducción en su movilidad al unirse los ligantes.

El análisis de las trayectorias de SADM reveló otros residuos potencialmente relevantes que no fueron identificados en el análisis previo del algoritmo Ohm, los cuales presentan una disminución en sus valores de RMSF. En vista de esto, se tomó la decisión de analizar sus valores de RMSF para evaluar sus fluctuaciones en comparación con la proteína M^{pro} en estado Apo (Imagen 4).

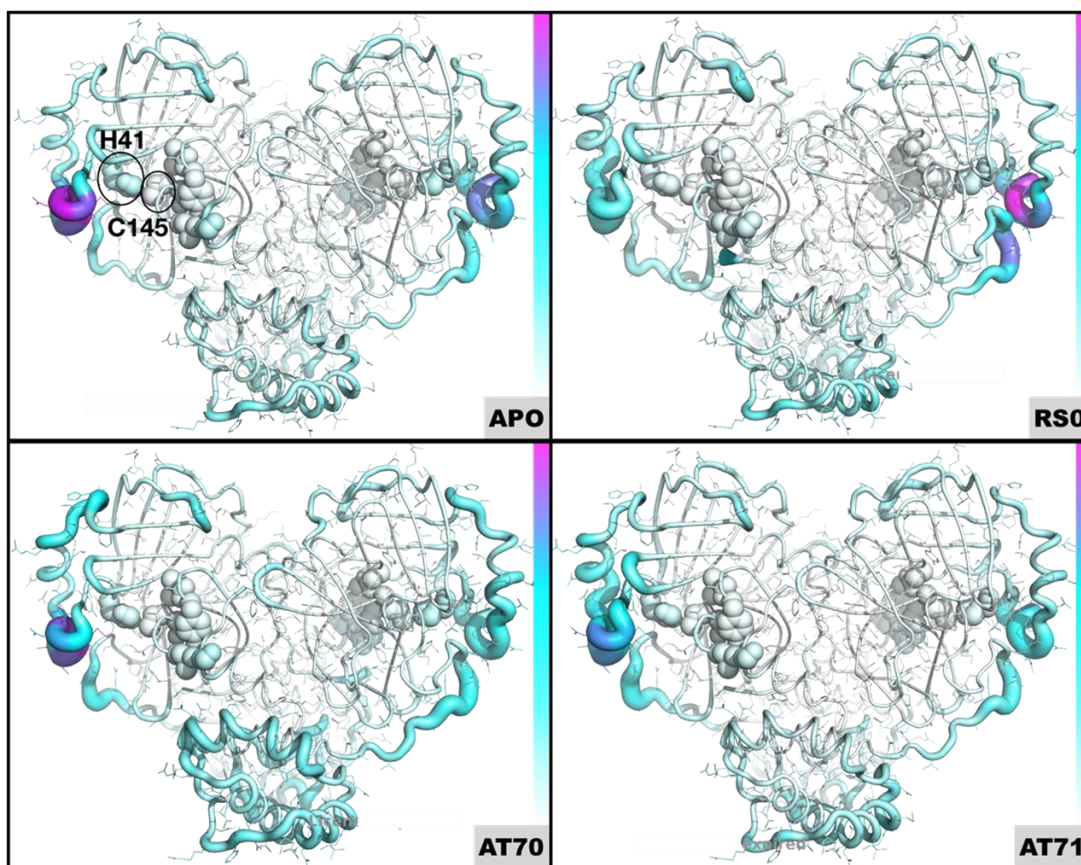


Imagen 4. Análisis de las regiones con los residuos de mayor fluctuación según los datos obtenidos por RMSF. En la imagen se muestra como mapa colorimétrico las regiones ricas en residuos con la mayor fluctuación comenzando con el magenta y terminando con el blanco. Las diferentes regiones se muestran sobre la estructura de M^{pro} Apo (sin ligante) y las estructuras de los inhibidores unidos a M^{pro} para el sitio alostérico I (RS0, sin carga) y para el sitio alostérico II AT70 (sin carga) y AT71 (con carga).

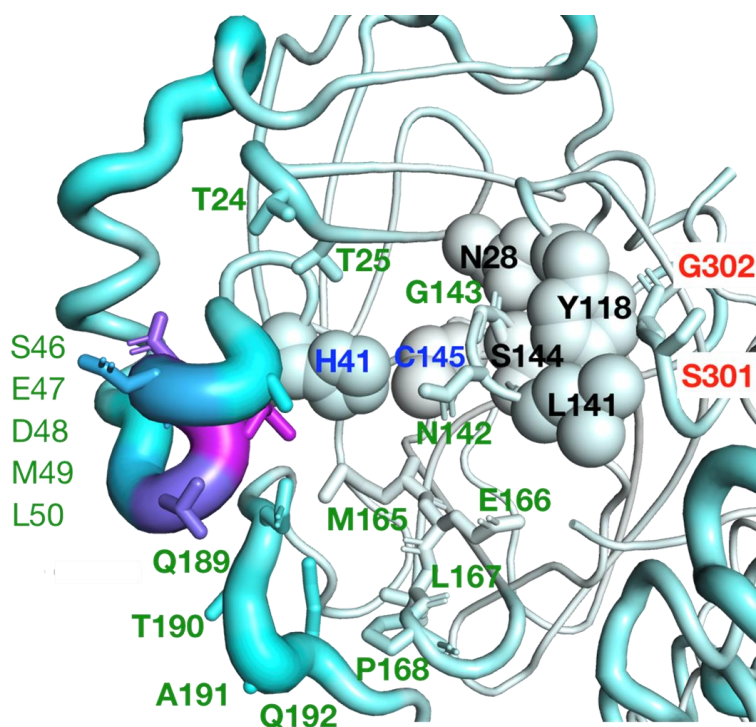


Imagen 5. Residuos importantes en la entrada al sitio catalítico de M^{pro}. En la figura se observa en azul aquellos residuos que forman parte del sitio activo, en negro y rojo aquellos residuos arrojados por el algoritmo de Ohm que son importantes en la conectividad de los sitios alostéricos hacia el sitio activo. En verde se muestran todos aquellos residuos observados durante las simulaciones atomísticas de dinámica molecular (SADM) que indican pueden ser importantes durante la interacción de los inhibidores alostéricos con la M^{pro}, dado que se ha observado los resultados de RMSF para estos residuos se alteran significativamente.

Tras la identificación de estos residuos relevantes mediante las trayectorias de SADM, analizamos su valor de RMSF el cual nos permitió cuantificar la importancia de cada residuo, evaluando su fluctuación a partir del carbono alfa de cada aminoácido.

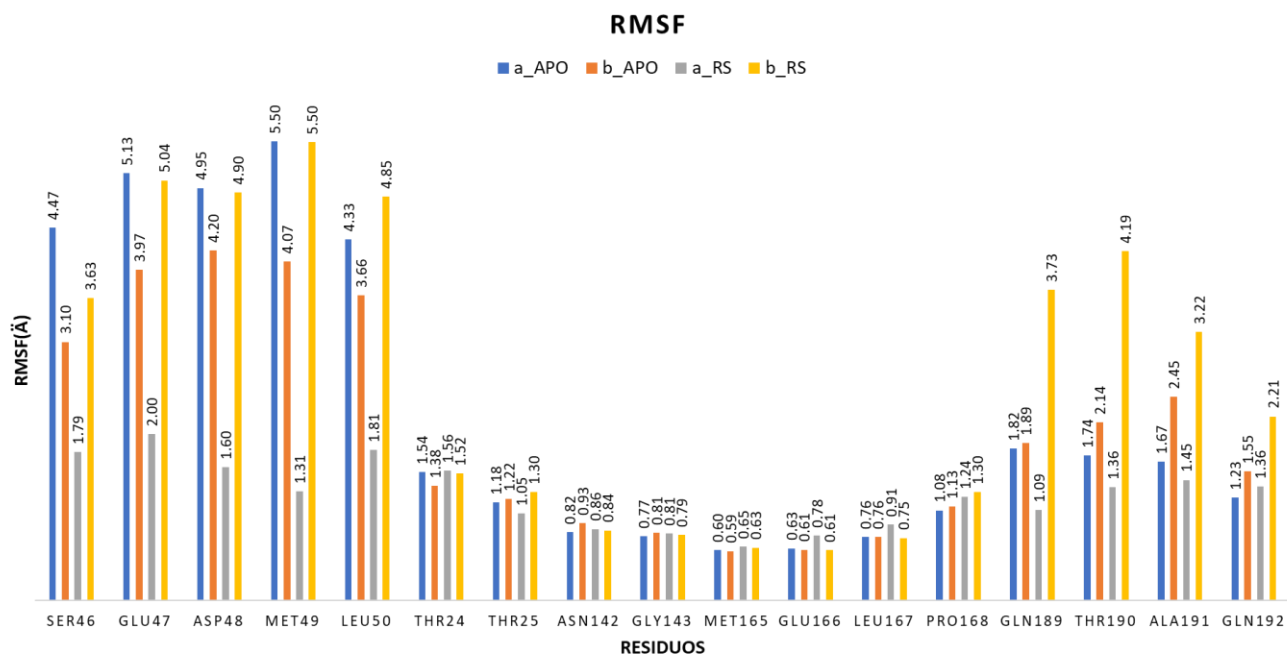


Figura 14. Residuos (Ser46, Glu47, Asp48, Met49, Leu50, Thr190, Ala191 y Gln192) observados durante las simulaciones atomísticas de dinámica molecular (SADM) los cuales se muestran importantes durante la interacción con el inhibidor alostérico RS102895, el cual se une en el sitio alostérico I de la M^{pro}, dado que sus valores de RMSF se alteran significativamente.

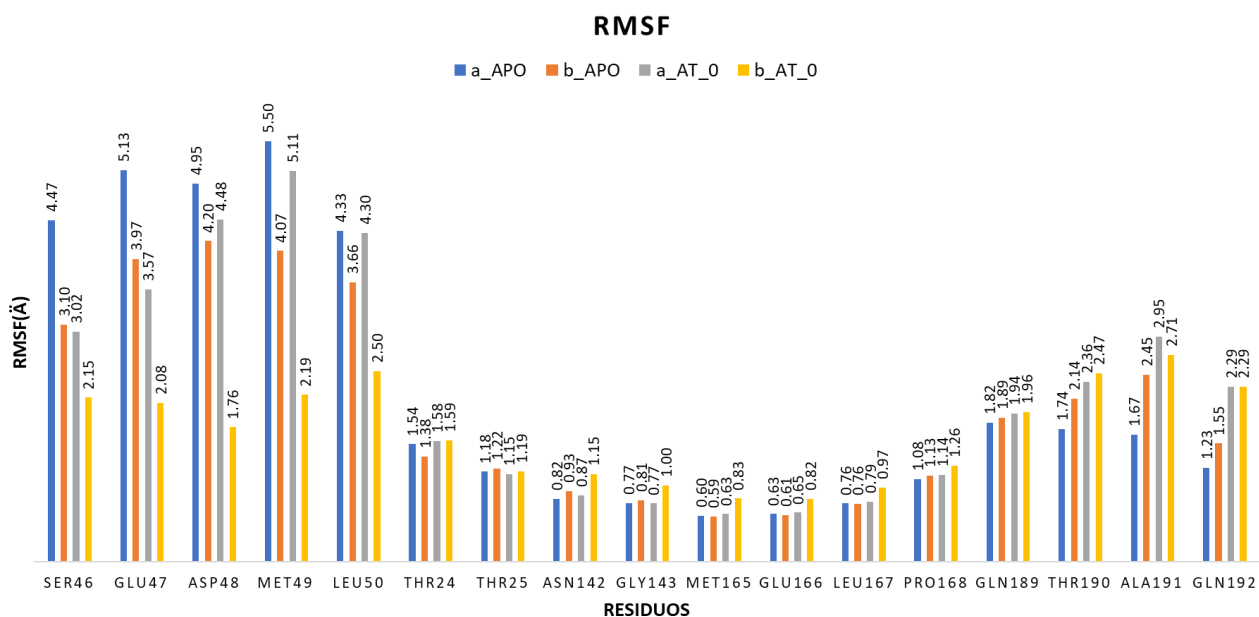


Figura 15. Residuos (Ser46, Glu47, Asp48, Met49, Leu50,) observados durante las simulaciones atomísticas de dinámica molecular (SADM) los cuales se muestran importantes durante la interacción con el inhibidor alostérico AT7519 no protonado el cual, se une en el segundo sitio alostérico de la M^{pro}, dado que sus valores de RMSF se alteran significativamente.

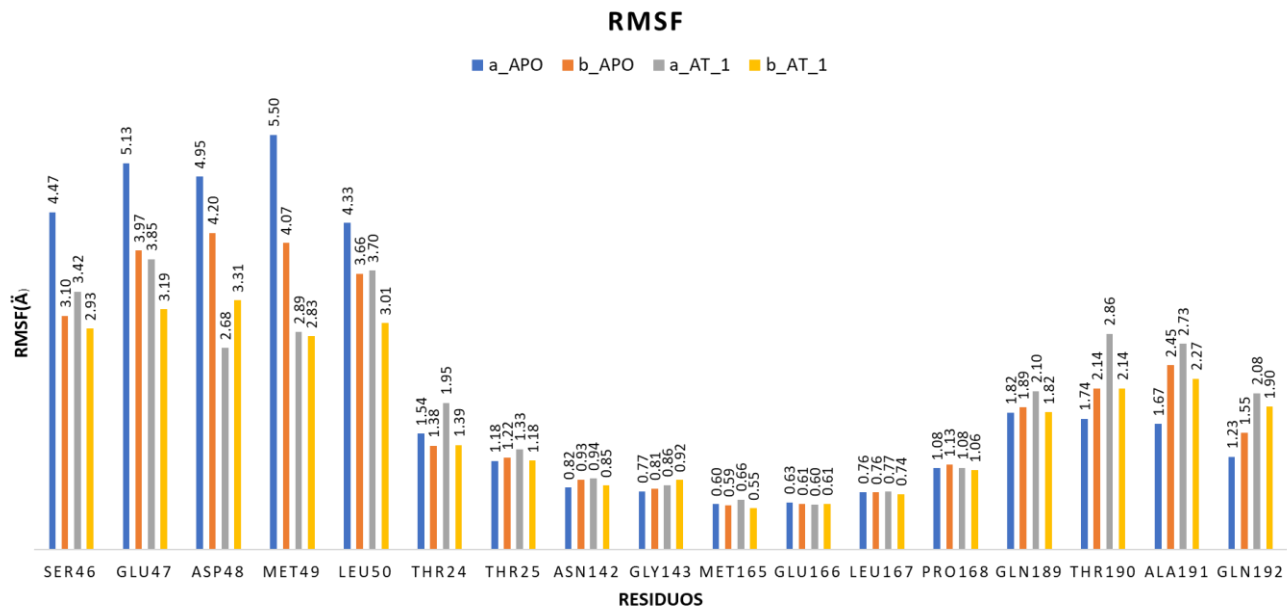


Figura 16. Residuos (Ser46, Glu47, Asp48, Met49, Leu50) observados durante las simulaciones atómicas de dinámica molecular (SADM), los cuales se muestran importantes durante la interacción con el inhibidor alostérico AT7519 protonado el cual se une en el segundo sitio alostérico de la M^{pro}, dado que sus valores de RMSF se alteran significativamente.

12.3 Modelo mecanístico estructural probable de la inhibición alostérica de M^{pro} por el inhibidor alostérico RS-102895 y AT7519

Con la finalidad de analizar e interpretar los cambios conformacionales en el sitio activo de M^{pro} en presencia de los inhibidores alostéricos RS-102895 y AT7519 llevamos a cabo tres pasos:

1. Medir la distancia entre el átomo S (SH) de Cys145 y el átomo N (NH₂) de His41 en M^{pro} Apo y M^{pro} con los inhibidores. El análisis visual sugiere un alejamiento

entre ellos, en algunas partes de la trayectoria que debería reflejarse en un incremento de la distancia entre estos dos átomos.

2. Medir la distancia entre el átomo N (NH₂) de His164 y el átomo de O (CO) de Asp187. Esta distancia involucra al residuo His164, y sugiere que la cadena lateral a veces se aproxima a los residuos His41 y Cys145, provocando probablemente un cambio de posición en las cadenas laterales de estos dos últimos.
3. Analizar los valores del ángulo diedro chi del residuo His41 (N- CA- CB- CG). Este parámetro muestra los cambios que ocurren en la cadena lateral de His41.

Las imágenes representativas construidas en Pymol se elaboraron para identificar visualmente algún cambio en la estructura de M^{pro} cuando tiene unidos a sus respectivos ligantes alostéricos. Esto permitió tener un punto de partida para los análisis cuantitativos y así tratar de dilucidar el mecanismo de inhibición.

Las siguientes imágenes muestran la estructura de M^{pro} Apo y M^{pro} con el ligante alostérico RS102895.

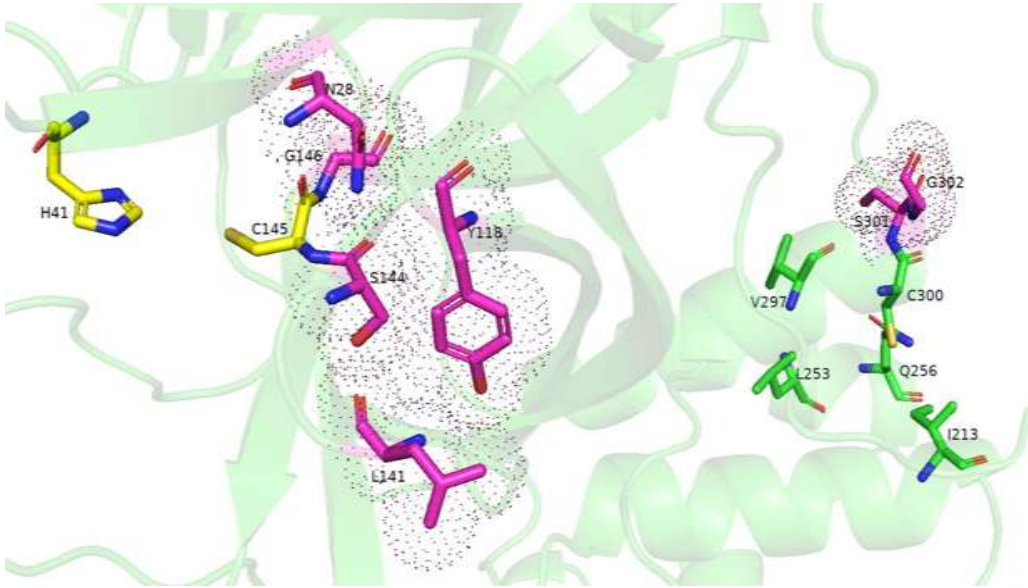


Imagen 6. En color amarillo los residuos del sitio activo; en color magenta los residuos identificados por el algoritmo Ohm y en color verde los residuos que forman parte del sitio alostérico I. Esta imagen se construyó a partir de M^{pro} Apo PDB:6Y2E a los 240 ns de la SADMD.

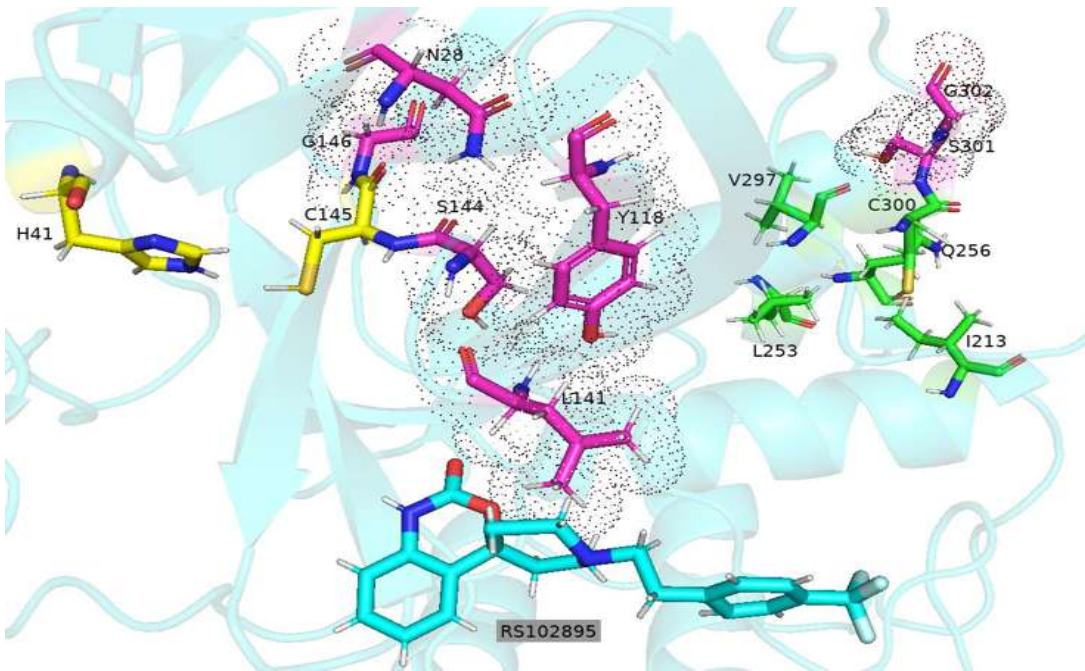


Imagen 7. En color amarillo los residuos del sitio activo; en color magenta los residuos identificados por el algoritmo Ohm y en color verde los residuos que forman parte del sitio alostérico I y en color cian la representación del ligante alostérico RS-102895. Esta imagen se construyó a partir de M^{pro} PDB:7ABU a los 240 ns de la SADMD.

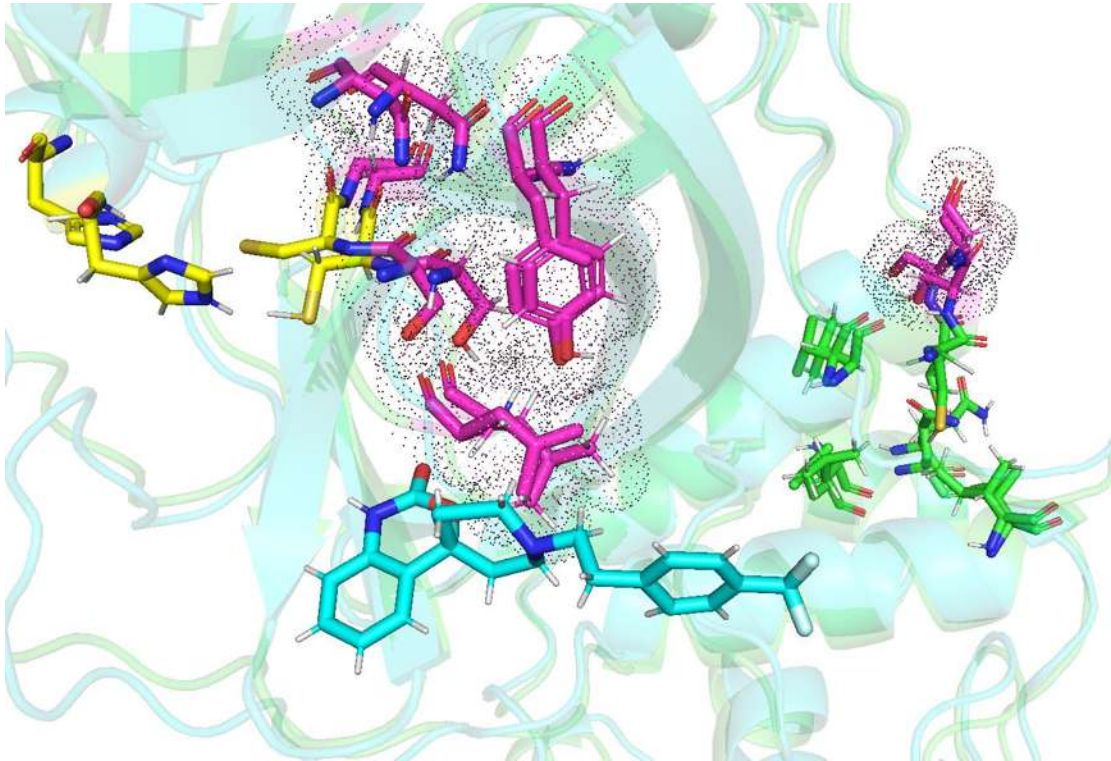


Imagen 8. Alineamiento de ambas estructuras de las Imágenes 6 y 7, donde se observa el cambio que tienen los residuos del sitio activo His41 y Cys 145.

Las imágenes siguientes se construyeron en Pymol, considerando la estructura de M^{pro} Apo y M^{pro} con el ligante AT7519 que se une al sitio alostérico II.

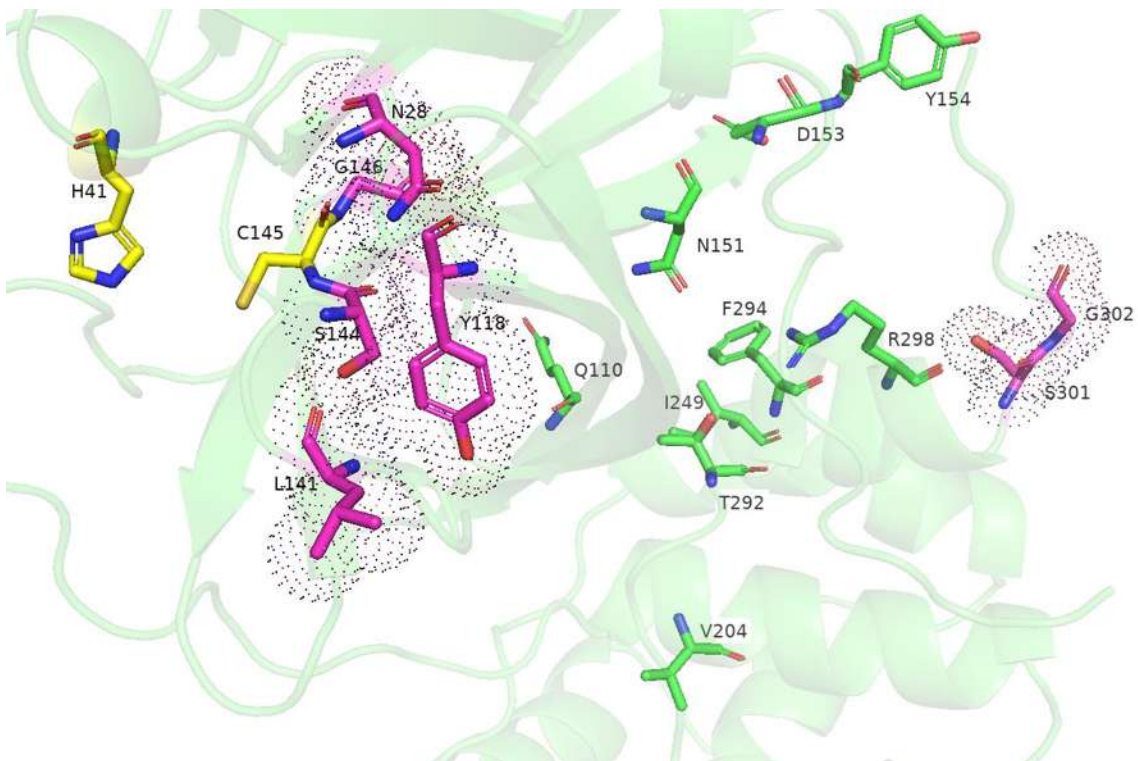


Imagen 9. En color amarillo los residuos del sitio activo; en color magenta los residuos identificados por el algoritmo de Ohm y en color verde los residuos que forman parte del sitio alostérico II. Esta imagen se construyó a partir de Mpro Apo PDB:6Y2E a los 240 ns de SADMD.

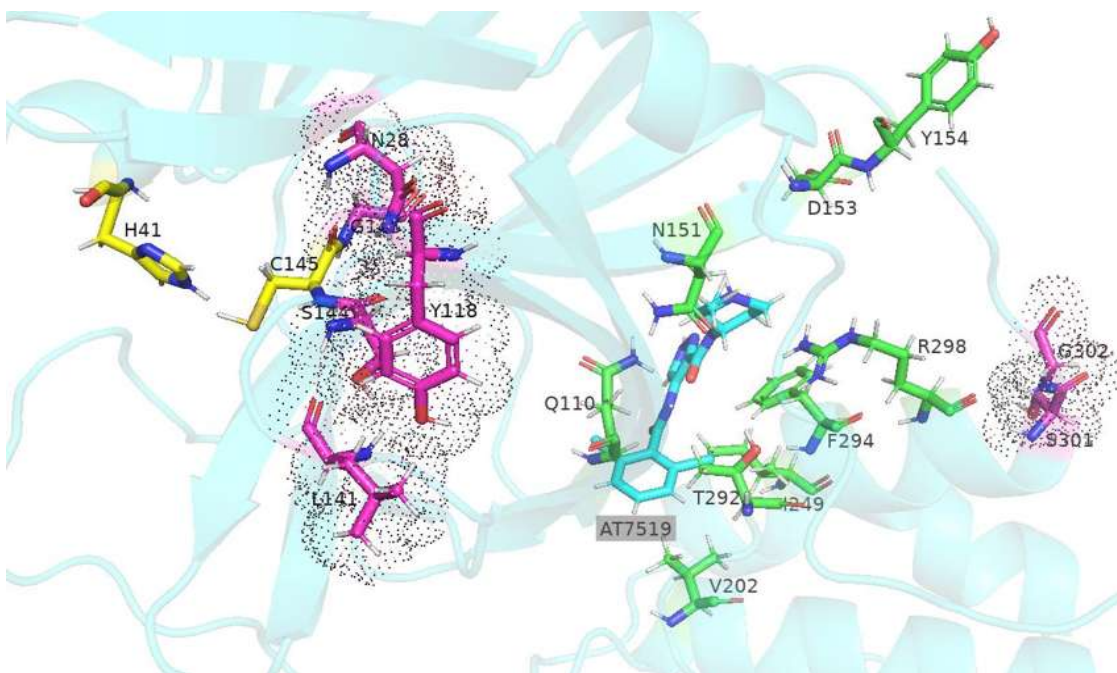


Imagen 10. En color amarillo los residuos del sitio activo, en color magenta los residuos identificados por el algoritmo de Ohm y en color verde los residuos que forman parte del segundo sitio alostérico

y en color cyan la representación del ligante alostérico AT7519. Esta imagen se construyó a partir de M^{pro} PDB:7AGA a los 240 ns de la SADM.

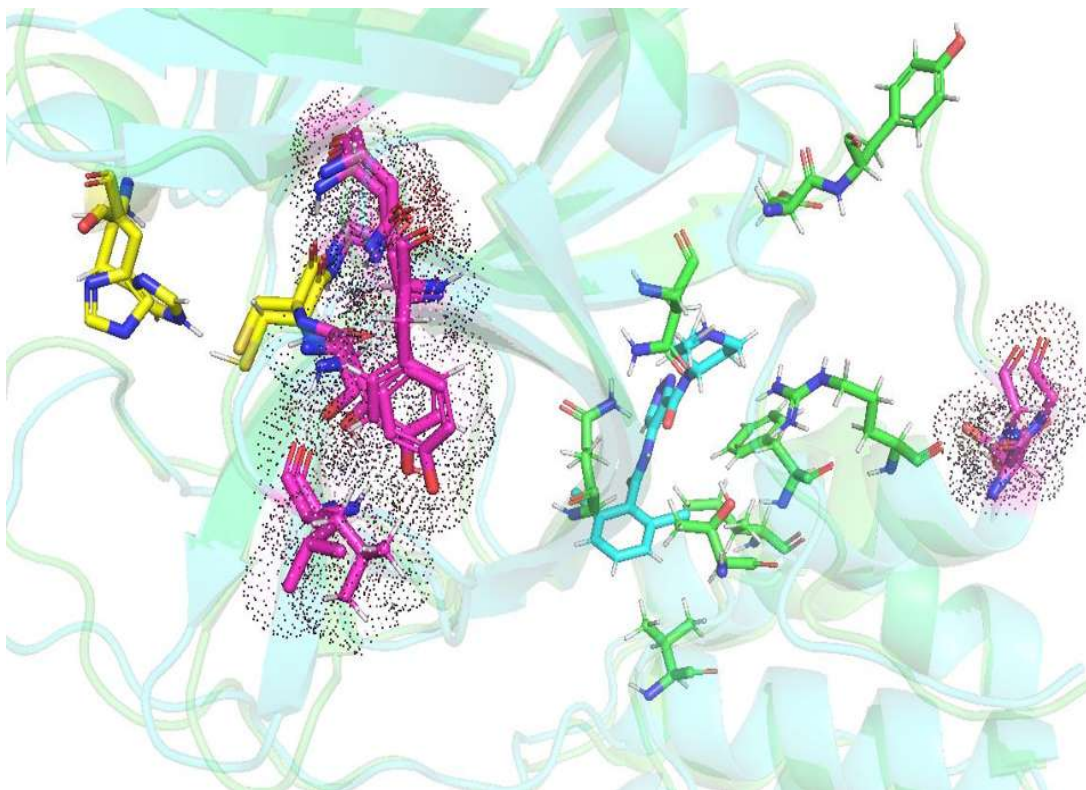


Imagen 11. Alineamiento de ambas estructuras 9 y 10, donde se observa el cambio que tienen los residuos del sitio activo His41 y Cys145.

A continuación, se realizó un análisis cuantitativo que nos permitiera medir la distancia entre el átomo S del SH correspondiente al residuo del sitio activo **Cys145** y el átomo N del NH₂ del residuo de **His41** (Imagen 12) en la posición sigma1 del anillo imidazol correspondiente al residuo del sitio activo. Se tomó como referencia la distancia óptima de **3.6 Å** entre los dos residuos del sitio activo, His41 y Cys145, para la formación del enlace por puente de hidrógeno.

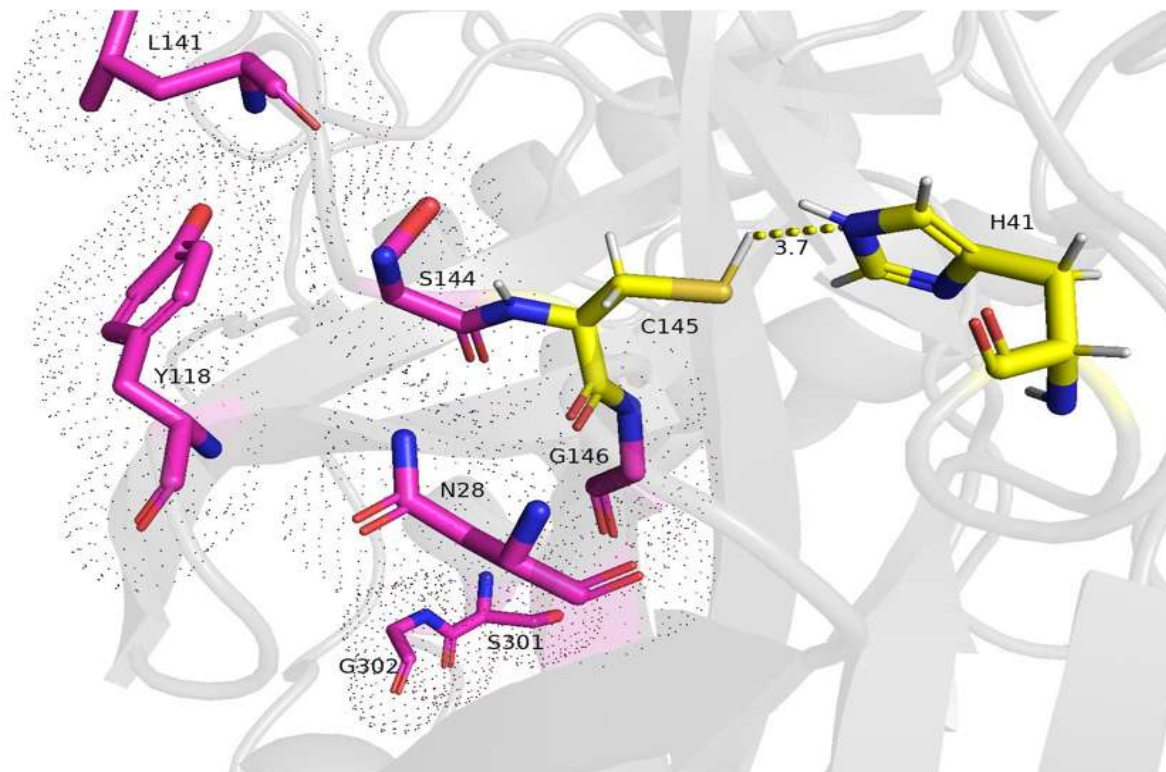


Imagen 12. Interacción en el residuo His41 y Cys145 del sitio activo, teniendo una distancia de 3.7 Å. En color amarillo los residuos del sitio activo y en magenta los residuos identificados por el algoritmo de Ohm. Se forma un puente de hidrogeno tras la unión del nitrógeno del anillo imidazol del residuo de His41 con el hidrogeno del azufre de la cadena lateral de la Cys145.

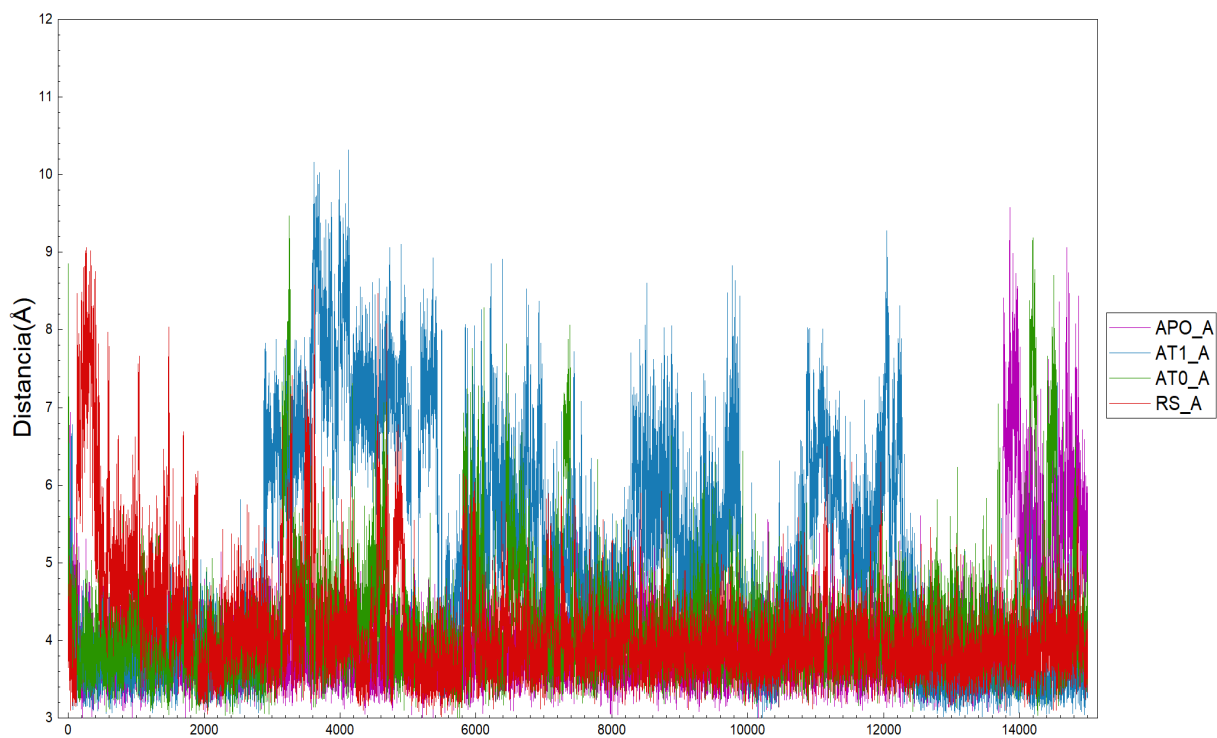


Figura 17. Distancia en Angstrom entre los dos residuos del sitio activo His41 – Cys145 (Cadena A) de M^{pro} Apo con ambos inhibidores alostéricos RS102895 (sitio alostérico I) y AT7519 (sitio alostérico II). En color magenta M^{pro} Apo, color azul AT7519-1, color verde AT7519-0, color rojo RS102895.

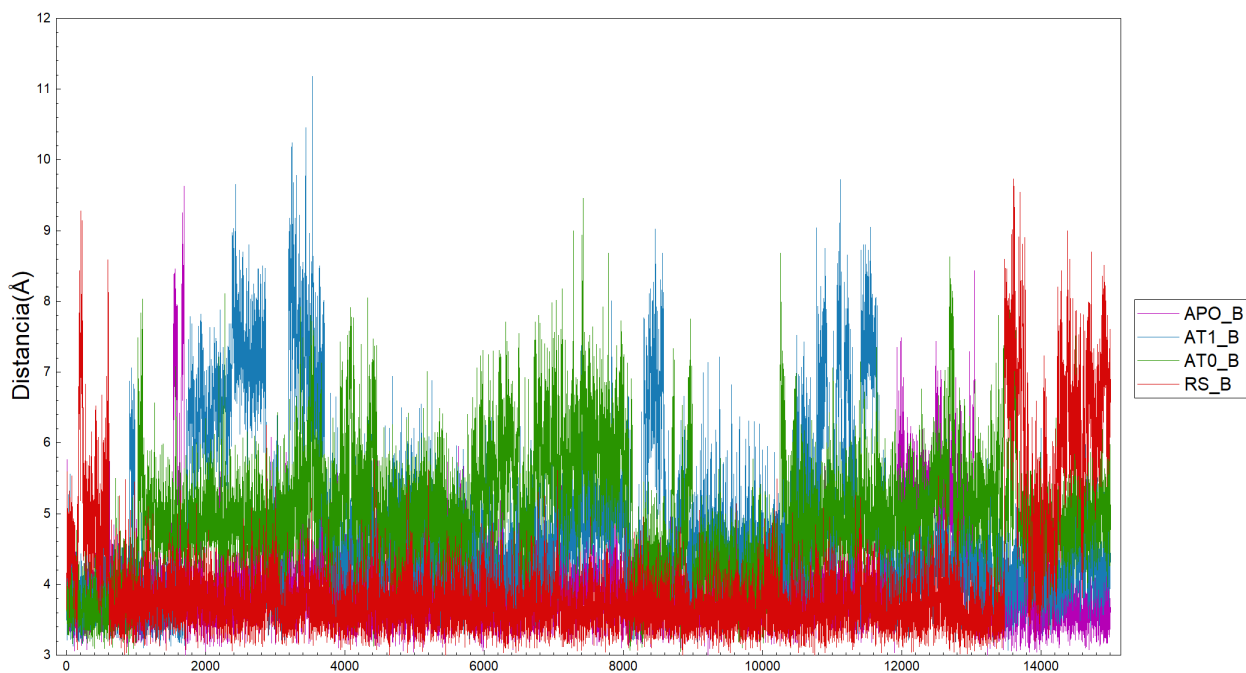


Figura 18. Distancia medida en angstrom entre los dos residuos del sitio activo His41 – Cys145 (Cadena B) de M^{pro} Apo, con ambos inhibidores alostéricos RS102895 (sitio alostérico I) y AT7519 (sitio alostérico II). En color magenta M^{pro} A, color azul AT7519-1, color verde AT7519-0, color rojo RS102895.

Después se realizó el mismo análisis de distancia, pero, ahora consideramos el grupo funcional NH_2 del residuo His164 en la posición sigma1 del anillo imidazol y átomo O del grupo carboxilato de la cadena lateral del residuo Asp187 (Imagen 13). Aunque estos residuos no forman parte de la diada catalítica sí influyen en la orientación correcta de los residuos His41 y Cys145 en el sitio activo. Esta alteración en la orientación probablemente provoca una disminución de la actividad catalítica de la enzima. Cuando se analizan los valores de las distancias entre los residuos His164– Asp187 en presencia de RS102895 y AT7519 es posible observar que aumenta la distancia durante la SADM, en comparación con las distancias cuando M^{pro} tiene los inhibidores unidos (Figuras 19 y 20). En contraste las distancias entre His41 y Cys145 disminuyeron cuando los inhibidores RS102895 y AT7519 se encontraban unidos a M^{pro} (Figuras 17 y 18).

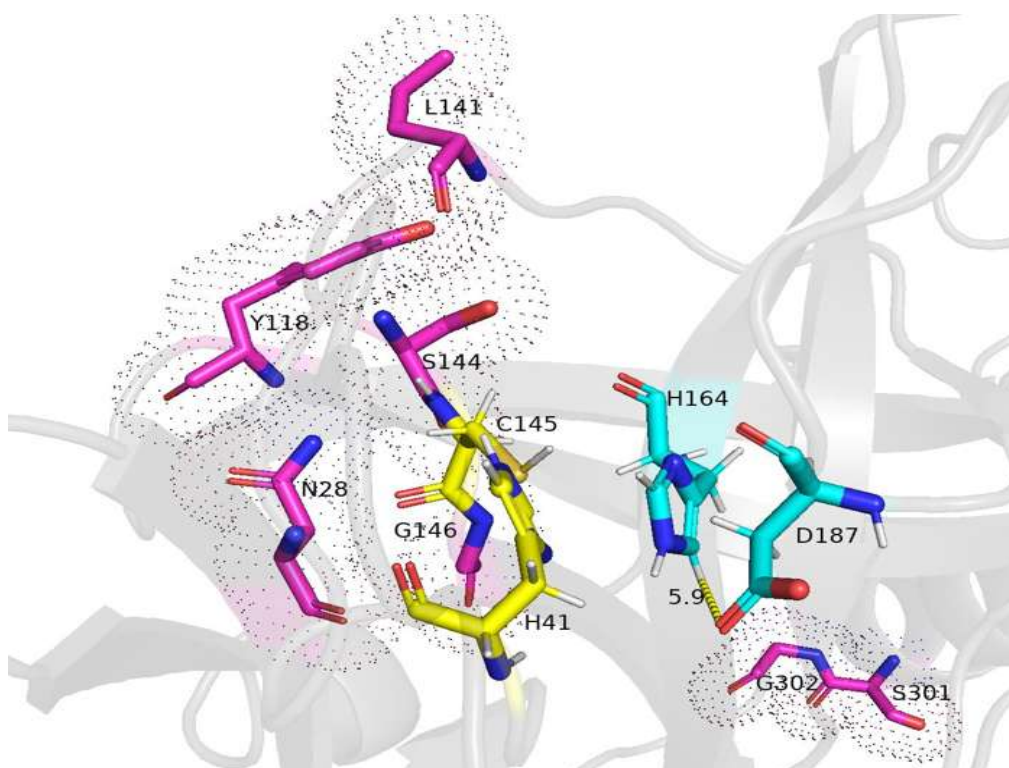


Imagen 13. Puente de hidrogeno His164-Asp187. Se representa el puente de hidrogeno que se establece entre la His164(marcada en color cian) y el Asp187(marcado en color magenta) cerca del sitio activo de la proteasa SARS-CoV-2. Esta interacción no covalente estabiliza la conformación activa de la enzima además de ser esencial para su función catalítica.

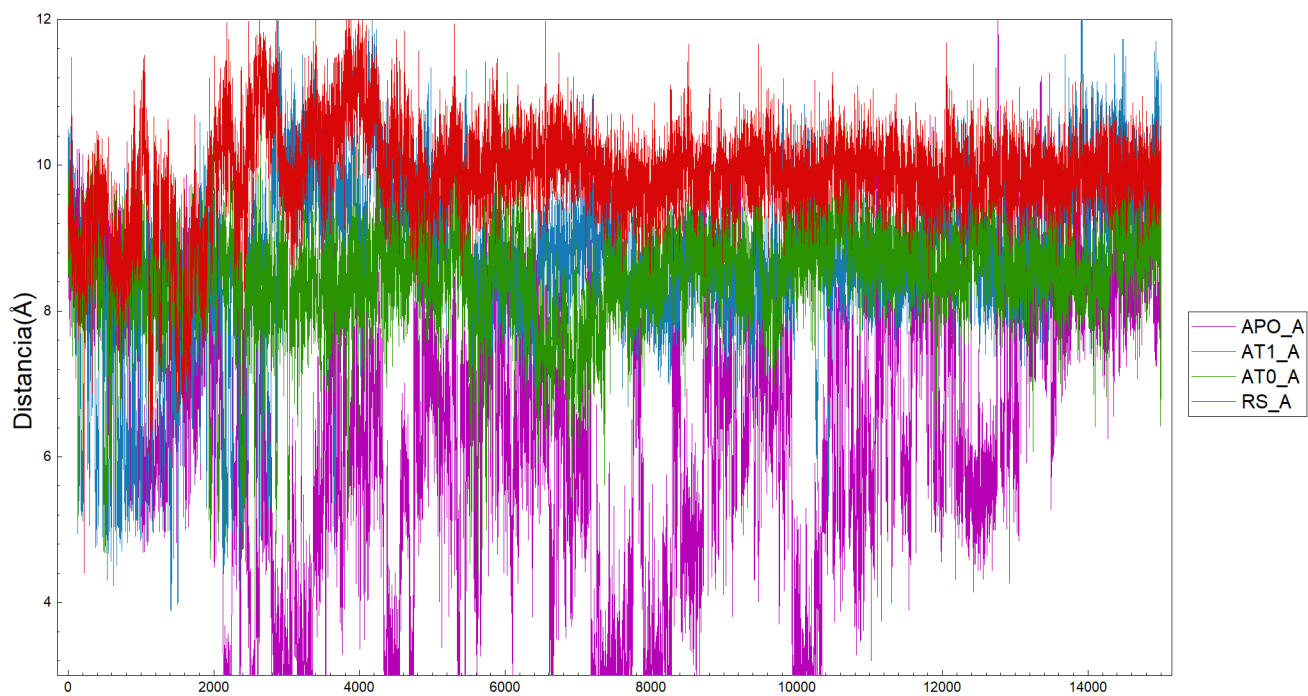


Figura 19. Distancia medida en angstrom entre los dos residuos del sitio activo His167 – Asp187 (Cadena A) de M^{PrO} Apo, con ambos inhibidores alostéricos RS102895 (sitio alostérico I) y AT7519 (sitio alostérico II). En color magenta M^{PrO} Apo, color azul AT7519-1, color verde AT7519-0, color rojo RS102895.

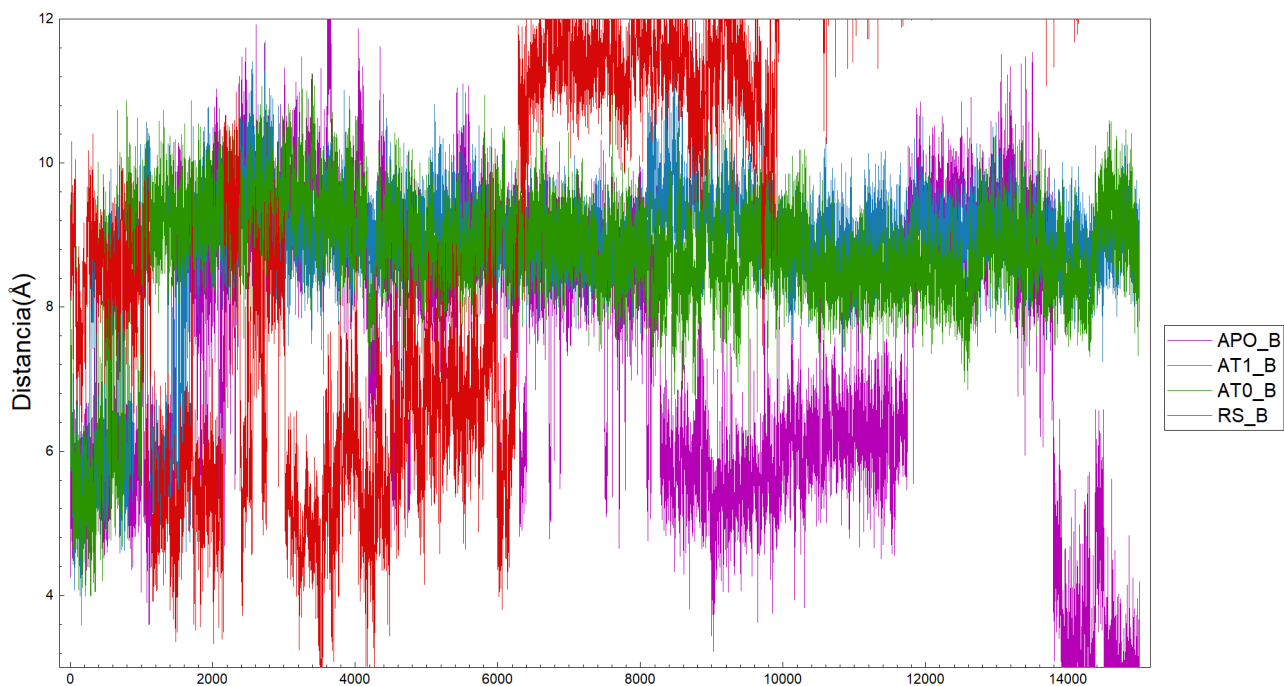


Figura 20. Distancia medida en angstrom entre los dos residuos del sitio activo His167 – Asp187 (Cadena B) de M^{pro} Apo, con RS102895 (sitio alostérico I) y AT7519 (sitio alostérico II). En color magenta M^{pro} Apo, color azul AT7519-1, color verde AT7519-0, color rojo RS102895.

El análisis de la distancia entre His41 y Cys145 evidenció que, en presencia de los ligantes alostéricos RS102895 y AT7519, la distancia entre ambos residuos aumenta. Este aumento en la distancia se atribuye a la influencia de los residuos His164 y Asp187, los cuales, al reorientarse debido a la unión del ligando, modifican la conformación de la diada catalítica.

12.4 Fluctuación de los rotámeros del residuo His41 en presencia de los ligantes alostéricos

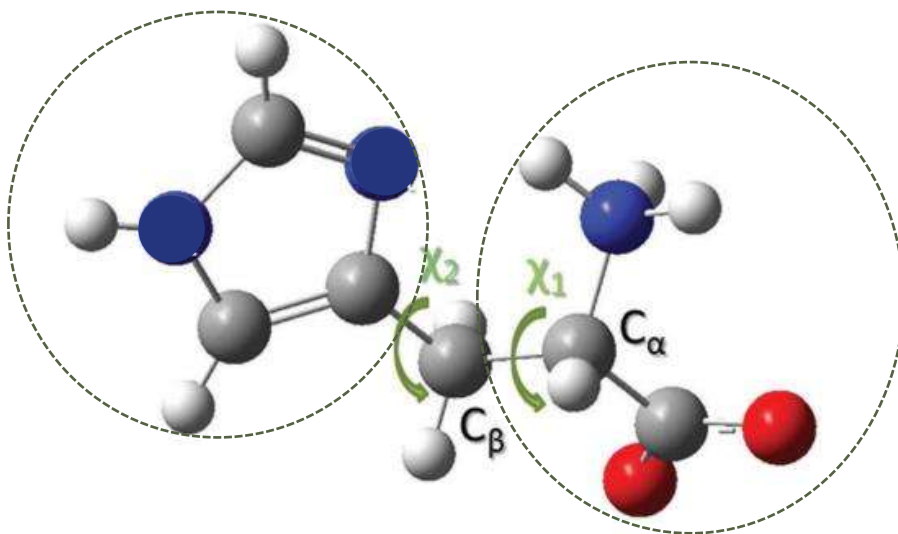
Con el objetivo de profundizar en la importancia de His41 en presencia de los inhibidores RS102895 y AT7519, se realizó un análisis del ángulo diedro chi del residuo His41 (N-CA-CB-CG). Este análisis permitió visualizar los cambios que ocurren en la cadena lateral de His41, la cual forma parte del sitio activo y también resultó ser importante en las redes de comunicación alostérica identificadas

mediante el algoritmo Ohm. Debido a que el residuo His41 puede formar dos ángulos diedros, con átomos unidos al carbono alfa y el anillo imidazol, se eligió el adjunto al C α , para nuestro análisis.

Este estudio consistió primeramente en analizar el comportamiento del ángulo de His41 de M^{pro} Apo para las cadenas A y B, como se ilustra en la Figura 21. Al inicio de la SADM, el ángulo diedro de la His41 mostró oscilaciones a 7° aproximadamente en tiempos de hasta 50 ns (cadena A) y 25 ns (cadena B). Posteriormente, el ángulo se estabilizó en torno a los 15° a partir de los 75 ns (cadena A) y 50 ns (cadena B), respectivamente, y se mantuvo así hasta el final de la simulación (300 ns). Este hallazgo es congruente con el resultado sobre la estabilidad de la cadena lateral de His41 y coincide con los resultados del análisis de distancia entre His41 y Cys145 en M^{pro} Apo (Figuras 10-11 y 17-18), demostrando que, además de la distancia y la disposición espacial correctas, ambos residuos también requieren una orientación específica en su ángulo de inclinación para mantener la función catalítica durante el proceso de escisión de las poliproteínas de SARS-CoV-2. Este resultado es contrastante con el análisis de las fluctuaciones del ángulo diedro de His41 de M^{pro} en presencia del inhibidor alostérico AT7519_0 (no protonado) y AT7519_1 (protonado) para ambas cadenas (A y B) como se ilustra en las Figuras 22 y 23.

Los resultados de este análisis mostraron que en presencia del inhibidor AT7519 del sitio alostérico II, el ángulo diedro de la His41 asumía rápidamente un valor diferente con respecto al ángulo diedro de la His41 en la estructura de M^{pro} Apo (Figura 21), demostrando que la cadena lateral de la His41 tiene una fluctuación mayor a lo largo de todo el tiempo de la simulación, con valores en un intervalo de 170° a -180° para ambas cadenas. Estos datos sugieren que la unión del inhibidor AT7519 (protonado y no protonado) al sitio alostérico II de las cadenas A y B de M^{pro}, causa un rearrreglo conformacional en la cadena lateral de His41, alterando la arquitectura del sitio activo. Es posible que la propagación de perturbaciones de la red de comunicación alostérica orquestada por los residuos His167 – Asp187 influyen en la correcta orientación de los residuos His41 y Cys145 en el sitio activo. Por otra parte, el análisis del ángulo diedro de la His41 de M^{pro} en complejo con el

inhibidor RS102895 del sitio alostérico I (Figura 24), permitió observar que los cambios ocurridos en la cadena lateral de la His41 no fluctuaron drásticamente manteniéndose valores promedio de 9° y 10° en la cadena A y entre 9° y 18° en la cadena B. Estos valores son similares a los obtenidos para la His41 de M^{pro} Apo, lo cual indicaría que la fluctuación en el ángulo diedro de la His41, no se deba únicamente a los residuos His167 y Asp187, sino también a los residuos Ser301 y Gly302. Estos últimos dos residuos resultaron ser importantes en los análisis de la red alostérica obtenidos de Ohm y que fueron confirmados posteriormente con los análisis de RMSF en la SADM.



A

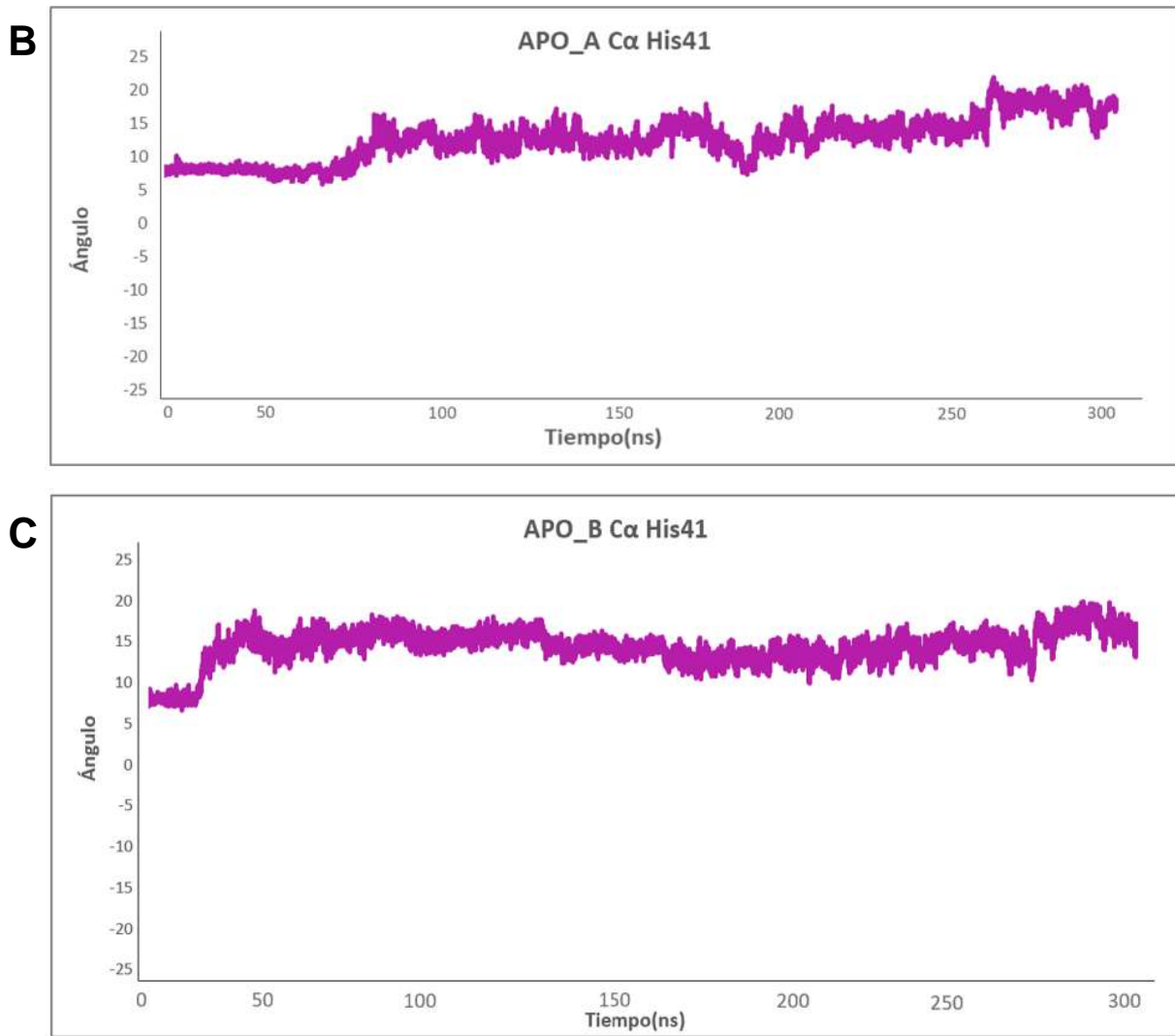


Figura 21. La His41 puede formar dos ángulos diedros: Átomos unidos al C α y al anillo imidazol A). Valores del ángulo diedro de la His41 de M^{pro} con respecto al tiempo de simulación en ns. **B)** Ángulo diedro Chi de la His41 de M^{pro} Apo en la cadena A. **C)** Ángulo diedro Chi de la His41 de M^{pro} Apo en la cadena B.

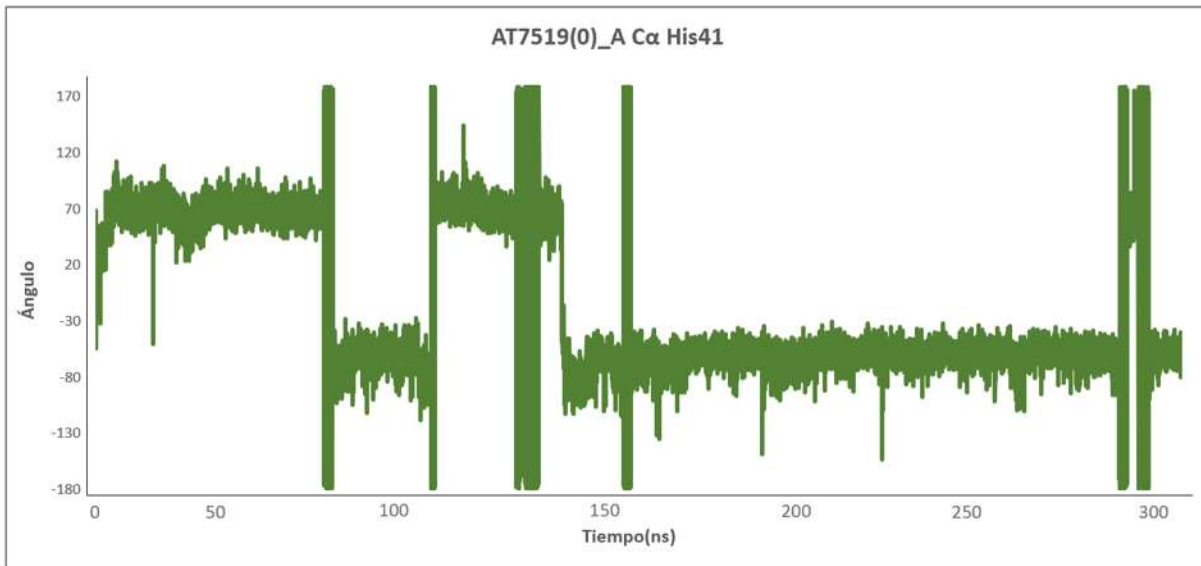
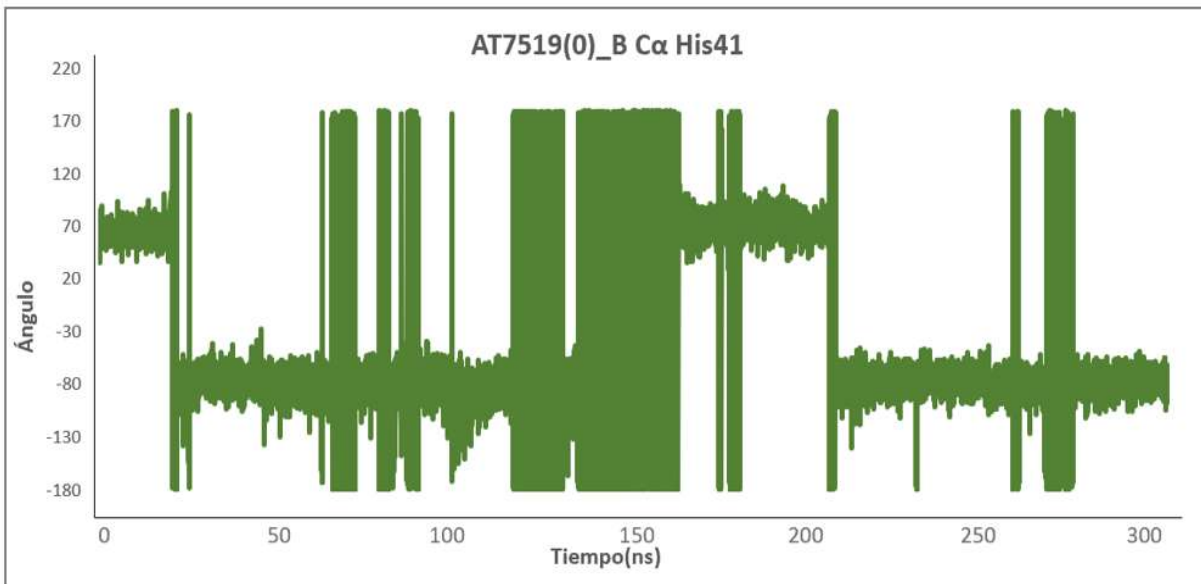
A**B**

Figura 22. Valores del ángulo diedro de His41 de M^{pro} con respecto al tiempo de simulación en ns. A) Ángulo diedro Chi His41 de M^{pro} en complejo con el inhibidor alostérico AT7519 (no protonado), cadena A. B) Ángulo diedro Chi His41 de M^{pro} en complejo con el inhibidor alostérico AT7519 (no protonado), cadena B.

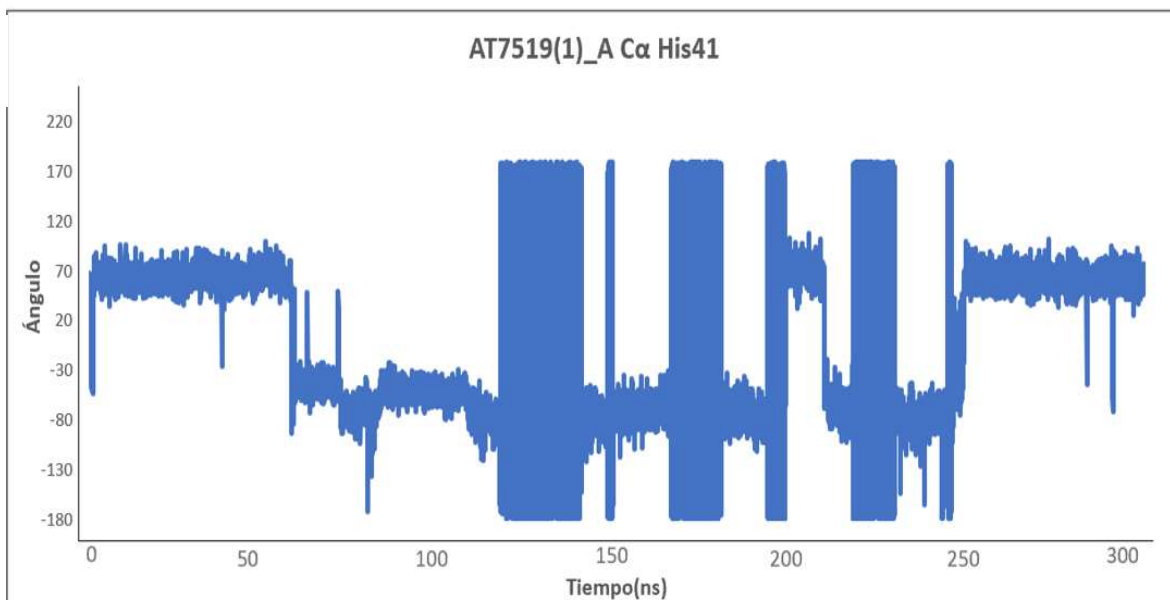
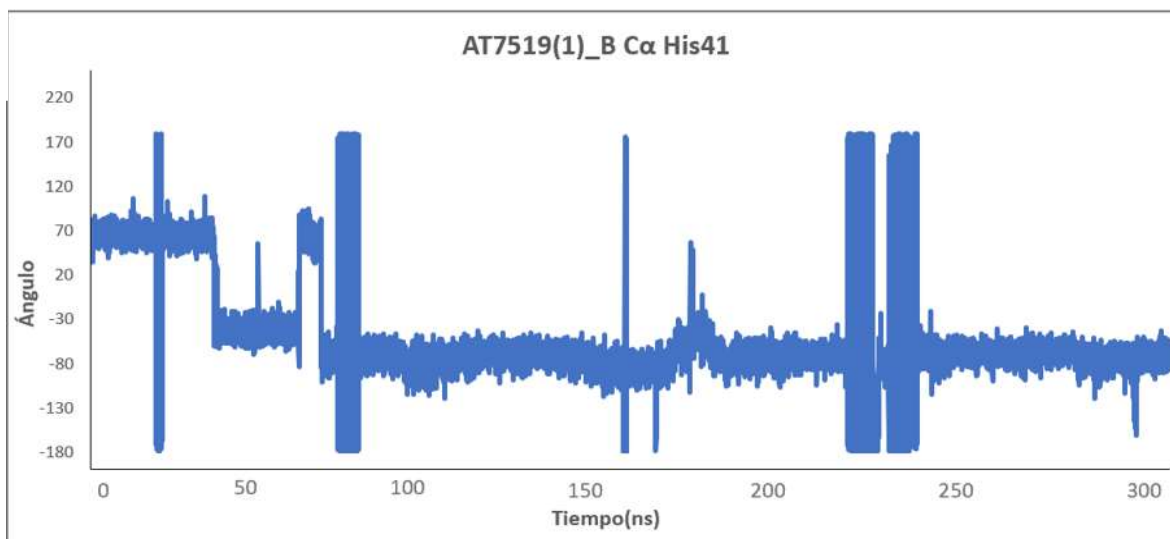
A**B**

Figura 23. Valores del ángulo diedro de His41 de M^{Pro} con respecto al tiempo de simulación en ns. A) Ángulo diedro Chi His41 de Mpro en complejo con el inhibidor alostérico AT7519 (protonado), cadena A. B) Ángulo diedro Chi His41 de M^{Pro} en complejo con el inhibidor alostérico AT7519 (protonado), cadena B.

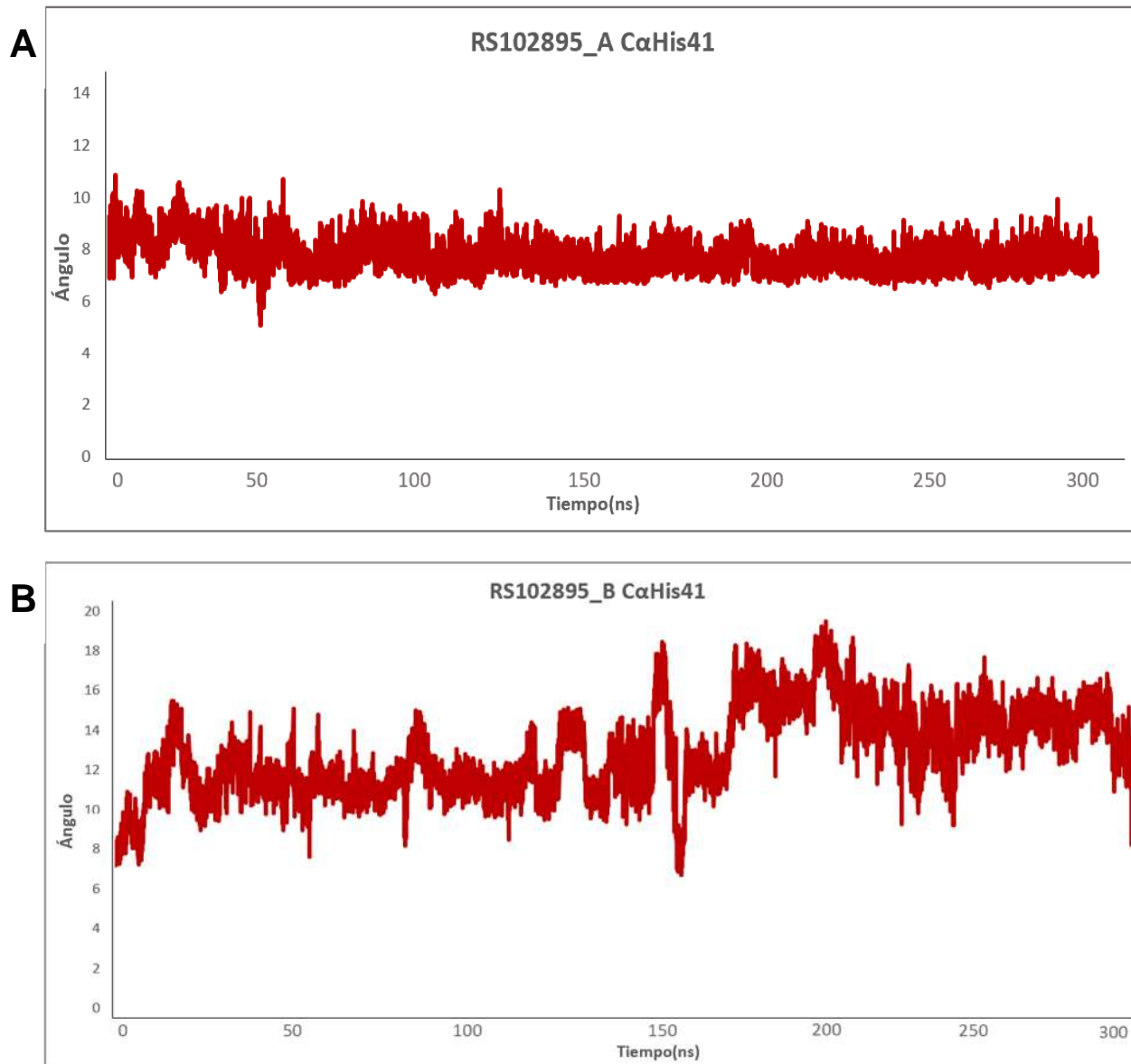


Figura 23. Valores del ángulo diedro de His41 de M^{Pro} con respecto al tiempo de simulación en ns. A) Ángulo diedro Chi His41 de M^{Pro} en complejo con el inhibidor alostérico RS102895, cadena A. B) Ángulo diedro Chi His41 de M^{Pro} en complejo con el inhibidor alostérico RS102895, cadena B.

13. Discusión

“Si he sido capaz de ver más lejos, es porque me he apoyado sobre los hombros de gigantes”

Isaac Newton

(Filósofo, inventor y matemático Ingles).

El desarrollo de fármacos efectivos y específicos ha sido un desafío constante en el campo de la química medicinal. La mayoría de los fármacos disponibles en la actualidad actúan directamente sobre el sitio activo de las proteínas, el punto donde una molécula se une para activar o inhibir la proteína involucrada en una enfermedad. Sin embargo, este enfoque presenta limitaciones significativas, ya que los sitios activos de muchas proteínas comparten similitudes estructurales, lo que puede generar efectos secundarios no deseados. En este contexto, la alostería emerge como una alternativa prometedora, en la cual las moléculas pueden modular la actividad de las proteínas sin interactuar directamente con el sitio activo. La alostería es un fenómeno por el cual un cambio en un sitio específico de una proteína, denominado sitio alostérico, puede afectar la función de otro sitio distante, denominado sitio activo. Esta comunicación a distancia se produce a través de una red de interacciones entre residuos de la proteína, lo que permite amplificar o modular la señal original.

Las proteínas funcionan como engranajes interconectados en las vías celulares, por lo que sus cambios conformacionales impactan en la célula. Hasta la fecha, los estudios sobre alostería se han centrado en los efectos en proteínas individuales y su entorno inmediato. Siendo de gran importancia abordar este tema desde una perspectiva de “biología de sistemas” ya que nos ayudaría a vincular los eventos alostéricos de ganancia de función a nivel de una sola molécula con los síndromes de enfermedad a nivel celular y de organismo. La alostería es una propiedad del conjunto conformacional de la proteína, donde la perturbación en cualquier sitio altera la distribución de estados conformacionales en toda la población (Fenwick *et al.*, 2011). Las perturbaciones estructurales alostéricas solo modifican las

distribuciones relativas de los estados dentro del conjunto (Kumar *et al.*, 2000). Estas interacciones remotas inducen cambios en el sitio funcional mediante la propagación de perturbaciones que generan cambios conformacionales sutiles a través de aminoácidos físicamente contiguos y co-evolutivos (Reynolds *et al.*, 2011), siguiendo vías preexistentes. La evolución ha explotado este fenómeno únicamente a nivel fisicoquímico.

Por otra parte, la predicción computacional de sitios alostéricos se ha convertido en una herramienta valiosa para el descubrimiento de nuevos fármacos. Tras la pandemia de COVID-19, la proteasa principal M^{pro} del SARS-CoV-2 surgió como un objetivo farmacológico clave para el desarrollo de inhibidores antivirales y moduladores alostéricos de amplio espectro. En 2021 el estudio de Günther *et al.* identificó compuestos unidos a dos sitios alostéricos distintos (I y II) en estructuras de M^{pro} co-cristalizadas con diferentes fármacos. La unión del compuesto RS-102895 al sitio I y del compuesto AT7519 al sitio II evidenció la posibilidad de modular la actividad catalítica de M^{pro} desde regiones distintas al sitio activo. Si bien, este estudio proporcionó información sobre algunos de los cambios conformacionales inducidos por la unión del ligando alostérico, no profundizó en el mecanismo de transmisión de señales moleculares dentro de la proteína, un aspecto fundamental del alosterismo. La propagación de estas señales alostéricas a través de redes de enlaces dentro de la estructura proteica es crucial para comprender la modulación alostérica de la actividad enzimática. Por ello, con el objetivo de comprender parte de los mecanismos de acción de los inhibidores alostéricos RS102895 y AT7519, en este trabajo se decidió investigar en profundidad la red de propagación de perturbaciones que conducen a cambios conformacionales en el sitio activo de la proteasa principal M^{pro}. Esto, con la finalidad de dilucidar el mecanismo de inhibición alostérica provocado tras la unión de estos inhibidores alostéricos en sitios diferentes al sitio activo de la proteasa M^{pro} siendo el punto de partida para futuras investigaciones relacionadas a terapias biológicas dirigidas a estos sitios. Para comprender cómo los sitios alostéricos influyen en los cambios conformacionales del sitio activo de M^{pro}, se utilizó el algoritmo Ohm. Este

algoritmo identificó la red de residuos que forman la ruta de comunicación entre el sitio alostérico y el sitio activo para cada inhibidor alostérico evaluado.

Los resultados un mecanismo de transmisión alostérica mediado por cambios conformacionales en residuos específicos de la proteína. El algoritmo Ohm identificó a los residuos Asn28, Tyr118, Leu141, Ser144, Gly146, Ser301 y Gly302 como mediadores clave en la transmisión de la perturbación alostérica desde el sitio alostérico hacia el sitio activo, como se describe en la sección de resultados **Figuras 5-9**. Es importante resaltar que los residuos Tyr118, Leu141, Ser144 y Gly146 son parte importante del dominio II de M^{pro}, caracterizado por presentar una estructura de barril β antiparalela (Jin *et al.*, 2020). Estos residuos participan en la formación de los dominios catalíticos de la proteína, ya que el sitio activo se encuentra ubicado entre el dominio I y II. Por otro lado, los residuos Ser301 y Gly302 son parte del dominio III, compuesto predominantemente de hélices α antiparalelas, el cual conecta a los dominios catalíticos mediante un bucle largo y participa en la regulación de la actividad enzimática del virus (Shi & Song, 2006). Después de identificar a estos residuos como los más importantes en las vías alostéricas, se llevó a cabo un análisis de RMSF para cada residuo, tomando en consideración las fluctuaciones del átomo de C α , en cinco tiempos seleccionados de la SADM (60 ns, 120 ns, 180 ns, 240 ns y 300 ns). Este análisis nos permitió evaluar la flexibilidad individual de cada residuo y su relación con la comunicación alostérica, proporcionando información sobre la estabilidad local de cada residuo y su potencial participación en la transmisión de señales alostéricas. En este análisis se consideraron principalmente a los residuos identificados por el algoritmo Ohm: Asn28, Tyr118, Leu141, Ser144, Gly146, Ser301 y Gly302, así como a los dos residuos del sitio activo His41 y Cys145. Los resultados indicaron que los residuos His41, Ser301 y Gly302 experimentan las mayores alteraciones significativas tras la unión de los inhibidores alostéricos RS102895 y AT7519, ya que para estos residuos se registró una disminución de aproximadamente el 30% en su movilidad (**Figuras 10-13**).

El análisis de las trayectorias de dinámica molecular también reveló otros residuos potencialmente relevantes que no fueron identificados en el análisis previo del

algoritmo Ohm, los cuales presentaron una disminución en sus valores de RMSF desde el 30% al 50% en comparación con la proteína M^{pro} en estado Apo (**Figuras 14-16**). Los residuos Ser46, Glu47, Asp48, Met49, Leu50, Thr190, Ala191 y Gln192 mostraron ser importantes durante la interacción con el inhibidor RS102895, en tanto que para el inhibidor AT7519, los residuos más relevantes fueron Ser46, Glu47, Asp48, Met49, Leu50. Es importante señalar que los residuos Ser46, Glu47, Asp48, Met49, Leu50 presentes en ambos análisis son parte del dominio I de M^{pro} y participan en la conformación del sitio activo (Jin *et al.*, 2020). Aunque estos residuos no fueron identificados como importantes en la ruta directa de comunicación alostérica por el algoritmo Ohm, no es difícil pensar que, al ser componentes esenciales de la conformación del sitio activo, su movilidad se vea alterada en presencia de ambos inhibidores. Este cambio en la movilidad podría, a su vez, afectar la correcta conformación del sitio catalítico permitiéndonos así sentar las bases para descubrimiento de nuevos compuestos alostéricos dirigidos a estos residuos, con potencial de inhibir la actividad de la proteasa principal M^{pro} del SARS-CoV-2.

Los análisis visuales de la M^{pro} mediante SADM durante un periodo de 300 ns en presencia de los inhibidores alostéricos también sugirieron un posible cambio conformacional de los residuos His41 y Cys145. Para validar esta observación, se midió la distancia entre el átomo de azufre del grupo SH de Cys145 y el átomo de nitrógeno del grupo NH₂ de la His41 tanto para la cadena A como la cadena B. Esta distancia se comparó con la distancia óptima de 3.6 Å requerida para la formación del enlace por puente de hidrógeno entre estos residuos, un enlace crucial para la función enzimática de la M^{pro}. Los resultados respecto a la cadena A, mostraron que en presencia del inhibidor alostérico AT7519 la distancia de His41 y Cys145 se incrementa de 4.5 Å al inicio de la simulación hasta 7 Å durante la mayor parte de la simulación y hasta el final. Por su parte el inhibidor alostérico RS102895 (sitio I) causa un incremento en las distancias para ambos residuos de 8 Å al inicio de la simulación que, posteriormente, se mantiene fluctuando de 4 a 5 Å durante el resto del tiempo de simulación. Respecto a la cadena B de M^{pro} el AT7519 y el AT7519_0 inducen un incremento en la distancia de His41 y Cys145 que varía de 5 Å hasta 9

Å y se mantiene con fluctuaciones durante toda la simulación; por otra parte, el RS102895 se mantiene con un valor constante de ~4.2 Å durante la simulación. El mismo análisis de distancia se realizó para el átomo **NH₂** del residuo His164 y el átomo de **O** del residuo Asp187. Estos residuos, si bien no forman parte de la diada catalítica, también influyen en la correcta orientación de los residuos His41 y Cys145 en el sitio activo, una alteración en la orientación de estos residuos provoca una disminución de la actividad catalítica de la enzima. Los resultados de distancia obtenidos para estos residuos indican que en presencia de AT7519 y el AT7519_0 tanto para la cadena A como la cadena B la distancia se incrementa en promedio 2 Å respecto a la estructura de M^{pro} Apo que en promedio oscila con valores cercanos a 6 Å. Por su parte RS102895 tiene valores promedio de 10 Å en la cadena A, y valores promedio de 6 Å hasta valores que se incrementan a más de 12 Å en la cadena B; algo interesante de este análisis es que la interacción de His164 y de Asp187 en M^{pro} Apo parece ser algo inestable y fluctúa mucho durante toda la simulación atomística de dinámica molecular, sin embargo, en presencia de los inhibidores y pese a que existe un incremento en la distancia entre ambos residuos parece haber cierta estabilidad conformacional, quizás similar a la que se esperaría una vez formado el puente de hidrogeno entre ambos residuos y en presencia de la poliproteína sustrato. Es importante mencionar que la His164 también actúa como base general en la reacción de proteólisis, aceptando un protón de un residuo de Ser284 y facilitando la reacción nucleofílica del oxígeno de este residuo para atacar el enlace peptídico de la proteína sustrato. El Asp187 actúa como ácido general en la reacción de proteólisis, donando un protón a la His235 para regenerar su forma activa tras la catálisis. En este sentido la ruptura del enlace por puente de hidrógeno entre His164 y Asp187 puede inactivar la M^{pro}, lo que convierte a esta enzima en un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos antivirales.

Para reforzar los análisis de distancia arriba descritos se realizó un análisis del ángulo diedro chi del residuo His41 (N-CA-CB-CG) en presencia de los inhibidores RS102895 y AT7519. Esto nos permitió visualizar los cambios que ocurren en la cadena lateral de His41. El análisis del ángulo de His41 de M^{pro} Apo para las cadenas A y B, como se ilustra en la Figura 21, donde al inicio de la simulación de

dinámica molecular, se pudieron medir oscilaciones de 7° en tiempos de hasta 50 ns (cadena A) y 25 ns (cadena B). Posteriormente, el ángulo se estabilizó en torno a los 15° a partir de los 75 ns (cadena A) y 50 ns (cadena B), respectivamente, y se mantuvo así hasta el final de la simulación (300 ns). Este hallazgo refuerza el resultado sobre la estabilidad de la cadena lateral de His41 y coincide con los resultados del análisis de distancia entre His41 y Cys145 en M^{pro} Apo (**Figuras 10-11 y 17-18**). Además de la distancia y la disposición espacial correctas, ambos residuos también requieren una orientación específica en su ángulo de inclinación para mantener la función catalítica durante el proceso de escisión de las poliproteínas de SARS-CoV-2. Este resultado es contrastante con el análisis de las fluctuaciones del ángulo de His41 de M^{pro} en presencia del inhibidor alostérico AT7519_0 (no protonado) y AT7519_1 (protonado) para ambas cadenas (A y B) como se ilustra en las **Figuras 22 y 23**. Estos datos mostraron que en presencia del inhibidor alostérico II, el ángulo de His41 asumía rápidamente un valor lejos de las líneas de base respecto a la estructura de M^{pro} Apo (**Figura 21**), demostrando que la cadena lateral de His41 fluctuaba muy repentinamente a lo largo de todo el tiempo de la simulación con valores de 170° a -180° para ambas cadenas. Estos resultados sugieren que la unión del inhibidor AT7519 (protonado y no protonado) al sitio alostérico II de M^{pro} en las cadenas A y B, causa un rearrreglo conformacional en la cadena lateral de His41, alterando la arquitectura del sitio activo, muy posiblemente a través de la propagación de perturbaciones de la red de comunicación alostérica orquestada por los residuos His167 – Asp187 que influyen en la correcta orientación de los residuos His41 y Cys145 en el sitio activo. Por otra parte, el análisis del ángulo diedro de His41 de M^{pro} en complejo con el inhibidor alostérico I (RS102895) (**Figura 24**), nos permitió observar que los cambios ocurridos en la cadena lateral de His41 no fluctuaron drásticamente manteniéndose valores promedio tanto para la cadena A con valores cercanos entre 9° y 10° como para la cadena B con valores de entre 9° y 18° , algo similar a los valores obtenidos del ángulo diedro de His41 de M^{pro} Apo, lo cual nos hace pensar que aunque si bien existe una fluctuación en el ángulo de His41, la propagación de perturbación de la red de comunicación alostérica no se deba únicamente a los residuos His167 – Asp187 sino también a los residuos,

Ser301 y Gly302 que demostraron ser importantes en los análisis de la red alostérica obtenidos por Ohm y que fueron confirmados posteriormente con los análisis de RMSF obtenidos por dinámica molecular.

Como parte final ,creemos que el mecanismo de inhibición alostérica de M^{pro} de SARS-Cov-2 por RS-102895 y AT7519 se da mediante una alteración de la conformación nativa del sitio activo, a través de una serie de residuos de aminoácidos que conectan estas regiones y mediante los cuales se generan procesos de propagación de perturbación que modifican la diada catalítica His41 y Cys145, lo que impide o disminuye la afinidad de unión del sustrato, como se describe de manera particular a continuación.

Propuesta de mecanismo alostérico:

1. Existe una perturbación en la proteasa M^{pro} que se propaga a través de los residuos obtenidos a través del algoritmo de Ohm: Asn28, Tyr118, Leu141, Ser144, Gly146, Ser301 y Gly302. Estos residuos son mediadores clave en la transmisión de la perturbación alostérica desde el sitio alostérico hacia el sitio activo.
2. El análisis de la distancia entre His41 y Cys145 evidenció que, en presencia de los ligantes alostéricos RS102895 y AT7519, las distancias de interacción entre ambos residuos aumentan. Este incremento en la distancia se atribuye a la influencia de los residuos His164 y Asp187, los cuales, al reorientarse debido a la unión del ligando, modifican la conformación de la diada catalítica, aumentando la distancia y generando cambios conformacionales que implican la modificación en los ángulos de inclinación de His41 y Cys 145, con lo cual impiden la correcta orientación y la formación del enlace por puente de hidrógeno. Con estos cambios conformacionales, proponemos que M^{pro} pierde su función y no puede cortar a la poliproteína, impidiendo con ello el ciclo de replicación viral.

Los resultados mostraron un aumento significativo en la distancia entre Cys145 y His41, lo que confirma el cambio conformacional observado.

El estudio de SADM también nos permitió visualizar, analizar e interpretar los cambios conformacionales en el sitio activo de M^{pro} en presencia de los inhibidores alostéricos RS-102895 y AT7519.

Con esta finalidad llevamos a cabo tres pasos:

1. Medir la distancia entre el átomo S (SH) de Cys145 y el átomo N (NH₂) de His41 en M^{pro} APO y M^{pro} con los inhibidores. El análisis visual sugiere un alejamiento en algunas partes de la trayectoria que debería indicarse por un incremento en la distancia entre estos dos átomos.

2. Medir la distancia entre el átomo N (NH₂) de His164 y el átomo de O (CO) de Asp187. Esta distancia involucra al residuo His164, sugiere que la cadena lateral a veces se aproxima a los residuos His41 y Cys145.

3. Analizar los valores del ángulo diedro chi del residuo His41 (N- CA- CB- CG). Este parámetro nos muestra los cambios que ocurren en la cadena lateral de His41.

Finalmente, el análisis de RMSF y la simulación de dinámica molecular (SDM) proporcionaron evidencia adicional que respalda este mecanismo.

14. Conclusiones

“El mayor enemigo del conocimiento no es la ignorancia, es la ilusión del conocimiento”

Stephen Hawking

(Físico teórico, astrofísico y divulgador científico británico).

1. La unión de los inhibidores alostéricos induce cambios conformacionales en la diada catalítica de M^{pro}, alterando la interacción entre His41 y Cys145.
2. La modulación de la actividad catalítica de M^{pro} por compuestos alostéricos se produce mediante un mecanismo de transmisión alostérica.
3. Los residuos Asn28, Tyr118, Leu141, Ser144, Gly146, Ser301 y Gly302 actúan como mediadores clave en este mecanismo.
4. Estos sitios alostéricos constituido por los residuos Asn28, Tyr118, Leu141, Ser144, Gly146, Ser301 y Gly302, y el conocimiento de cómo se transmiten los cambios conformacionales al sitio activo abre nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias contra el coronavirus SARS-CoV-2.

El estudio demuestra que la modulación de la actividad catalítica de M^{pro} por inhibidores alostéricos se basa en un mecanismo de transmisión alostérica mediado por cambios conformacionales en residuos específicos. Estos hallazgos proporcionan una base fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas al tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de M^{pro}.

El aprovechamiento de estos sitios alostéricos podría revolucionar el descubrimiento de terapias. Al enfocarse en estas "puertas ocultas" se abre la posibilidad de diseñar medicamentos **más seguros** con menos efectos secundarios, **más inteligentes** que solo bloqueen las proteínas responsables de la enfermedad y **más eficaces** para frenar su progresión.

15. Anexos

Cronograma de actividades

Marzo 2022- febrero 2024

FECHA	Mar-Jun 2022	Jul-Oct 2022	Nov-Dic 2022	Ene-Mar 2023	Abr-May 2023	Jun-Jul 2023	Ago-Oct 2023	Nov2023	Dic2023	Ene2024- Feb2024
ACTIVIDAD										
Revisión bibliográfica										
Redacción del protocolo										
Preparación de estructuras y sistemas apo M ^{pro} .										
Determinaciones por Ohm										
Cálculos de RMSF										
Evaluación de ángulos diedros residuos His41 y Cys145										
Interpretación de resultados										
Análisis de datos										
Trámites de titulación										
Escritura de tesis										

16. Bibliografía

Gentile, D., Patamia, V., Scala, A., Sciortino, M. T., 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* (4), 225.

Günther, S., Reinke, P. Y., Fernández-García, Y., Lieske, J., Lane, T. J., Ginn, H. M., ... & Meents, A. (2021). X-ray screening identifies active site and allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Science*, 372(6542), 642-646.

Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.

Pastrian-Soto, 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.

Tillett, R. L., Sevinsky, J. R., Hartley, P. D., Kerwin, H., Crawford, N., Gorzalski, A. & Pandori, M. (2021). Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *The Lancet infectious diseases*, 21(1), 52-58.

Jackson D, Farrell M, Van Hoose 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>.

Wang, J., Jain, A., McDonald, L. R., Gambogi, C., Lee, A. L., & Dokholyan, N. V. (2020). Mapping allosteric communications within individual proteins. *Nature communications*, 11(1), 3862.

Gomes, C. (2020). Report of the WHO-China joint mission on coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Brazilian Journal of Implantology and health sciences*, 2(3).

Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., ... & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 368(6489), 409-412.

Zhu, X., Liu, Q., Du, L., Lu, L., & Jiang, S. (2013). Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *Journal of thoracic disease*, 5(Suppl 2), S142.

Ramírez R & O.L., Estudio de la estabilidad de un fragmento de la apolipoproteína A1 en presencia de líquidos iónicos usando simulación de dinámica molecular. San Luis (2016). Tesis presentada en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí para optar por el título de Licenciado en Biofísica; pp 123. San Luis, México.

Yang, H., & Yang, J. (2021). A review of the latest research on M pro targeting SARS-COV inhibitors. *RSC Medicinal Chemistry*, 12(7), 1026-1036.

Reina, J., & Iglesias, C. (2022). Nirmatrelvir más ritonavir (Paxlovid) una potente combinación inhibidora de la proteasa 3CLpro del SARS-CoV-2. *Revista Española de Quimioterapia*, 35(3), 236.

Monod, J. 1965 “From enzymatic adaptation to allosteric transitions”, *Nobel Lecture*.

Wrabl, J. O., Gu, J., Liu, T., Schrank, T. P., Whitten, S. T., & Hilser, V. J. (2011). The role of protein conformational fluctuations in allostery, function, and evolution. *Biophysical chemistry*, 159(1), 129-141.

Blanquel, E. G., García Blanquel, C., & Luna García, R. (2019). Hybrid Evolutionary Algorithm for Molecular Geometric Optimization. *Computación y Sistemas*, 23(2), 569-582.

Lin, F. Y., & MacKerell, A. D. (2019). Force fields for small molecules. *Biomolecular simulations: Methods and protocols*, 21-54.

Nussinov, R., & Tsai, C. J. (2013). Allostery in disease and in drug discovery. *Cell*, 153(2), 293-305.

Fenwick, R. B., Esteban-Martín, S., & Salvatella, X. (2011). Understanding biomolecular motion, recognition, and allostery by use of conformational ensembles. *European Biophysics Journal*, 40, 1339-1355

Kumar, S., Ma, B., Tsai, C. J., Sinha, N., & Nussinov, R. (2000). Folding and binding cascades: dynamic landscapes and population shifts. *Protein science*, 9(1), 10-19

Reynolds, K. A., McLaughlin, R. N., & Ranganathan, R. (2011). Hot spots for allosteric regulation on protein surfaces. *Cell*, 147(7), 1564-1575

Fenwick, R. B., Esteban-Martín, S., & Salvatella, X. (2011). Understanding biomolecular motion, recognition, and allostery by use of conformational ensembles. *European Biophysics Journal*, 40, 1339-1355

Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of molecular biology*, 12(1), 88-118

Koshland Jr, D. E., Némethy, G., & Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, 5(1), 365-385.

Liu, J., & Nussinov, R. (2016). Allostery: an overview of its history, concepts, methods, and applications. *PLoS computational biology*, 12(6), e1004966.

Fridovich, I. (1986). Advances in enzymology and related areas of molecular biology. *Meister AI*, 58, 61-97.

Changeux, J.-P. (2015). Allosteric signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 241-264. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25529272/>.

Wyman, J., & Changeux, J.-P. (1974). How enzymes work: The nature of cooperative binding in macromolecules. Academic Press.

Herve, G., & Walker, C. A. (1989). *Allosteric enzymes* (pp. 61-79). Boca Raton: CRC press.

Helmstaedt, K., Krappmann, S., & Braus, G. H. (2001). Allosteric regulation of catalytic activity: Escherichia coli aspartate transcarbamoylase versus yeast chorismate mutase. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(3), 404-421. structure, mechanism, and allosteric regulation. John Wiley & Sons.

Cooper, A. (2000). The nature of allostery. *Protein Science*, 9(3), 318-325. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688844/>.

Murzin, A. G., & Periana, R. (2014). Evolutionary origins of allostery. *Current Opinion in Structural Biology*, 28, 1-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076006002834>.

Motz, G. H., & Tartakovsky, V. M. (2017). Allosteric mechanisms in signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(9), 626-639. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7909144/>.

Voshavar, C. (2019). Protease inhibitors for the treatment of HIV/AIDS: recent advances and future challenges. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(18), 1571-1598.

Nissim, A., & Lerer, M. B. (2016). Allosteric drugs: An emerging class of therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(12), 908-919. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5073505/>.

Lutterman, J. L., & Pao, E. M. (2014). Targeting allosteric sites on kinases for cancer therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(5), 399-417. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4092056/>.

Christoffersen, E., & Hansen, K. F. (2015). Allosteric modulation of GPCRs: A novel approach to therapeutic intervention. *Journal of Molecular and Cellular Endocrinology*, 402, 3-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4480540/>.

Woolley, M. L., & Miller, K. J. (2013). Allosteric modulation of central nervous system nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 74, 105-123. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3769383/>.

An, D. S., & Sirinivasan, T. N. (2012). Allosteric regulation of hemoglobin: A new paradigm for drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(12), 820-829. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498105/>.

Moroni, S., & Rusconi, L. (2016). Allosteric drugs: From concept to clinical application. John Wiley & Sons.

Lutterman, J. L., & Pao, E. M. (2014). Allosteric kinases: A new paradigm in cancer therapy. Springer.

P Pai, P., & Mondal, S. (2017). Applying knowledge of enzyme biochemistry to the prediction of functional sites for aiding drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(21), 2401-2421.

Lill, M. A., & Helms, V. (2016). Allosteric mechanisms revealed by molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Structural Biology*, 37, 102-108. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4865318/>.

Deganutti, C., & Wells, J. A. (2016). Allosteric regulation as revealed by molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857(8), 1275-1285.

Salmaso, V., & Jacobson, K. A. (2020). In silico drug design for purinergic GPCRs: overview on molecular dynamics applied to adenosine and P2Y receptors. *Biomolecules*, 10(6), 812.

Giorgi, M. L., & Siggerson, T. A. (2015). Allosteric communication in GPCRs: Insights from molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850(1), 181-193. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4375820/>.

Bennett, M. S., & Tartakovsky, V. M. (2014). Allosteric mechanisms: Insights from molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Chemical Biology*, 20, 103-110. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4056085/>.

Hummer, G., & Boehm, M. (2011). Binding and unbinding of an allosteric inhibitor to aspartate transcarbamylase: A molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13330-13335. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3129610/>.

Yu, E. W., & Koshland Jr, D. E. (2001). Propagating conformational changes over long (and short) distances in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9517-9520.

Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., ... & Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811), 289-293.

Shi, J., & Song, J. (2006). The catalysis of the SARS 3C-like protease is under extensive regulation by its extra domain. *The FEBS journal*, 273(5), 1035-1045.

NOMBRE DEL TRABAJO

Análisis por dinámica molecular atomística de los cambios conformacionales del sitio activo de la p

AUTOR

Oriana Carey Manríquez Lúa

RECUENTO DE PALABRAS

17500 Words

RECUENTO DE CARACTERES

95426 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

86 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

5.2MB

FECHA DE ENTREGA

Aug 19, 2024 1:49 PM CST

FECHA DEL INFORME

Aug 19, 2024 1:50 PM CST

● **23% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 23% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 0% Base de datos de trabajos entregados
- 7% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Análisis por dinámica molecular atómica de los cambios conformacionales del sitio activo de la proteasa principal Mpro de SARS-CoV-2, mediados por los inhibidores alostéricos RS-102846 y AT7519	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Oriana Corey Manríquez Lúa	ocm197@gmail.com
Director	Dr. Víctor Manuel Baizobal Aguirre	victor.baizobal@umich.mx
Codirector	Dr. José Manuel Pérez Aguilar	jmp.aguilar@gmail.com
Coordinador del programa	Dra. Martha Elena Pedraza Santos	martha.elena.pedraza@umich.mx

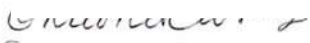
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	SÍ	Me apoye en algunas ocasiones en la coherencia de redacción

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español		
Traducción a otra lengua		
Revisión y corrección de estilo	SÍ	Me apoye para analizar el correcto estilo y elocuencia.
Análisis de datos		
Búsqueda y organización de información		
Formateo de las referencias bibliográficas		
Generación de contenido multimedia		
Otro		

Datos del solicitante	
Nombre y firma	 Oriana Carey Man
Lugar y fecha	Morelia Michoacán, 16 agosto 2024