



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



---

**Tema: Estudios bioinformáticos sobre la proteína Spike del SARS CoV-2 para el desarrollo de posibles inhibidores.**

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**AUTOR:** Nestor Alexander Villacis Perez

**TUTOR:** PhD. David Andrés Terán Mera

**Ambato- Ecuador**

**Marzo - 2021**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Terán Mera David Andrés

### **CERTIFICA**

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

Ambato, 21 de diciembre de 2020

-----  
PhD. Terán Mera David Andrés

C.I. 171656972-6

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Nestor Alexander Villacis Perez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Nestor Alexander Villacis Perez

C.I. 185019746-6

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

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

Para constancia firman:

---

Presidente del Tribunal

---

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

C.I. 1803160272

---

Dr. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

Ambato, 10 de Marzo de 2021

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

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



---

Nestor Alexander Villacis Perez

C.I. 185019746-6

**AUTOR**

## **AGRADECIMIENTO**

Les doy gracias a mi familia, amigos y a los profesores ya que cada uno a su manera ha sabido aportar algo en mi vida universitaria, ya sea con un consejo, apoyo, o con los momentos que se vivieron dentro y fuera del aula, todo esto en conjunto no solo me ayudo a formarme académicamente sino también como persona.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1.1 Coronavirus .....	1
Fig. 1. Modelo de evolución del CoV (Woo et al., 2012).....	2
1.2 Coronavirus en humanos.....	2
1.3 SARS-CoV-2 Generalidades.....	2
1.4 SARS-CoV-2 origen y evolución.....	4
1.5 SARS-CoV-2 estructura.....	4
1.5.1 Nucleocápside .....	5
1.5.2 Membrana .....	5
1.5.3 Envoltura.....	6
1.5.4 Spike.....	6
1.6 SARS-CoV-2 mecanismos de patogénesis .....	7
1.7 Interacciones entre Spike y hACE2 .....	8
1.8 Bioinformática generalidades.....	11
1.9 Docking molecular .....	12
1.9.1 Acoplamiento rígido.....	13
1.9.2 Acoplamiento semi-flexible .....	13
1.9.3 Binding affinity .....	14
1.9.4 Interacciones intermoleculares no covalentes .....	14
1.10 Objetivos .....	17
1.10.1 Objetivo general .....	17
1.10.2 Objetivos específicos .....	17
1.11 Hipótesis.....	17
1.11.1 Hipótesis Nula.....	17
1.11.2 Hipótesis Alternativa.....	17
1.12 Variables .....	18
1.12.1 Variables Dependientes:.....	18
1.12.2 Variables Independientes: .....	18

2.1	Materiales, equipos y reactivos .....	19
2.1.1	Materiales.....	19
2.1.2	Equipos.....	19
2.2	Métodos.....	19
2.2.1	Compilación y preparación de las bases de datos de las librerías químicas y de los archivos PBD. ....	19
2.2.2	Preparación de la macromolécula: spike del SARS-CoV-2.....	20
2.2.3	Docking en PyRx .....	21
2.2.4	Calculo de $K_{d_{app}}$ .....	22
2.2.6	Pipeline del docking.....	23
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		25
3.1	Análisis y discusión de resultados.....	25
3.1.1	Resultados de docking molecular.....	25
3.1.2	Verificación de la hipótesis.....	47
4.1	Conclusiones .....	48
4.2	Recomendaciones.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....		50
ANEXOS.....		56



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interacciones entre SARS-CoV-2-CTD y hACE2 (adaptada de Q. Wang et al., 2020).....	10
Tabla 2: Resultados destacados de docking .....	27
Tabla 3. Distancias, tipos de interacción, en los ligandos y Spike (los recuadros resaltados corresponden a los aa clave). .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Modelo de evolución del CoV (Woo et al., 2012).....	2
Fig. 2. Síntomas de COVID-19 (Rothan & Byrareddy, 2020).....	3
Fig. 3. Estructura del virón del SARS-CoV-2 (Singh, 2020).....	5
Fig. 4. Mecanismo de entrada y ciclo de vida del SARS-CoV-2 (Cascella, Rajnik, Cuomo, Dulebohn, & Di Napoli, 2020).....	8
Fig. 5. Estructura del complejo SARS-CoV-2-CTD unido a hACE2. (A) Representación de la estructura. Subdominios del CDT de SARS-CoV-2. Subdominio del núcleo (cian), subdominio externo (naranja). Subdominios de hACE2. Subdominio I (violeta), subdominio II (Verde). (B) Estructura del SARS-CoV-2-CTD. (C-E) Interacción de los aminoácidos (Q. Wang et al., 2020). .....	9
Fig. 6. Interacciones entre el ligando AZ_628 y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	32
Fig. 7. Interacciones entre el ligando ASTAXANTHIN y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	33
Fig. 8. Interacciones entre el ligando CANTHAXANTHIN_(euglenanone) y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	33
Fig. 9. Interacciones entre el ligando BERBAMINE_HYDROCHLORIDE y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	34
Fig. 10. Interacciones entre el ligando GSK503 y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	35
Fig. 11. Interacciones entre el ligando CX-6258_HCL y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	36
Fig. 12. Interacciones entre el ligando ETP-46464 y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	37
Fig. 13. Interacciones entre el ligando LIMONIN y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	38
Fig. 14. Interacciones entre el ligando Vistusertib_(AZD2014) y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020. ....	39

Fig. 15. Interacciones entre el ligando RingData_uff_E=472.48_1 (MMV687248) /Tuberculosis, y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.....	40
Fig. 16. Interacciones entre el ligando 3-amino-1-(3-pyridinyl)-1H-benzo[f]chromene-2-carbonitrile_model_1, y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.....	41
Fig. 17. Estructura general del SARS-CoV-2 RBD unido al ACE2 (Lan et al., 2020). .....	42

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación de energía libre de Gibbs.....	23
---	----

## RESUMEN

Con la alarma mundial del COVID-19 múltiples laboratorios se dedicaron a la búsqueda de una vacuna, para esos estudios es imperativo trabajar en un laboratorio, no obstante, existen formas en las que se puede contribuir al desarrollo de tratamientos contra esta enfermedad, una forma misma que es tratada en este proyecto es un análisis *in silico*, que mediante docking molecular.

El docking molecular fue realizado con la proteína Spike de SARS-CoV-2 como receptor y con 13 602 compuestos de las librerías CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box como ligandos. El docking arrojó datos de binding affinity (BA), resultados que ayudaron a escoger los ligandos cuyo BA estaba comprendido entre -6.8 y -5.8 kcal/mol, no obstante, ya que era un número demasiado grande se redujo a los 11 mejores ligandos, estos fueron analizados gráficamente, de modo que se recolectó la distancia, el número y tipo de interacciones no covalentes.

Además del BA también se calculó la constante de disociación (Kd), misma que verifico que los ligandos escogidos lograron formar interacciones que pueden ser tomadas en cuenta para el desarrollo de inhibidores, no obstante, los Kd encontrados no son comparables con la Kd de 14.7 nM que existe entre el receptor hACE2 y spike de SARS-CoV-2.

Los análisis gráficos de los 11 ligandos reveló que estos fueron capaces de formar interacciones sumamente valiosas como puentes de hidrógeno, interacciones aromáticas, hidrofobias y halógenas. Interacciones con el potencial de bloquear las interacciones entre hACE2 y Spike de SARS-CoV-2, dejando bases para realizar más estudios.

**Palabras clave:** Bioinformática, docking molecular, inhibidores enzimáticos, proteína Spike, SARS-CoV-2.

## ABSTRACT

With the worldwide alarm of COVID-19 multiple laboratories were dedicated to the search for a vaccine, for these studies it is imperative to work in a laboratory, however, there are ways in which you can contribute to the development of treatments against this disease, one way that is addressed in this project is an in silico analysis, which by molecular docking.

Molecular docking was performed with the SARS-CoV-2 Spike protein as a receptor and 13,602 compounds from the CASPeR, ChemBridge and Pathogen Box libraries as ligands. The docking yielded binding affinity (BA) data, results that helped to choose the ligands whose BA was between -6.8 and -5.8 kcal/mol, however, since it was too large a number it was reduced to the 11 best ligands, these were analyzed graphically, so that the distance, number and type of non-covalent interactions were collected.

In addition to the BA, the dissociation constant (Kd) was also calculated, which verified that the chosen ligands were able to form interactions that can be taken into account for the development of inhibitors, however, the Kd found are not comparable with the Kd of 14.7 nM that exists between the hACE2 receptor and spike of SARS-CoV-2.

Graphical analysis of the 11 ligands revealed that they were able to form highly valuable interactions such as hydrogen bridges, aromatic, hydrophobic and halogen interactions. Interactions with the potential to block the interactions between hACE2 and Spike of SARS-CoV-2, leaving grounds for further studies.

**Keywords:** Bioinformatics, molecular docking, enzyme inhibitors, Spike protein, SARS-CoV-2.

## A. CONTENIDOS

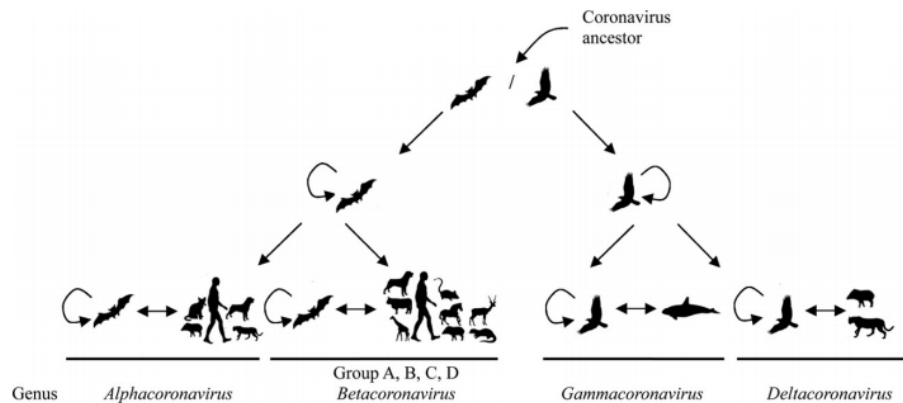
### CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes Investigativos

##### 1.1 Coronavirus

Los coronavirus son un extenso grupo de virus con genomas de una sola cadena de ARN y envoltura con sentido positivo, los cuales tienen la capacidad de causar afecciones respiratorias, entéricas, hepáticas y neurológicas en diferentes grados (**F. Li, 2015**). Llevan este nombre debido a la forma de las proteínas de su superficie (**Shereen, Khan, Kazmi, Bashir, & Siddique, 2020**). Según el comité internacional sobre la taxonomía de virus los coronavirus (CoVs) pertenecen a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* y al orden *Nidovirales*. Por su género los CoVs pueden ser alfacoronavirus, betacoronavirus, gamacoronavirus y deltacoronavirus. Se sabe que los alfacoronavirus y los betacoronavirus solo pueden infectar a mamíferos causando afecciones respiratorias y gastrointestinales, mientras que los gamacoronavirus y deltacoronavirus infectan principalmente a aves pero algunos de estos pueden ser transmitidos a mamíferos (**Woo et al., 2012**). Actualmente se sabe que los murciélagos son la fuente genética de los alfa y los beta CoVs mientras que las aves son la fuente genética de los gama y delta CoVs (**Woo et al., 2012**).

Una de las características más importantes de los coronavirus es la elevada tasa de recombinación que les permite mutar para adaptarse a nuevos huéspedes (**Woo et al., 2006**). Por ejemplo, el SARS-CoV tiene su origen en murciélagos de los que el virus se adaptó a civetas de palma y perros mapache y de estos a humanos (**Guan et al., 2003**).



**Fig. 1.** Modelo de evolución del CoV (Woo et al., 2012).

## 1.2 Coronavirus en humanos

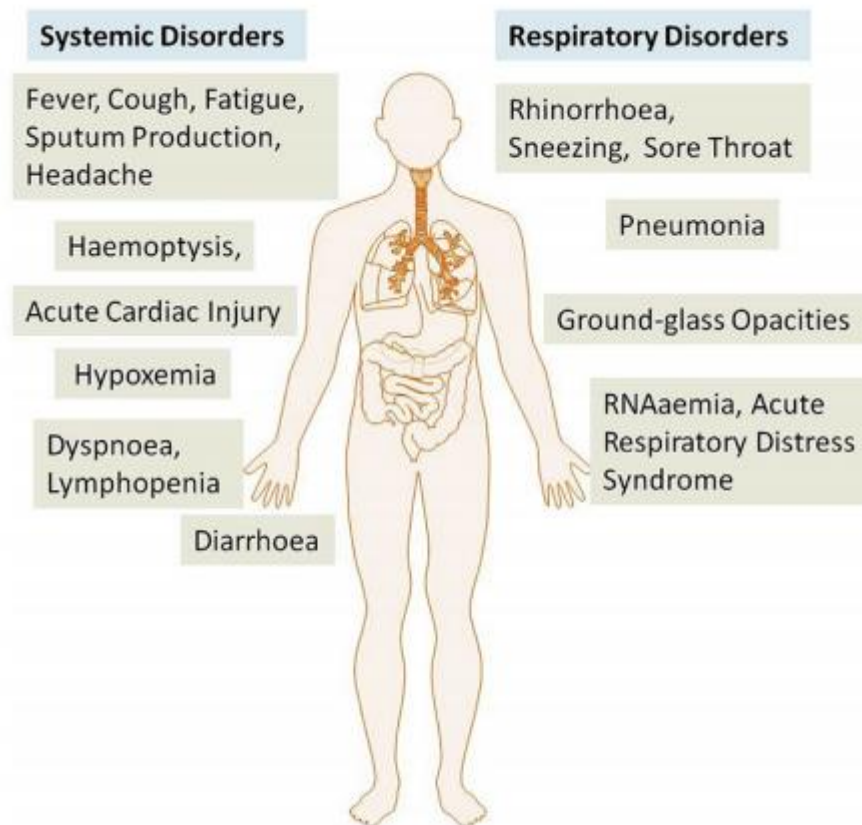
Actualmente se han registrado siete coronavirus que pueden infectar a seres humanos, en el grupo de los alfacoronavirus se encuentran el hCoV-NL63 y el hCoV-229E; y en los betacoronavirus; HCoV-OC43, HKU1, SARS-CoV (Acute Respiratory Syndrome CoV), MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome CoV) y el SARS-CoV-2 (Q. Wang et al., 2020). Los HCoVs OC43, 229E, NL63 y HKU1 causan infecciones del tracto respiratorio, se encuentran distribuidos en todo el mundo, y su presencia varía en función de patrones estacionales, es decir son responsables de las infecciones estacionales comunes (Killerby et al., 2018). Por otro lado, SARS y MERS son menos comunes pero sus sintomatologías son más peligrosas. Según la OMS desde el 2002 se reportaron 8898 personas infectadas con 776 muertes relacionadas al SARS-CoV, mientras que desde el 2012 en lo referente a MERS se han estimado 2494 individuos infectados y 858 decesos. Los síntomas típicos de los infectados son fiebre, tos seca, disnea, dolor de cabeza, y neumonía, en pacientes con el sistema inmune comprometido se presenta daño alveolar responsable de insuficiencias respiratorias lo que conducen a la muerte (Zhou et al., 2020).

## 1.3 SARS-CoV-2 y sus Generalidades

El séptimo coronavirus, el SARS-CoV-2, comparte características con el MERS y el SARS CoV, no obstante, su diseminación ha sido significativamente mayor ya que desde el 12 de diciembre de 2019, hasta el 2 de septiembre del 2020 la cifra de

casos confirmados fue de 25.832.830, 859.189 muertes y 16.932.153 convalecientes (**Vestergaard & Mølbak, 2020**).

SARS-CoV-2 es un virus sumamente infectivo ya que se propaga de persona a persona a través de partículas respirables, este virus el responsable de la infección COVID-19. Los síntomas del COVID-19 son similares a los vistos en infecciones por MERS y SARS, sin embargo COVID-19 presenta sintomatologías extra como rinorrea, estornudos, dolor de garganta, diarrea, entre otros (**Phan et al., 2020**) (Fig. 2). Los síntomas aparecen aproximadamente en 5,2 días previo al primer contacto con el virus (**Q. Li et al., 2020**).



**Fig. 2.** Síntomas de COVID-19 (**Rothan & Byrareddy, 2020**).

La edad y la competitividad del sistema inmune condicionan la gravedad de la enfermedad; los pacientes mayores a 70 años son los más propensos a fallecer, así como los pacientes con enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (**Rothan & Byrareddy, 2020**). El promedio de días entre la aparición de síntomas y la muerte de estos pacientes es de 14 días (**W. Wang, Tang, & Wei, 2020**).

#### 1.4 SARS-CoV-2 origen y evolución

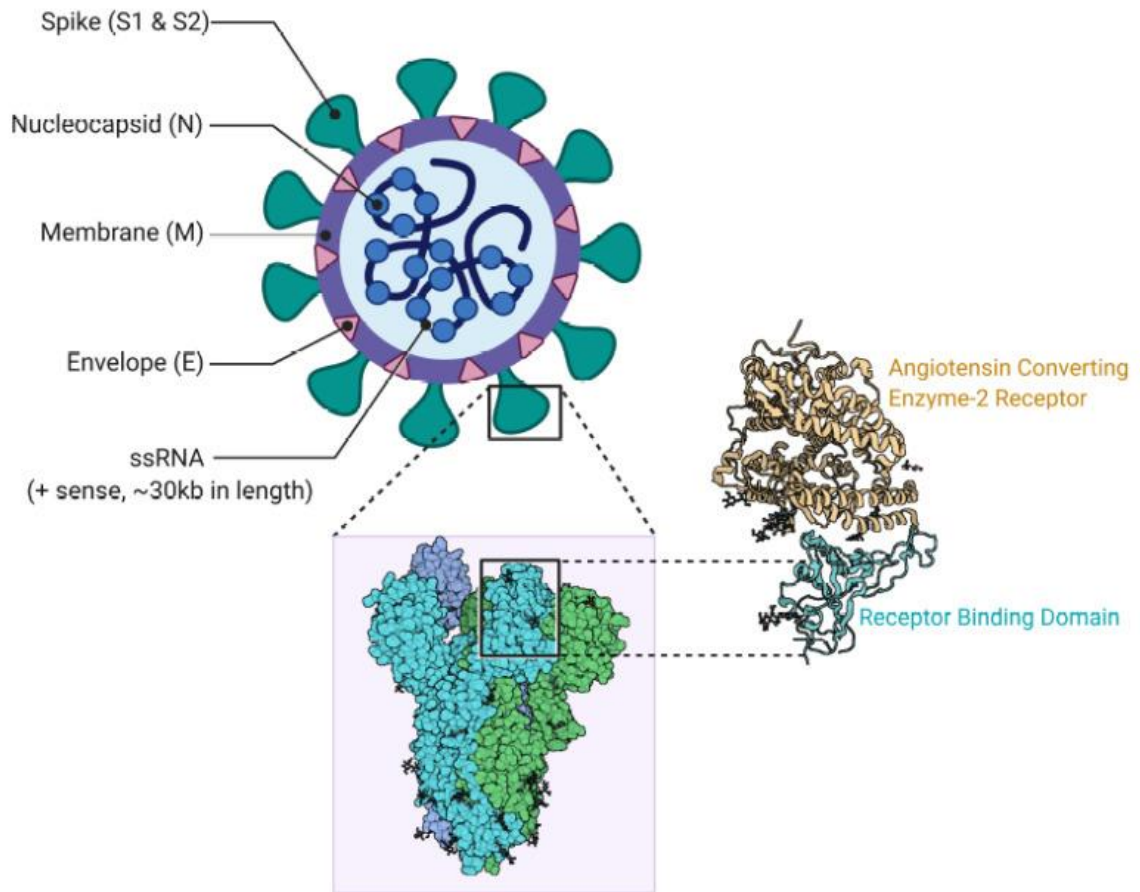
Los primeros indicios del SARS-CoV-2 y su enfermedad COVID-19 fueron detectados en Wuhan la capital de la provincia Hubei, China (**Liu et al., 2020**). El virus y su infección están relacionados con el consumo de animales contaminados; el pangolín malayo puede ser uno de los huéspedes intermedios entre los murciélagos y el ser humano, ya que se ha determinado que el Pangolin-CoV, presenta un material genético 91,02% similar al SARS-CoV-2, y un 90,55% al BatCoV RaTG13 (**Zhang, Wu, & Zhang, 2020**).

Análisis clínicos de pacientes con COVID-19 determinaron: un bajo conteo de leucocitos, valores elevados de proteína C reactiva, tasa elevada de sedimentación de eritrocitos y del dímero D; resultados que señalan la respuesta inflamatoria del sistema inmune frente a la infección (**Lei, Li, Li, & Qi, n.d.**). Pruebas de citoquinas y quimioquinas expusieron niveles sobre la media de IL1- $\beta$ , IL1RA, IL7, IL8, IL9, IL10, FGF2 básico, GCSF, GMCSF, IFN $\gamma$ , IP10, MCP1, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , PDGFB, TNF $\alpha$ , y VEGFA. En pacientes en estado crítico se detectó IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 $\alpha$ , y TNF $\alpha$ , citoquinas pro-inflamatorias, responsables del avance de la enfermedad (**C. Huang et al., 2020**).

#### 1.5 SARS-CoV-2 y su estructura

El virión del SARS-CoV-2 exhibe una forma esférica con cierto polimorfismo cuyo diámetro oscila entre 60 y 149 nm, las proteínas spike o espículas tienen una longitud de entre 8 a 12 nm (**Zhu et al., 2020**). El virión está formado por una nucleocapside (N), proteínas estructurales de membrana (M) que dan forma y mantienen, de envoltura (E), spike (S) y de proteínas accesorias (Fig. 3) (**Pastrian-Soto, 2020**).





**Fig. 3.** Estructura del virón del SARS-CoV-2 (Singh, 2020).

### 1.5.1 Nucleocápside (N)

La nucleocápside protege el genoma viral, esta puede estar en forma helicoidal en estado relajado o esférica dentro del virus (Rabaan et al., 2020). Esta al estar sumamente fosforilada tiene una gran afinidad con el ARN viral (Stohlman & Lai, 1979).

### 1.5.2 Membrana (M)

Proteína M es un dímero que confiere la forma al virón. Tiene tres dominios transmembranales. M tiene un tamaño de entre 24-30 KDa, y se encuentra ampliamente distribuida en el virón (Armstrong, Niemann, Smeekens, Rottier, & Warren, 1984) (Rabaan et al., 2020).

### 1.5.3 Envoltura (E)

La proteína E tiene funciones transmembranales, con actividad en los canales de iones. Tiene un rol valioso en el ensamblaje y liberación del virus (**Rabaan et al., 2020**).

### 1.5.4 Spike (S)

La proteína S es una proteína de fusión viral de clase I, esta toma parte en la fusión de las membranas virales con las de las células huéspedes, lo cual permite al genoma viral entrar y replicarse, razón por la cual la proteína spike es el principal objetivo para el diseño de vacunas (**Bosch, Van der Zee, De Haan, & Rottier, 2003**).

Si bien la proteína spike varía de acuerdo al coronavirus al que pertenece generalmente son homotrímeros unido por enlaces N-glucosídicos, donde cada fracción tiene de 1100 a 1600 residuos (**Beniac, Andonov, Grudeski, & Booth, 2006**) (**Bosch et al., 2003**).

La proteína S puede ser procesada por proteasas propias del huésped para generar dos subunidades S1 y S2 que interactúan entre sí por enlaces no covalentes. La subunidad S1 abarca la cúspide de S, en esta se encuentran los dominios de unión con el receptor o receptor-binding domain (RBD), por lo cual este se une al receptor, S2 funge como soporte de S1, en otras palabras es el tronco sobre el cual descansa S1, asimismo S2 tiene la maquinaria de fusión y por ende establece la fusión de membranas (**Hoffmann et al., 2020**).

Para que S1 y S2 actúen es necesario que S sea procesada por proteasas del huésped en el sitio S1/S2 y en S2' (**W. Li et al., 2003**). La proteasa serina TMPRSS2 es la encargada de procesar las subunidades del S del SARS-CoV-2 (**Hoffmann et al., 2020**).

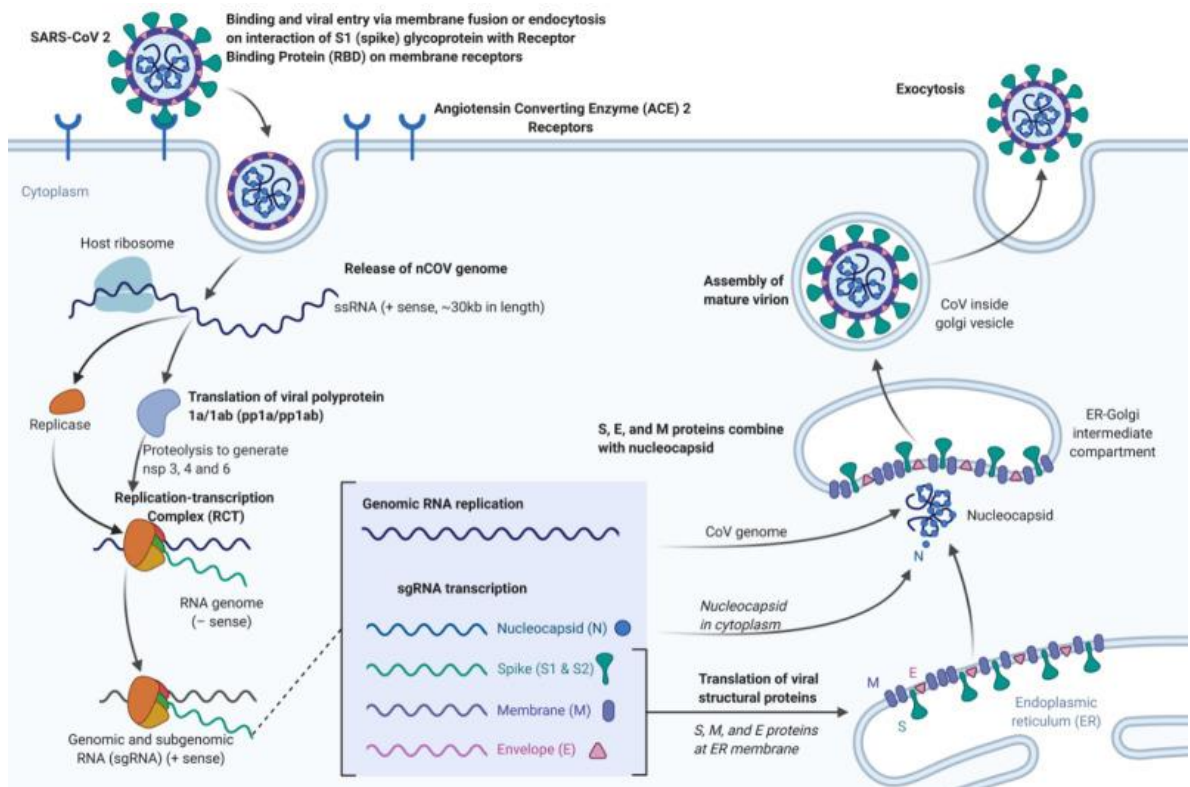
La secuenciación del SARS-CoV-2 reveló que este posee un ARN de una sola cadena con polaridad positiva o +ssARN, con aproximadamente 30.000 pares de

bases. Este material genético comparte características del ARN mensajero de células eucariotas como una caperuza en el extremo 5' (cap-5') y la presencia de una cola poli (A) en el extremo 3' (**Pastrian-Soto, 2020**).

## **1.6 SARS-CoV-2 y su mecanismo de patogénesis**

Estipulado lo anterior se puede decir que la infección comienza con el enlace de las proteínas del virus y la superficie de las células. Proceso que se da una vez que la proteína S ha encontrado y se une la enzima convertidora de la angiotensina 2 (hACE2). Seguido de esto la proteasa TMPRSS2 corta a S en los 2 puntos clave, lo cual da como resultado la fusión de membranas y la entrada del virus por endocitosis. Una vez dentro de la célula el +ssARN es liberado en el citoplasma donde se traduce en poliproteínas 1a/1ab (pp1a/pp1ab), ARN replicasa algunas proteasas y elementos de regulación inmune (**Masters, 2006**).

Las poliproteínas son cegadas por distintas proteasas, interviene una proteína similar a la quimiotripsina (3CLpro), proteasa principal del tipo serina (Mpro) y una o dos proteasas similares a la papaína (PLpro). El resultado de esta proteólisis son 16 proteínas no estructurales (nsps 1-16) (**Mielech, Chen, Mesecar, & Baker, 2014**). La replicasa en conjunto con algunas de las nsps forman el complejo replicasa transcriptasa (RTC), este complejo replica y sintetiza los así llamados ARN mensajeros subgenómicos (sgARN), que son traducidos en las proteínas estructurales S, M, E, N, es decir las estructuras principales del virus, así como en proteínas accesorias. Toda la producción de estas proteínas se da en el retículo endoplásmico y luego son enviadas a complejo de Golgi donde se juntaran para formar un nuevos virus que serán liberados de la célula (**Astuti, 2020**) (Fig. 4).

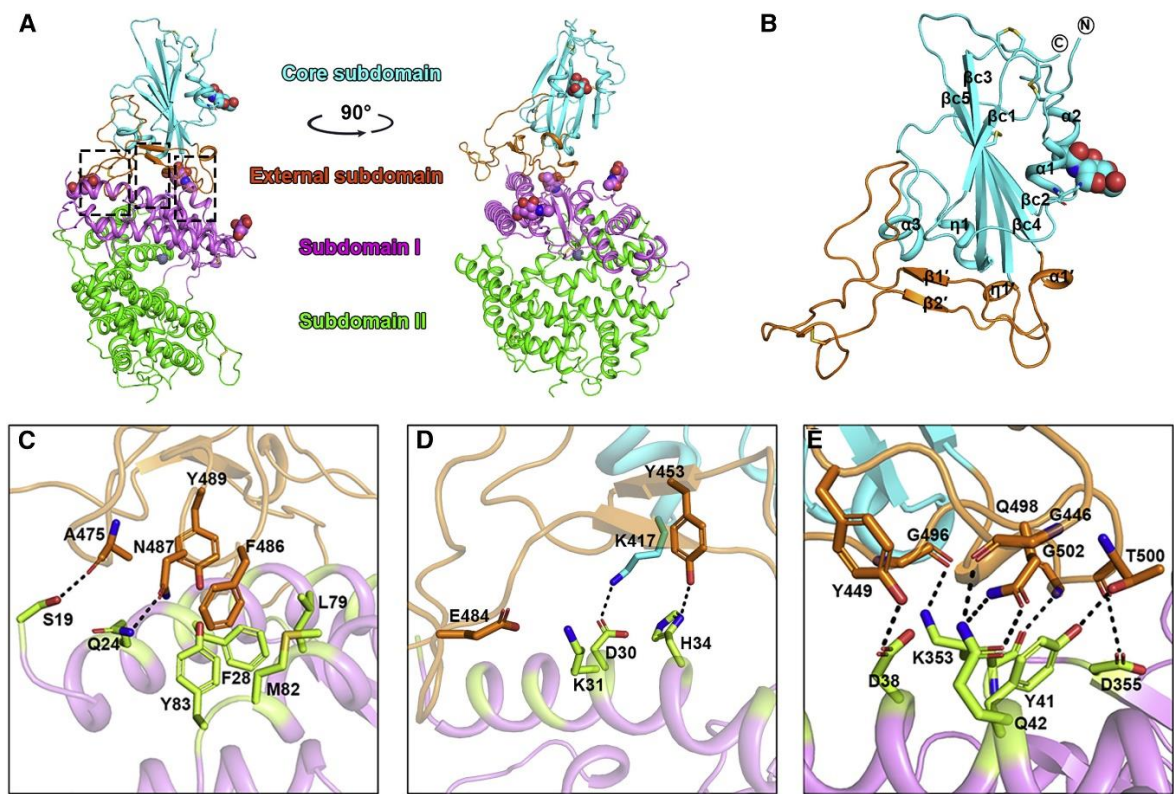


**Fig. 4.** Mecanismo de entrada y ciclo de vida del SARS-CoV-2 (Cascella, Rajnik, Cuomo, Dulebohn, & Di Napoli, 2020).

### 1.7 Interacciones entre Spike y hACE2

La subunidad S1 de proteína S del SARS-CoV-2, puede dividirse en dos dominios, un dominio N-terminal (NDT) y un dominio C-terminal (CDT). En el CDT de S se pueden distinguir dos subdominios; el subdominio del núcleo que está formado por cinco hojas plegadas  $\beta$  antiparalelas y un enlace disulfuro entre la segunda y la cuarta lamina y el subdominio extremo que está encabezado por un bucle flexible estabilizado por un enlace disulfuro que conecta dos pequeñas hojas plegadas  $\beta$  (Q. Wang et al., 2020).

En contra parte en hACE2 se puede diferenciar el subdominio I y el subdominio II. Las interacciones entre S y hACE2 se dan entre la subunidad externa del CDT y la subunidad I de hACE2, esto a través de fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrogeno, puentes disulfuro, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas (Q. Wang et al., 2020) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Estructura del complejo SARS-CoV-2-CTD unido a hACE2. (A) Representación de la estructura. Subdominios del CDT de SARS-CoV-2. Subdominio del núcleo (cian), subdominio externo (naranja). Subdominios de hACE2. Subdominio I (violeta), subdominio II (Verde). (B) Estructura del SARS-CoV-2-CTD. (C-E) Interacción de los aminoácidos (**Q. Wang et al., 2020**).

Entre ligando viral y el receptor se han encontrado interacciones suficientes para estipular la gran especificidad entre estos. En la siguiente tabla se presentan los aminoácidos que se relacionan entre sí.

**Tabla 1.** Interacciones entre SARS-CoV-2-CTD y hACE2, los aminoácidos resaltados en amarillo son los aminoácidos escogidos para el docking molecular. (adaptada de **Q. Wang et al., 2020**)

hACE2		SARS-CoV-2-CTD					
aa	vdw	aa	vdw	P-H	aa	vdw	P-H
S19	7	A475	3	1	G476	4	
Q24	24	A475	4		G476	5	
		N487	15	1			
T27	15	F456	5		Y473	1	
		A475	2		Y489	7	
F28	7	Y489	7				
D30	10	K417	4	1	L455	2	
K31	19	L455	2		F456	5	
		E484	1		Y489	6	
		F490	2		Q493	3	
H34	20	Y453	5	1	L455	9	
		Q493	6				
E35	8	Q493	8				
E37	7	Y505	7				
D38	15	Y449	9	1	G496	5	
		Q498	1				
Y41	23	Q498	8		T500	7	1
		N501	8	1			
Q42	16	G446	4	1	Y449	4	1
		Q498	8	3			
L45	4	Q498	3		T500	1	
L79	2	F486	2				
M82	9	F486	9				
Y83	20	F486	11		N487	8	1
		Y489	1				
N330	8	T500	8				
K353	50	G496	7	1	N501	11	

		G502	4	1	Y505	28	
G354	11	Y502	7		Y505	4	
D355	9	T500	8	1	G502	1	
R357	3	T500	3				
R393	1	Y505	1				

Como se puede observar hay una gran variedad de aminoácidos con los que interactúan las proteínas ACE2 y Spike, para este proyecto se escogieron los aminoácidos resaltados en la tabla 1 ya que estos forman interacciones importantes y se encuentran en la misma zona de interacción. Además de estos también se incluyó a las cisteínas 480 y 488 ya que estas son clave en la unión de ACE2 y Spike (**Phan et al., 2020**).

### 1.8 Bioinformática generalidades

La bioinformática se basa la acción reciproca de la biología, estadística y computación; esta busca simplificar análisis al procesar, relacionar y almacenar grandes cantidades de datos biológicos, como genomas, proteínas, rutas metabólicas, entre otras. Esta ha sido utilizada en estudios científicos como la secuenciación del genoma humano, modelo de estudio en plantas *Arabidopsis thaliana*, y un sinnúmero de avances en el área de la genómica. Es una herramienta sumamente importante y potente en cualquier investigación biológica (**Rodríguez, Rojas, & Merino, n.d.**).

La reestructuración de estructuras complejas, además de la simulación experimental por medio de sistemas informáticos tiene el nombre de análisis *in silico*. Una de las herramientas entre los análisis *in silico* es el acoplamiento molecular o docking, el cual utiliza diferentes softwares informáticos que buscan establecer uniones e interacciones entre ligandos y un target. El docking es especialmente útil para establecer conformaciones del ligando que le permite establecer una fuerte unión con el receptor. Este tipo de análisis siembra la base antes de avanzar a análisis *in vitro e in vivo* (**Scior, Martínez Morales, & Salinas Stefanón, 2007**).

El uso de estas tecnologías es una respuesta a los métodos tradicionales como el screening molecular, que si bien ha tenido éxito en la industria farmacéutica este necesita de cantidades exorbitantes de tiempo y de dinero; datos estimados señalan que 1 de cada 10.000 compuestos de esta índole tiene éxito. La evolución de la tecnología y el entendimiento de las interacciones entre los ligandos y receptores, además de otros factores dan lugar a un sinnúmero de metodologías nuevas **(BADENAS, 1993)**.

### **1.9 Docking molecular**

El docking o modelado molecular es una herramienta informática que predice uniones entre un ligando y un receptor de estructura tridimensional, los acoplamientos exitosos están determinados por la forma de la unión, interacciones electrostáticas, Van Der Waals, coulómbicas y puentes de hidrogeno; interacciones que en conjunto representan la afinidad de enlace **(Alberg & Schreiber, 1993)**.

El docking ha sido utilizado en el diseño de medicamentos, ya que puede ayudar a determinar que compuestos son capaces de inhibir a proteínas relacionadas a patógenos de librerías sumamente grandes. Se podría creer que los análisis son solo llevados a cabo por simulaciones de computadora, pero la verdad es que para que este tipo de estudios tengan éxito es necesaria la intervención de los analistas con conocimientos estructurales, para interpretar los datos, establecer las estructuras que participaran y resolver los posibles inconvenientes que se presenten **(Morris & Lim-Wilby, 2008)**.

Se puede decir que el docking se basa en la premisa de hallar acoplamientos entre ligandos y receptores algo que no es nuevo, ya que esto se ha venido usando desde que el concepto mismo fuera planteado. La predicción de acoplamientos mediada por software presenta las ventajas de costo y sencillez al ser comparada con el screening. Los errores, los falsos positivos y los fracasos no llegan a ser tan impactantes en el docking molecular ya que, al trabajar con bibliotecas sumamente grandes, varios de sus elementos darán resultados positivos lo cual justifica en gran medida el esfuerzo. Cabe mencionar que lejos de ser un reemplazo del screening,



el docking molecular es un complemento a esta técnica. **(Shoichet, McGovern, Wei, & Irwin, 2002)**. Otro punto importante es la robustez de los análisis, ya que por ejemplo un estudio que buscaba inhibidores para la proteína target de la diabetes tipo 2 la tirosina fosfatasa 1B determino que por docking molecular se puede trabajar con una biblioteca de 400.000 compuestos con una tasa de éxito de 6% mientras realizando screening se vería limitado a 365 con una tasa de aproximadamente 0.2% aciertos **(Doman et al., 2002)**.

El docking molecular permite dejar de “improvisar” al buscar inhibidores en base a los ya existentes, esto permite hallar ligandos totalmente diferentes, nuevos e incluso superiores a los ya existentes **(Grüneberg, Wendt, & Klebe, 2001)**.

### **1.9.1 Acoplamiento rígido**

El acoplamiento rígido se basa en el modelo de llave y cerradura de Emil Fisher, en este se asume que el ligando y el receptor están rígidos durante su interacción. Los softwares de docking molecular arrojan resultados basados en cálculos matemáticos de campos de fuerza, ecuaciones de Coulomb, interacciones electrostáticas, y fuerzas de Lennard-Jones y Van der Waals **(Ferreira, Dos Santos, Oliva, & Andricopulo, 2015)**.

### **1.9.2 Acoplamiento semi-flexible**

Este modelo tiene un punto intermedio llamado acoplamiento semi-flexible, donde el receptor permanece inmóvil mientras que el ligando se desplaza libremente de manera sistemática o al azar buscando enlazarse con la proteína. La solución que se toma como correcta para estos análisis es representada por el valor de menor energía, sin embargo, esto no es del todo correcto ya que normalmente los ligandos no se encuentran en su conformación más estable cuando tienen contacto con el receptor **(Prieto-Martínez & Medina-Franco, 2019)**.

Otros problemas están ligados a la falta de algoritmos capaces de replicar las interacciones naturales entre los ligandos y los receptores, y al hecho de que no se

ha logrado sumar la contribución de las moléculas de agua durante la formación del complejo ligado-receptor, al menos no de forma rápida y precisa (**Spyrakis & Cavasotto, 2015**). En otras palabras, no se logran tomar en cuenta todas las consideraciones reales de un sistema de modo que esto limita la veracidad de los resultados.

### **1.9.3 Binding affinity**

Binding affinity es uno de los resultados del docking, este representa la fuerza de las interacciones entre una biomolécula y un ligando. Las unidades de binding affinity son kcal/mol unidades de energía, por tanto, mientras más bajo sea este valor el complejo formado será más estable y su afinidad será alta. El binding affinity también puede medirse como constante de disociación ( $K_d$ ) calculado en molaridad esta constante permite estimar el grado en la solidez de las interacciones, de igual manera que con la energía mientras más bajo sea el  $K_d$  mayor será la afinidad de unión (**Malvern Panalytical Ltd, 2020**).

La afinidad de unión viene dada por las interacciones intermoleculares no covalentes, como los puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas y de Van der Waals (**Malvern Panalytical Ltd, 2020**).

### **1.9.4 Interacciones intermoleculares no covalentes**

Las interacciones o fuerzas intermoleculares son las responsables de las atracciones o repulsiones entre distintas moléculas o iones. Este tipo de interacciones determina las propiedades físicas de las sustancias, propiedades como el estado de agregación, punto de ebullición y fusión, solubilidad, densidad, entre otras (**McMurry, Mondragón, & Pozo, 2008**).

Las interacciones intermoleculares se diferencian de los enlaces covalentes en que en este tipo de fuerzas no se comparten pares de electrones, son de 10 a 100 más débiles, por ende, se requiere muy poca energía para romperlos, no obstante, al acumularse pueden ser tan o incluso más fuertes que un enlace covalente (**Chang & Goldsby, 2013**).

Si se desea ver la importancia de estas interacciones a nivel energético se debe conocer la fuerza de cada interacción; puente de hidrogeno (P-H) -1 a -40 kcal/mol; interacciones hidrofóbicas -0.7 a -1.5 kcal/mol, interacciones aromáticas -1.6 a -2.5 kcal/mol (**Cambridge MedChem, 2020**). Pi-Anión -2 a -5 kcal/mol (**Gallivan & Dougherty, 2000**). El motivo por el cual estas energías se dan en rangos es ya que la distancia de las interacciones es importante, ya que mientras más grande es la distancia más débil es la interacción. Esto deja en evidencia que los puentes de hidrogeno juegan un rol sumamente importante, no obstante, el tipo de PH también es importante ya que los puentes tipo carbón y tipo Pi donador son significativamente más débiles que los convencionales (**Steiner & Koellner, 2001**).

En cuanto a las interacciones hidrofóbicas si bien por si solas son muy bajas en conjunto llegan a ser significativas, más aún cuando son entre grupos aromáticos (**Chang & Goldsby, 2013**).

#### **1.9.4.1 Puentes de hidrogeno**

El enlace por puente de hidrogeno (PH) convencional es la interacción entre un átomo de hidrogeno de un enlace polar, como N-H, O-H o F-H, y un átomo electronegativo de O, N, o F (**Chang & Goldsby, 2013**). Los puentes de hidrogeno son sumamente importantes para los organismos vivos ya que determinan la estructura y las propiedades de muchos compuestos, por ejemplo, son capaces determinar la conformación de enzimas para que estas puedan catalizar reacciones biológicas, también son responsables la doble hélice del ADN (**McMurry et al., 2008**).

Además, los PH convencionales existen también los no convencionales como el PH-Carbono y el PH-Pi donador. Pero estos son significativamente más débiles que los convencionales.

- **Puente de hidrogeno-Carbono**

El puente de hidrogeno-carbono es una interacción que se da entre un átomo electronegativo (O, N, F) y un carbono aledaño a un átomo electronegativo, el carbono funciona como donador (**Nanda & Schmiedekamp, 2008**).

- **Puente de hidrogeno-Pi donador**

El enlace  $\pi$ -donor se da entre los donadores X---H y el electrón  $\pi$  de nube electrónica de un compuesto cíclico (Steiner & Koellner, 2001).

#### 1.9.4.2 Fuerzas electrostáticas

Las fuerzas electrostáticas se dan entre los átomos de las moléculas involucradas, es decir son los electrones los que están interactuando (Smith & Woerpel, 2006).

- **Interacciones de Pi-alquilo**

Es una interacción de la nube de pi-electrones sobre un grupo aromático y un grupo de electrones de cualquier tipo alquílico (Sharma, 2017)

- **Interacciones Pi-Pi**

Las interacciones Pi-Pi arilo- arilo son interacciones en la nube de pi-electrones entre dos grupos aromáticos (Swain et al., 1995). Las interacciones arilo-arilo se presentan en diversas formas, como de "T" de borde a borde y la disposición de apilamiento desplazada en paralelo. Mientras que en las proteínas la disposición de apilamiento desplazado en paralelo se observa más a menudo, las dos disposiciones son de una energía similar -1,6 a -2,4 kcal/mol (Cambridge MedChem, 2020)

- **Interacciones Pi-sulfuro**

La nube de electrones pi del anillo aromático interactúa con el par solitario de la nube de electrones del átomo de azufre (Ringer, Senenko, & Sherrill, 2007).

- **Interacciones Pi-anión**

Como su nombre lo indica es la interacción entre grupos aromáticos y aniones. Es destacable que ciertos estudios han establecido que estas interacciones son tan importantes como los puentes de hidrogeno ya que estas interacciones pueden aumentar la energía de unión en 2-5 kcal/mol. Además, también se ha reportado que las interacciones Pi-cación juegan un papel importante en procesos biológicos (Gallivan & Dougherty, 2000).

- **Fluorine**

Las interacciones Fluorine se dan entre átomos de flúor y átomos electronegativos o carbono aledaños a átomos electronegativos (Zhou, Zou, Tian, & Shang, 2009).

#### **1.9.4.3 Interacciones hidrofóbicas**

Las interacciones hidrofóbicas se dan entre las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos (A, V, L, I, M, Y, F, W) este tipo de fuerzas son las más débiles de todas las interacciones no covalentes, e intervienen en el correcto plegamiento de las proteínas (Puig, n.d.).

### **1.10 Objetivos**

#### **1.10.1 Objetivo general**

- Analizar la proteína spike del SARS-CoV-2 como receptor de potenciales ligandos terapéuticos para el desarrollo de posibles inhibidores.

#### **1.10.2 Objetivos específicos**

- Identificar las zonas clave de unión entre el SARS-CoV-2 y el receptor hACE2 mediante datos estructurales y el mecanismo de patogénesis.
- Efectuar pruebas de docking molecular en SARS-CoV-2-CTD frente a los compuestos de las librerías CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box.
- Identificar los inhibidores que tengan alta afinidad con la proteína Spike del SARS-CoV-2.

### **1.11 Hipótesis**

#### **1.11.1 Hipótesis Nula**

Los estudios bioinformáticos sobre la proteína spike del SARS-CoV-2 para el desarrollo de posibles inhibidores no son viables, por lo tanto, no se encontraron posibles inhibidores del virus.

#### **1.11.2 Hipótesis Alternativa**

Los estudios bioinformáticos sobre la proteína spike del SARS-CoV-2 para el desarrollo de posibles inhibidores son viables, por lo tanto, se encontraron posibles inhibidores del virus.

## **1.12 Variables**

### **1.12.1 Variables Dependientes:**

- Compuestos de las librerías CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box.

### **1.12.2 Variables Independientes:**

- Software (PyMol, Instant Jchem, MarvinSketch, MarvinView, AutoDock, PyRx, CCP4MG).
  - Archivos pdb, pdbqt, sdf, csv.

## **CAPITULO II.- METODOLOGÍA**

### **2.1 Materiales, equipos y reactivos**

#### **2.1.1 Materiales**

- Software bioinformáticos
  - AutoDock Tools
  - Instant Jchem
  - PyRx
  - PyMol
  - MarvinSketch
  - MarvinView
  - CCP4MG
  - BIOVIA Discovery Studio 2020
- Archivo PDB
  - 6LZG

#### **2.1.2 Equipos**

- Computadora personal

### **2.2 Métodos**

Antes de poder realizar los análisis por docking es necesario primero recopilar y preparar las librerías de los compuestos que fungirán como ligandos, también se debe tratar el archivo PDB del complejo de la proteína spike unido al receptor hACE2 (6LZG).

#### **2.2.1 Compilación y preparación de las bases de datos de las librerías químicas y de los archivos PBD.**

Se trabajó con tres librerías químicas, las cuales son CASPeR, ChemBridge y Pathogen Box.

El primer paso fue la descarga de los archivos en formato “csv”, de sus respectivas paginas oficiales.

La descarga se realizó una vez marcados todos los elementos de interés, en la pestaña “Export” se escogió el formato “csv”. Estos archivos fueron importados,

transformados y exportados para cambiar su formato a “sdf” con la ayuda del programa Instant Jchem, tal que así:

- Se importó el archivo csv. Completada esta acción se verificó los datos en la tabla que se genera con la estructura simplificada, ID, peso molecular, centros quirales, nombre del medicamento, entre otros.
- Una vez importada se exportó en formato sdf.

### 2.2.2 Preparación de la macromolécula: spike del SARS-CoV-2.

Para trabajar con la proteína spike, primero fue necesario descargar su archivo PDB, de la página del Protein Data Bank. Obtenido este archivo se modificó en AutoDock Tools de la siguiente manera:

- Se cargó o importó en la interfaz de AutoDock Tools, el archivo PDB descargado en este caso es el 6LZG correspondiente a la estructura de hACE2 y Spike unidas. Mediante la opción “File” seguida de “Read Molecule”.
- En el menú aledaño a la pantalla de visualización, en la pestaña “All Molecules” se formó una carpeta con el nombre de la estructura cargada.

Una vez importada se eliminaron, aguas, hidrógenos, metales, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG), así como cualquier molécula que pudiera interferir en el proceso de docking molecular. Esto se llevó a cabo así:

- En el menú superior se abrió la pestaña “Select”, seguido de “Select From String” y se escogió todo lo que se desea eliminar.
- Una vez marcados en la pestaña “Edit”, subpestaña “Delete” y “Delete Selected Atoms”. Esto eliminó todo lo seleccionado. También se podía eliminar directamente las aguas mediante la subpestaña “Delete Water”.
- Eliminados estos átomos y moléculas fue necesario añadir los hidrógenos, con la pestaña “Edit”, subpestaña “Hydrogens” y la opción “Add”, una vez fueron añadidos, con ayuda de la subpestaña “Hydrogens” y se fusionaron los átomos no polares de hidrógeno con la opción “Merge Non-Polar”.
- Dado que en este archivo PDB se encuentran unidos el receptor hACE2 y la proteína spike, fue necesario desplegar el contenido de la carpeta de la molécula, una vez ahí se marcó y se eliminó la subunidad A



correspondiente al receptor hACE2 ya que esta no fue sujeto de análisis para este proyecto. Esta eliminación se realizó marcando “A” y eliminándola con la opción “Delete Selected Atoms”.

- Fue necesario agregar también las cargas a la molécula así: con la pestaña “Edit”, subpestaña “Charge” y la opción “Add Kollman Charges”.
- Realizados todos estos tratamientos se realizó el Grid de la molécula, con la pestaña “Grid” que se encuentra en la segunda barra de herramientas.
- En la pestaña “Grid” se buscó la subpestaña “Macromolecule” y la opción “Choose” y se marcó la macromolécula del nombre clave 6LZG.
- Una vez completado todo correctamente se obtuvo un archivo pdbqt que se usó como molécula en el docking mediante PyRx.

### 2.2.3 Docking en PyRx

El docking molecular requiere del archivo sdf de los ligandos y el pdbqt de la macromolécula (mismos que se obtuvieron con los pasos anteriores), el docking se llevó a cabo así:

- Se importó el archivo sdf, abriendo la pestaña “File” y la subpestaña “Import”, en el cuadro de dialogo que se desplego se eligió la opción “Chemical Table File-SDF”.

Una vez importada se desplego una tabla en el menú inferior en la pestaña “Open Babel”.

- Importada esta tabla se minimizo la energía de todos los compuestos, mediante la opción “Minimize All”.
- También fue necesario convertir todos estos compuestos al formato pdbqt, con la opción “Convert All to AutoDock Ligand (pdbqt)”.
- Completados estos procesos se creó automáticamente una carpeta con todos los ligandos en la sección “Navegator”

Con respecto a la macromolécula.

- Se importó el archivo pdbqt, mediante la pestaña “File” y la subpestaña “Load Macromolecule”.
- La molécula cargada debe se guardó en el programa mediante la pestaña “AutoDock” y la opción “Make Macromolecule”. Y de igual manera que

con los ligandos se puede verificar la creación de una carpeta, pero en este caso en la parte de macromolécula.

Obtenidas las carpetas con los ligandos y la macromolécula, el docking se corrió de la siguiente manera:

- En el menú inferior en la pestaña “Wizard/Shell”, “Vina Wizard” se dio clic en “Start”.
- Se marcaron todos los ligandos de la carpeta “Ligands” y la macromolécula de “Macromolecules”, (estas selecciones se pueden verificar en la parte inferior de la ventana) y se clicó en “Forward”.
- Se escogió la zona de interés determinada bibliográficamente, es decir la zona con los nueve aminoácidos clave (Ala475, Cys480, Phe486, Asn487, Cys488, Tyr489, Phe456, Leu455, Gln493), esta zona se escogió con ayuda de la caja de selección, esta caja se alineó de modo que encierre a estos aminoácidos, así como otros que quedaron encerrados al estar cerca.
- Antes de comenzar se estableció el grado de exhaustividad en 16 y se dio clic a “Run Vina”.
- Acabado el análisis se pudieron ver los datos obtenidos en la pestaña “Analyze Results”, estos resultados se guardaron en formato csv.

Para poder analizar gráficamente las estructuras se guardaron en formato pdb las que presentaron los valores más bajos de binding affinity, esto desde la pestaña “Navigator” en la subpestaña “Molecules”, y la opción “Save As”.

Todo este proceso se llevó a cabo con cada librería.

Estos procesos pueden tardar más o menos tiempo en función de la potencia del pc que se use.

#### **2.2.4 Cálculo de $K_{dapp}$**

Los resultados de binding affinity o afinidad de unión entre ligandos y la macromolécula sirvieron para calcular la constante de disociación aparente o  $K_{dapp}$ .

El cálculo de  $K_{dapp}$  se obtuvo mediante la fórmula de energía libre de Gibbs con las condiciones estándar del receptor hACE2 y Spike de SARS-CoV-2.

## Ecuación de energía libre de Gibbs

$$-\Delta G = RT \ln \left( \frac{Kd}{1M} \right)$$

Donde:

- $\Delta G$  son los valores de binding affinity obtenidos del docking en kcal/mol.
- R es la constante de los gases 1.988207 cal/mol\*K
- Kd es la constante de disociación (M).

### 2.2.5 Análisis gráfico de los resultados

Las estructuras guardadas en formato pdb, se guardaron como complejos con spike con ayuda del programa PyMOL, en este se importó un ligado y la proteína y se guardó como complejo, esto se realizó con todos los ligandos escogidos.

Estos complejos se analizaron con ayuda del software BIOVIA Discovery Studio 2020 así:

- En el menú de “View Interaction” se da clic en la subpestaña “Ligand Interactions” esto mostrara la zona en la que se dieron las interacciones, para poder observar las distancias y el tipo de interacción se utilizó las opciones “Show Distances” y “Show Types”.
- Para poder observar de mejor manera estos datos se utilizó la opción “Show 2D Diagram” de modo que se desplego otra ventana con el ligando y sus interacciones en un gráfico 2D estos datos fueron guardados en formato png.

### 2.2.6 Pipeline del docking

El docking con la proteína S como receptor y las librerías químicas como ligandos, se basa en el siguiente protocolo (pipeline).

- Se trabajó con tres librerías químicas, las cuales son CaSPeR, ChemBridge y Patogen Box.
- El primer paso fue la descarga de los archivos en formato csv, de sus respectivas paginas oficiales.

- Estos archivos fueron importados, transformados y exportados para cambiar su formato a sdf con la ayuda del programa Instant Jchem.
- Con respecto a los archivos pdb, estos se descargaron del Protein Data Bank y fueron modificados en AutoDock Tools.
- Fueron cargados en la interfaz de AutoDock Tools, y aquí mediante diferentes funciones se eliminó, aguas, hidrógenos, metales, NAG, así como cualquier molécula que pueda interferir en el proceso de docking molecular. Posterior a estas eliminaciones se agregaron las cargas y los hidrógenos y finalmente se realizó un “Grid” para guardar estos cambios en el formato pdbqt, formato necesario para los pasos siguientes.
- Con los archivos de las librerías y de las moléculas preparadas, lo siguiente fue trabajar en el software PyRx con la justificación de que este programa puede correr todos los compuestos de las librerías de manera continua.
- Aquí se importó y se cargó las librerías en formato sdf y las moléculas pdbqt. Ya que las librerías no están en formato pdbqt, fue necesario minimizar su energía y convertirlas antes de empezar el docking.
- Una vez cargados estos archivos el docking comenzó al seleccionar todos los ligandos de interés y la macromolécula.
- Se escogió la zona de análisis y se corrió el docking.
- Finalizado este proceso se guardaron los datos obtenidos, mismos que sirvieron para el cálculo de la constante de disociación o Kd.
- Se deben guardar también los complejos con el binding affinity más bajo en formato pdb, para un análisis más detallado.
- Y estos archivos pdb deben guardarse en forma de complejo para ser analizadas gráficamente.

Analizar todas las estructuras obtenidas y determinar cuáles son los mejores inhibidores de haberlos.

## CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Análisis y discusión de resultados

#### 3.1.1 Resultados de docking molecular

El docking molecular se llevó a cabo con un total de 13 605 compuestos, donde 3 205 fueron obtenidos de la librería DRUGS del compendio de estructuras CASPeR, 10 000 compuestos de la librería de screening de ChemBridge, y 400 moléculas similares a fármacos activos contra enfermedades desatendidas, obtenidas de la librería Pathogen Box.

Los análisis de docking dejan como resultado valores de Binding Affinity (BA) cuyas unidades son kcal/mol, es decir estos datos corresponden a la energía libre de Gibbs, por tanto, mientras más bajo sea este, más alta será la afinidad entre cada ligando y el receptor (**Lee & Olson, 2006**).

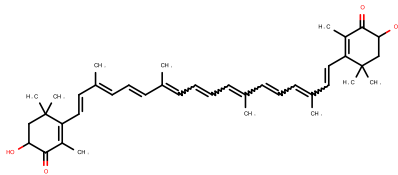
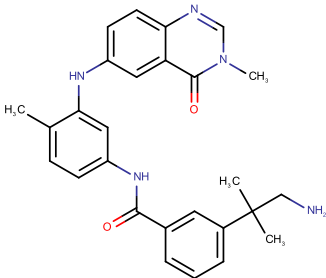
Es importante mencionar que el Kd o constante de disociación del complejo hACE2 y Spike de SARS-CoV-2 es de 14.7 nM, este valor indica la gran afinidad que existe entre el ligando y el receptor, lo cual concuerda con la gran cantidad de aminoácidos que interaccionan entre sí como se puede observar en la Tabla 1 (**Z. Huang & Chai, 2020**). Alrededor de este dato se calculó la energía libre de Gibbs para establecer un punto de partida, el valor hallado fue de -11.12 Kcal/mol. Por tanto, solo los ligandos que presenten una energía menor a esta serían aceptados como inhibidores capaces de bloquear totalmente a hACE2.

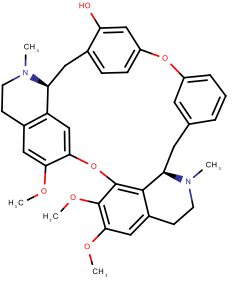
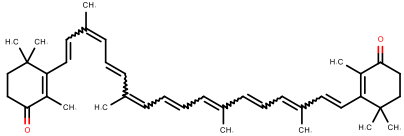
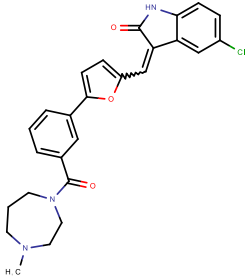
Con esa premisa en mente no se hallaron ligandos capaces de inhibir totalmente la unión del complejo S-hACE2, ya que los valores más bajos hallados se encuentran entre -6.8 y -5.8, en este rango constan 43 compuestos de CASPeR, 14 de ChemBridge y 25 de Pathogen Box es decir un total de 82 ligados.

Si bien no se hallaron ligandos cuya afinidad con S sea mayor o equivalente a la existente con hACE2 esto no les resta importancia a los datos encontrados ya estos siembran bases para el desarrollo de inhibidores, por tal razón se analizaron los 11 mejores complejos de los 82 encontrados para determinar el tipo, el número y la distancia de las interacciones intermoleculares no covalentes que se formaron. De los 11 complejos escogidos se calculó la  $K_{d_{app}}$  de cada uno en base al BA para tener

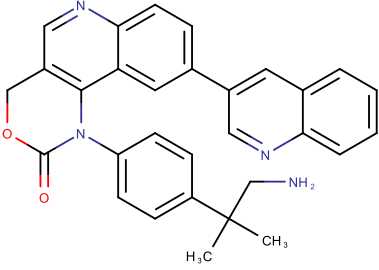
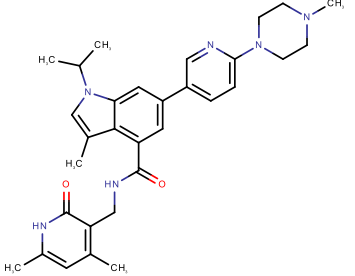
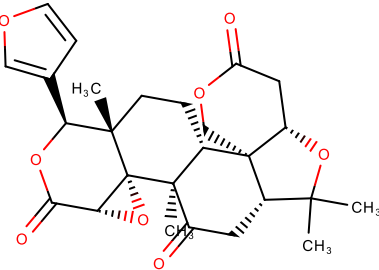
otro punto de vista de la afinidad entre los ligandos y S datos en la Tabla 2. La  $K_{d_{app}}$  más baja como es lógico corresponde al menor binding affinity ya que mientras más baja es la  $K_{d_{app}}$  la afinidad entre las moléculas será mejor (**Malvern Panalytical Ltd, 2020**).

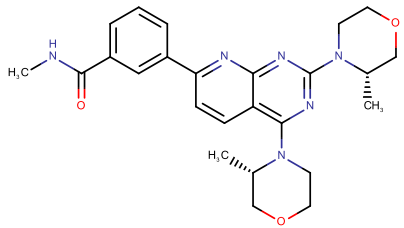
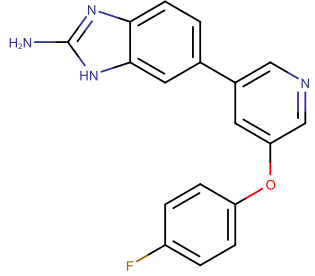
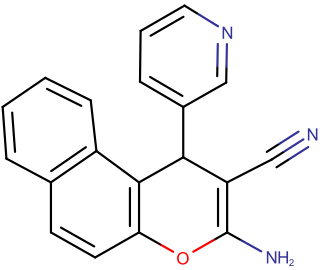
**Tabla 2:** Resultados destacados de docking molecular entre proteína S y ligandos

CASPeR-DRUGS						
#	Ligando	Estructura	PM(g/mol)	BA (kcal/mol)	Kd <sub>app</sub>	
					Kd(M)	Kd(uM)
1	ASTAXANTHIN_1		596.852	-6.7	1.90059E-05	19.01
2	AZ_628_1		455.562	-6.8	1.61594E-05	16.16

3	BERBAMINE_HYDROCHLORIDE_1	 <p>The structure shows a large macrocyclic ring system with two piperazine rings. It features several methoxy groups (H<sub>3</sub>C-O-), a hydroxyl group (HO-), and a methyl group (CH<sub>3</sub>) attached to the piperazine nitrogens.</p>	608.735	-6.5	2.62916E-05	26.29
4	CANTHAXANTHIN_(euglenanone)_1	 <p>The structure is a long-chain polyene with two cyclohexenone rings at the ends. It contains multiple double bonds and methyl groups (H<sub>3</sub>C) along the chain.</p>	564.854	-6.7	1.90059E-05	19.01
5	CX-6258_HCL_1	 <p>The structure consists of a piperazine ring with a methyl group (H<sub>3</sub>C) on one nitrogen. The other nitrogen is connected via a carbonyl group to a phenyl ring, which is further linked to a furan ring. The furan ring is connected to a pyridine ring that has a chlorine atom (Cl) and a carbonyl group (C=O) attached.</p>	461.95	-6.4	3.09230E-05	30.92



6	ETP-46464_1		474.564	-6.4	3.09230E-05	30.92
7	GSK503_1		526.685	-6.5	2.62916E-05	26.29
8	LIMONIN_1		470.518	-6.4	3.09230E-05	30.92

9	Vistusertib_(AZD2014)_1		462.554	-6.4	3.09230E-05	30.92
<b>Pathogen Box</b>						
10	RingData_uff_E=472.48_1 (MMV687248)/Tuberculosis		320.327	-6.3	3.63702E-05	36.37
<b>ChemBridge</b>						
11	3-amino-1-(3-pyridinyl)-1H-benzo[f]chromene-2-carbonitrile_1		299.333	-6.3	3.63702E-05	36.37

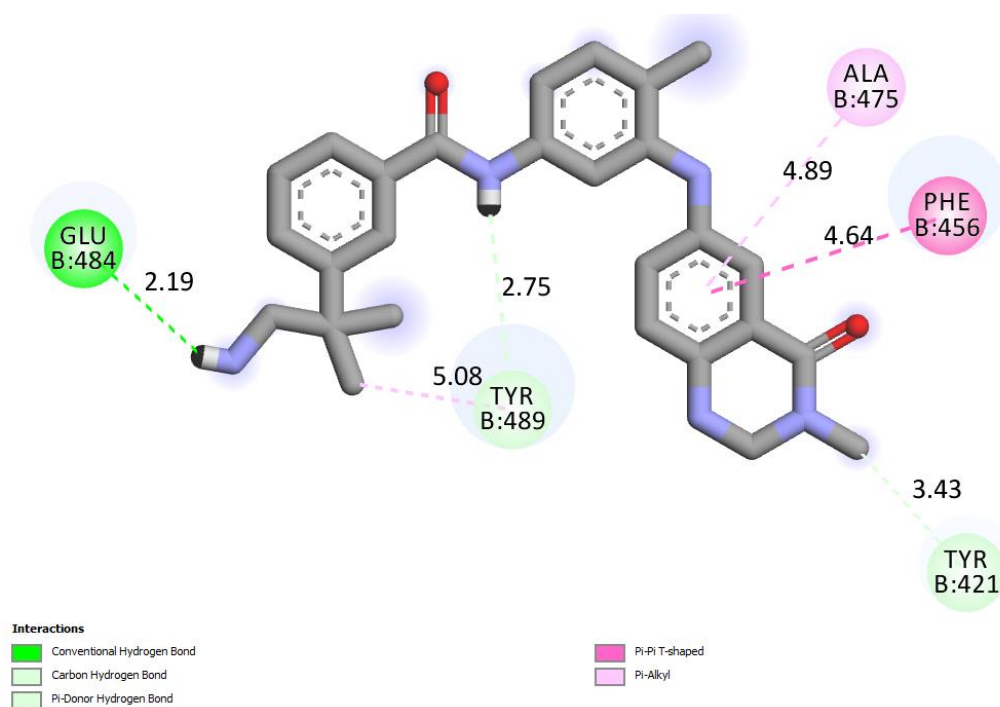
Las estructuras destacadas tuvieron valores de BA entre -6.8 y -6.3 kcal/mol, es decir hay una diferencia de energía entre la más afín y la menos afín de 0.5 kcal/mol lo cual parece insignificante, no obstante, esta diferencia toma más valor cuando también se toma en cuenta la distancia y el número de interacciones que se dan entre los aminoácidos escogidos (Fig 6 – 16).

De manera similar al BA los valores de  $K_{dapp}$ , presentan una pequeña diferencia entre el  $K_{dapp}$  más alto y el más bajo siendo esta de 20.21 uM, ya que todos los resultados están en el orden micro ( $\mu$ ) es decir son valores mayores al orden nano de la  $K_d$  de complejo S-ACE2 (17.4 nM) y por ende con una afinidad inferior a la esperada, aun así, son datos relevantes tomando en cuenta que el docking fue semi-flexible ya que no se establecieron puntos de rotación o torsión en los aminoácidos clave (A475, C480, F486, N487, C488, Y489, F456, L455, Q493) de la proteína spike ni en los ligandos, la macromolécula S se limitó a permanecer estática mientras un ligando a la vez se desplazaba por la zona escogida buscando formar interacciones de menor energía, se debe tener en cuenta también que la zona de recepción de los ligandos no era exclusiva razón por la cual se formaron interacciones con otros aminoácidos (V483, P479, T478, G485, N481, S477, E484, Y421, Y473 estos aa serán llamados “comunes” para diferenciarlos), este es un punto importante ya que las interacciones de estos aa comunes podría limitar la afinidad “real” entre S y los ligandos por el hecho de que al no bloquear los aminoácidos clave existe la posibilidad de que la proteína S se siga uniendo a ACE2 y por tanto siga entrando a las células, replicándose y continuando con el proceso de infección. Otra razón por la cual la afinidad no es comparable con el complejo S-ACE2 es porque este complejo tiene una larga lista aminoácidos y de interacciones ya que su sitio de unión es grande si se lo compara la zona escogida para realizar el docking donde apenas se escogieron 9 aminoácidos de una zona de la proteína spike.

Como se mencionó, la diferencia de afinidad de los 11 complejos ligando-spike, no es realmente significativa, para esclarecer la relevancia de cada complejo se analizó las interacciones formadas entre ligando y proteína S. De manera general todos los complejos siguieron una frecuencia de distribución de las interacciones no covalentes, tal que se halló una gran cantidad de interacciones hidrofóbicas, seguidas interacciones Pi-Pi en menor medida. Interacciones justificadas ya que buena parte los aminoácidos clave, los aminoácidos aledaños y los propios ligandos eran aromáticos, y en menor

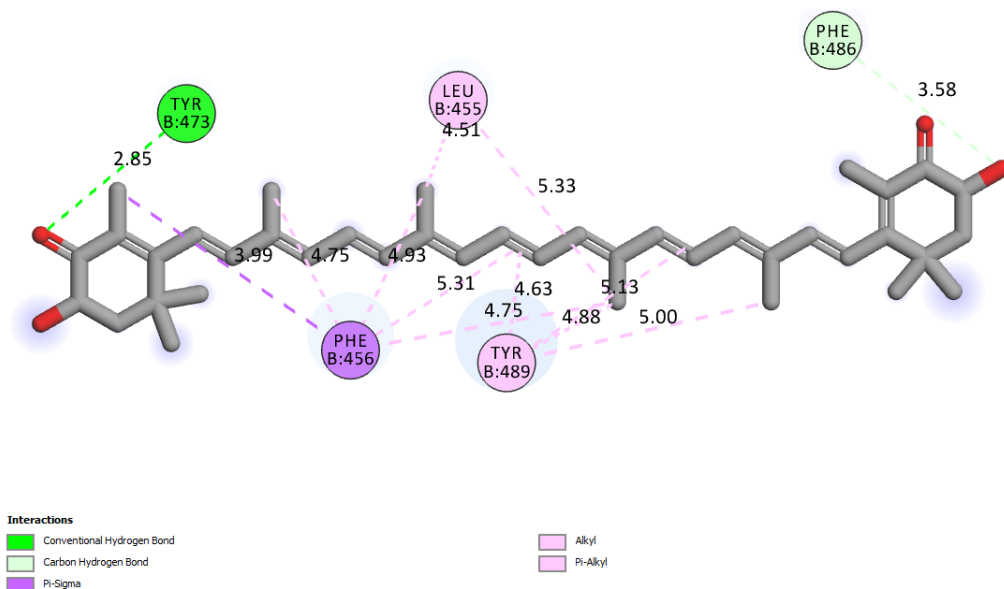
medida se hallaron puentes de hidrogeno (interacciones sumamente importantes). Esta distribución va de la mano con los valores de afinidad hallados como se puede ver a continuación.

El docking entre AZ\_628 y proteína S mostró 6 interacciones no covalentes de estas 2 fueron con aa comunes: un PH convencional con Glu484 y un carbón-PH con Tyr421, y 4 interacciones con aa clave mismas que fueron: un Pi-donor-PH y un Pi-alkyl con Tyr489, otro Pi-alkyl con Ala475 y un Pi-Pi-T-shaped con Phe456, Fig. 6.



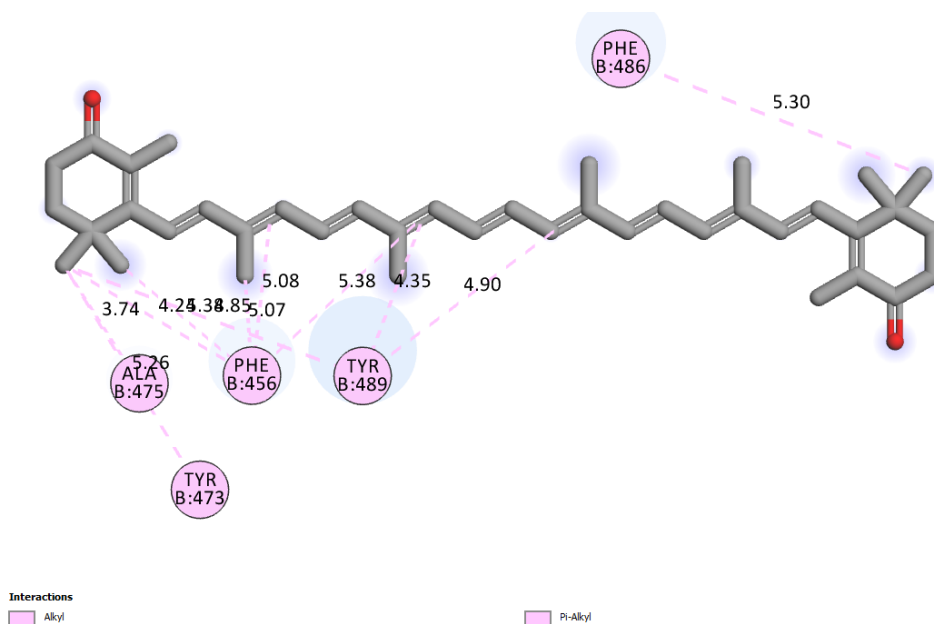
**Fig. 6.** Interacciones entre el ligando AZ\_628 y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

ASTAXANTHIN y proteína S formaron 13 interacciones, 3 con aa comunes: un PH convencional con Tyr473 y dos interacciones hidrofóbicas Alkyl con Lis455, las 10 interacciones con los aa clave son: un Carbono-PH con F486, ocho Pi-alkyl, cuatro con Tyr489 y cuatro con Phe456, y una Pi-sigma con F456, Fig.7.



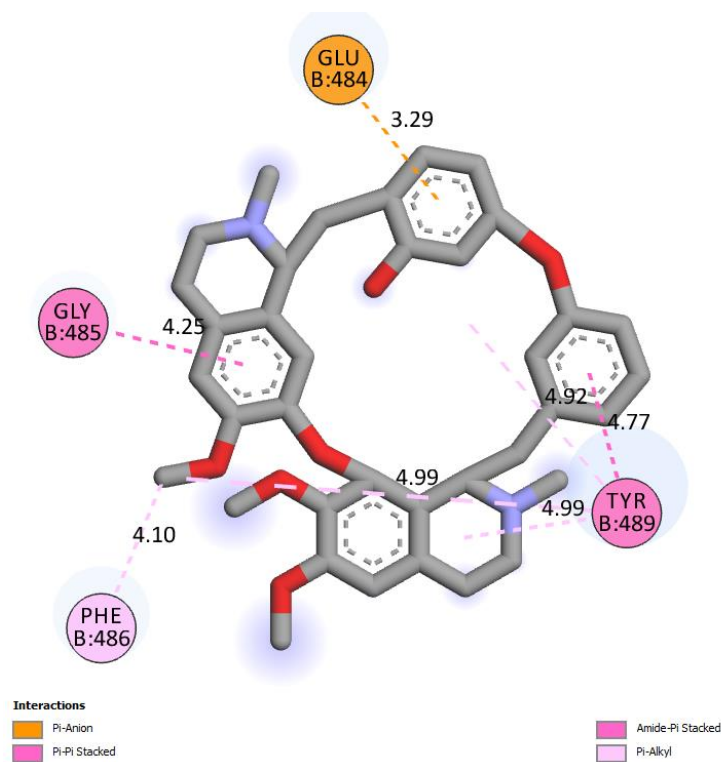
**Fig. 7.** Interacciones entre el ligando ASTAXANTHIN y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

Con respecto a CANTHAXANTHIN\_(euglenanone), este ligando formo 10 de las 11 interacciones con aa clave de la proteína S, así: un alkyl hidrofóbico con Ala475, y nueve Pi-alkyl repartidos con Y489 y F456, la única interacción con un aa común fue un Pi-alkyl con Y473, Fig. 8.



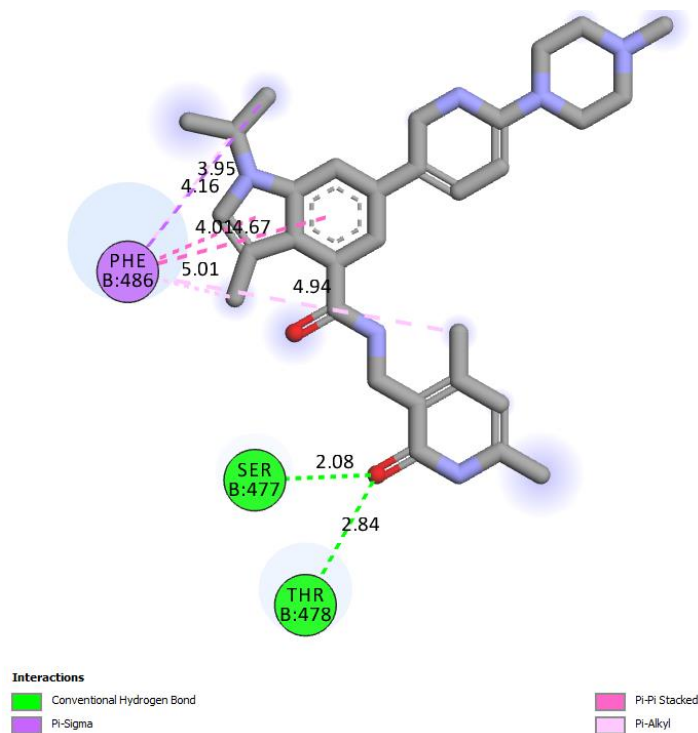
**Fig. 8.** Interacciones entre el ligando CANTHAXANTHIN\_(euglenanone) y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

Siete interacciones no covalentes se produjeron en el complejo BERBAMINE\_HYDROCHLORIDE-Spike, de ese total 5 corresponden a aminoácidos clave de esta forma: cuatro Pi-alkyl con los aa Phe486 y Tyr489 y un Pi-Pi-Stacked también con Tyr489. Los aa comunes Gly485 y Glu484 establecieron un Amide-Pi Stacked y un Pi-anión respectivamente, Fig.9.



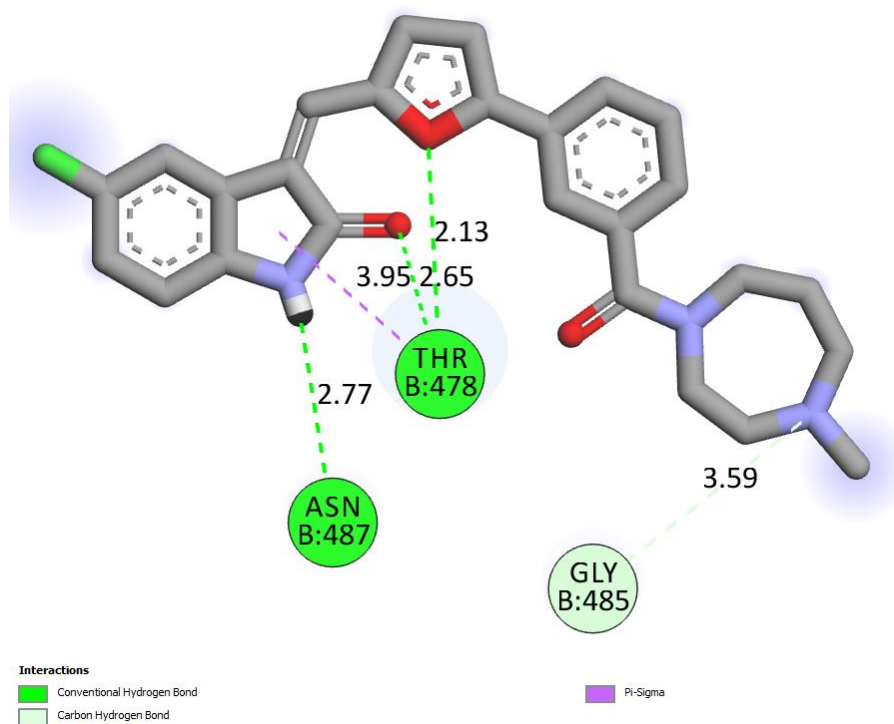
**Fig. 9.** Interacciones entre el ligando BERBAMINE\_HYDROCHLORIDE y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

En cuanto al complejo GSK503-S se contabilizaron 8 interacciones repartidas en 2 con aa comunes (dos puentes de hidrogeno uno con Ser477 y otro con Thr478) y 6 con aa clave (tres Pi-alkyl, dos Pi-Pi Stacked y un Pi-sigma con F486) Fig.10.



**Fig. 10.** Interacciones entre el ligando GSK503 y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

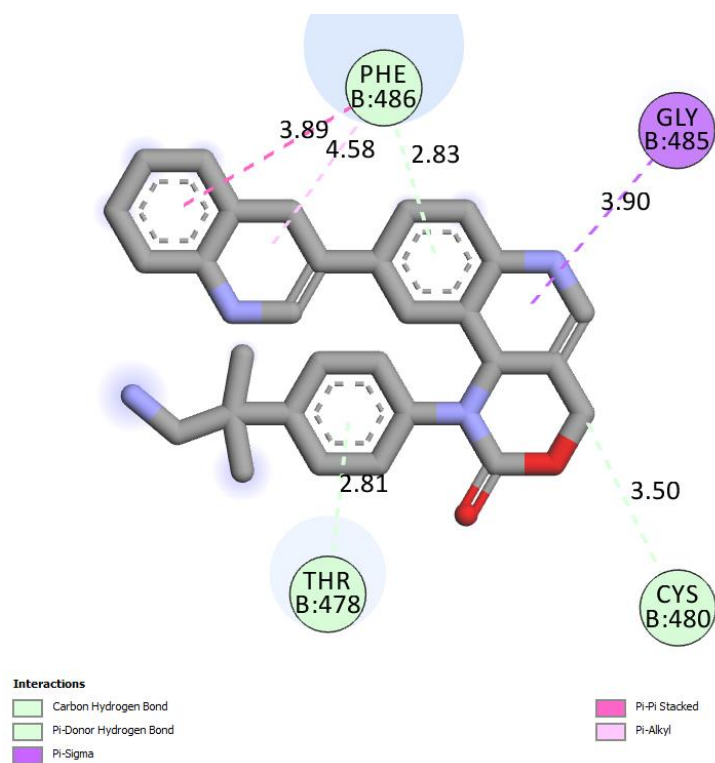
CX-6258\_HCL interactuó con S de tal forma que originó un puente de hidrogeno con Asn487 (aa clave) y otros dos PH con Tyr 478, un carbono-PH con Gly485 y un Pi-sigma con Tyr478 (aa comunes), es decir hubo un total de 5 interacciones Fig.11.



**Fig. 11.** Interacciones entre el ligando CX-6258\_HCL y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

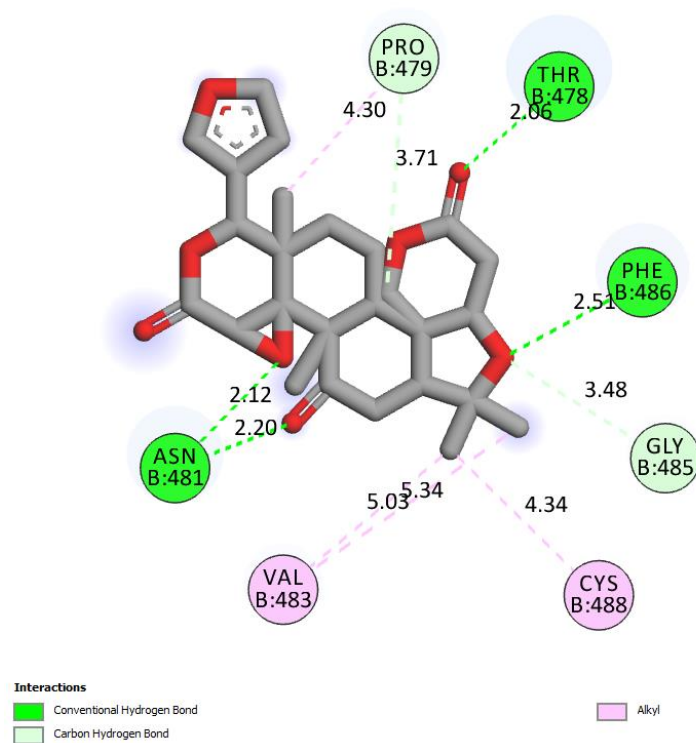
Con relación al complejo ETP-46464-Spike, se contaron 6 interacciones intermoleculares, donde 4 corresponden a aa clave así: un enlace carbono-PH con Cis480, un Pi-donor-PH, un Pi-alkil y un Pi-Pi Stacked con Phe486. Las 2 interacciones restantes corresponden a un Pi-donor-Ph con Tyr478 y un Pi-Sigma con Gly485, Fig.12.





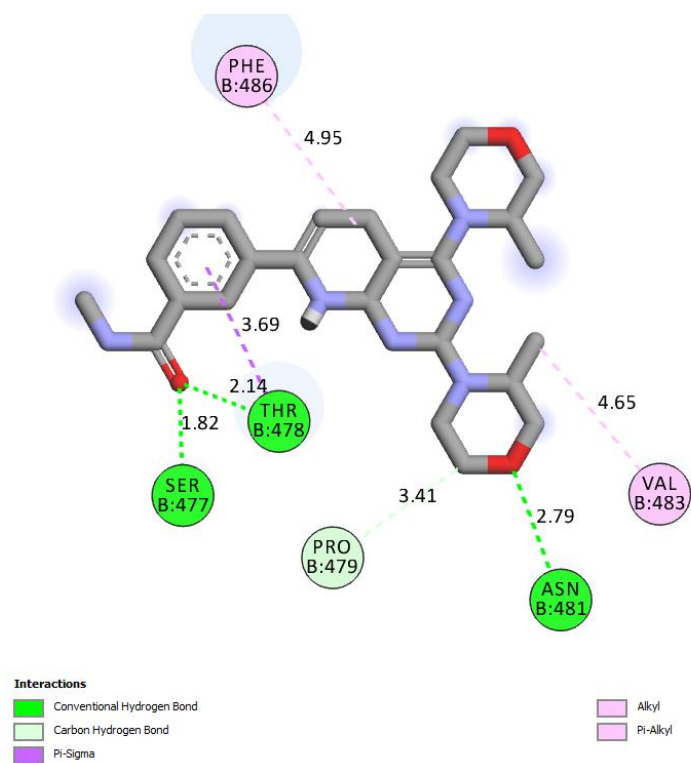
**Fig. 12.** Interacciones entre el ligando ETP-46464 y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

El complejo con más interacciones con aa comunes fue el LIMONIN acumulando ocho, de las cuales tres son PH convencionales, dos con Asn481 y el restante con Thr478, dos carbono-PH uno con Gly485 y otro con Pro479, y tres alkyl hidrofóbicos donde dos se formaron con Val483 y uno con Pro479. Las únicas interacciones con aa clave fueron un PH con Phe486 y un alkyl hidrofóbico con Cis488, Fig.13.



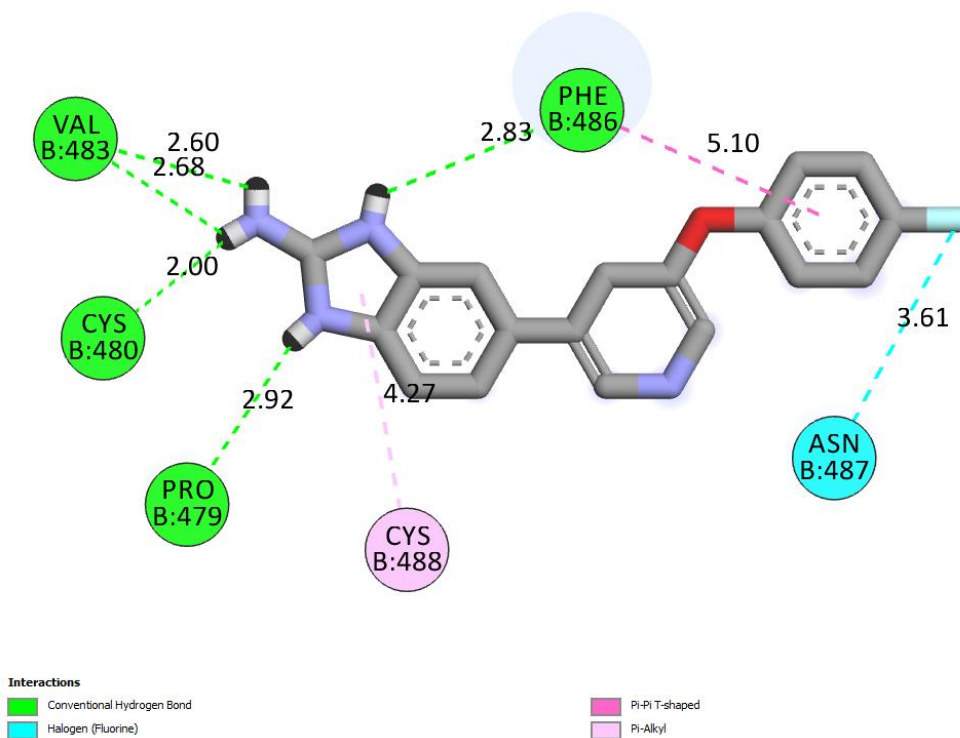
**Fig. 13.** Interacciones entre el ligando LIMONIN y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

El último de los complejos de la librería CASPeR-Drugs corresponde a Vistusertib\_(AZD2014) con S, el cual formo 7 interacciones de las cuales seis se formaron con aa comunes asi: cuatro PH distribuidos en Ser477, Thr478, Asn481 y Pro479, un alkyl hidrofóbico con Val483 y una Amide-Pi-Stacked con Thr478. La interacción restante fue un Pi-Alkyl con Phe486 (aa clave) Fig. 14.



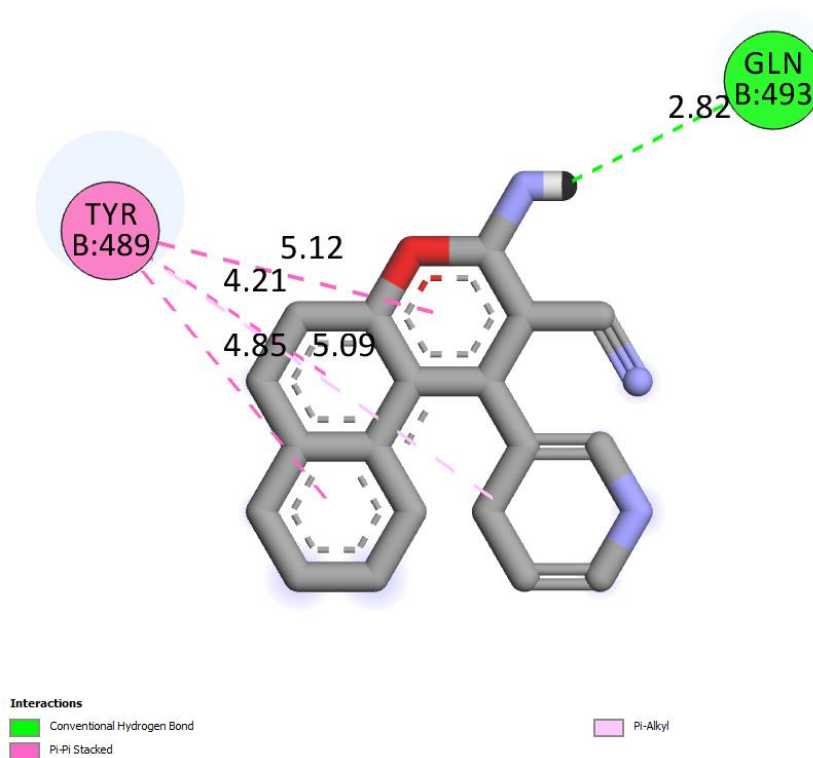
**Fig. 14.** Interacciones entre el ligando Vistusertib\_(AZD2014) y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

De la librería Pathogen Box solo se escogió un complejo de nombre RingData\_uff\_E=472.48\_1 (MMV687248) /Tuberculosis, este presento 8 interacciones, de las cuales cinco fueron con aa clave: dos puentes de hidrogeno con Cis480 y con Phe486, un Pi-Alkyl con Cis488, un Pi-Pi-Shaped con Phe486 y un enlace Fluorine con Asn487. En relación a las interacciones con aa comunes estas fueron dos PH con Val483 y otro PH con Phe479 Fig.15.



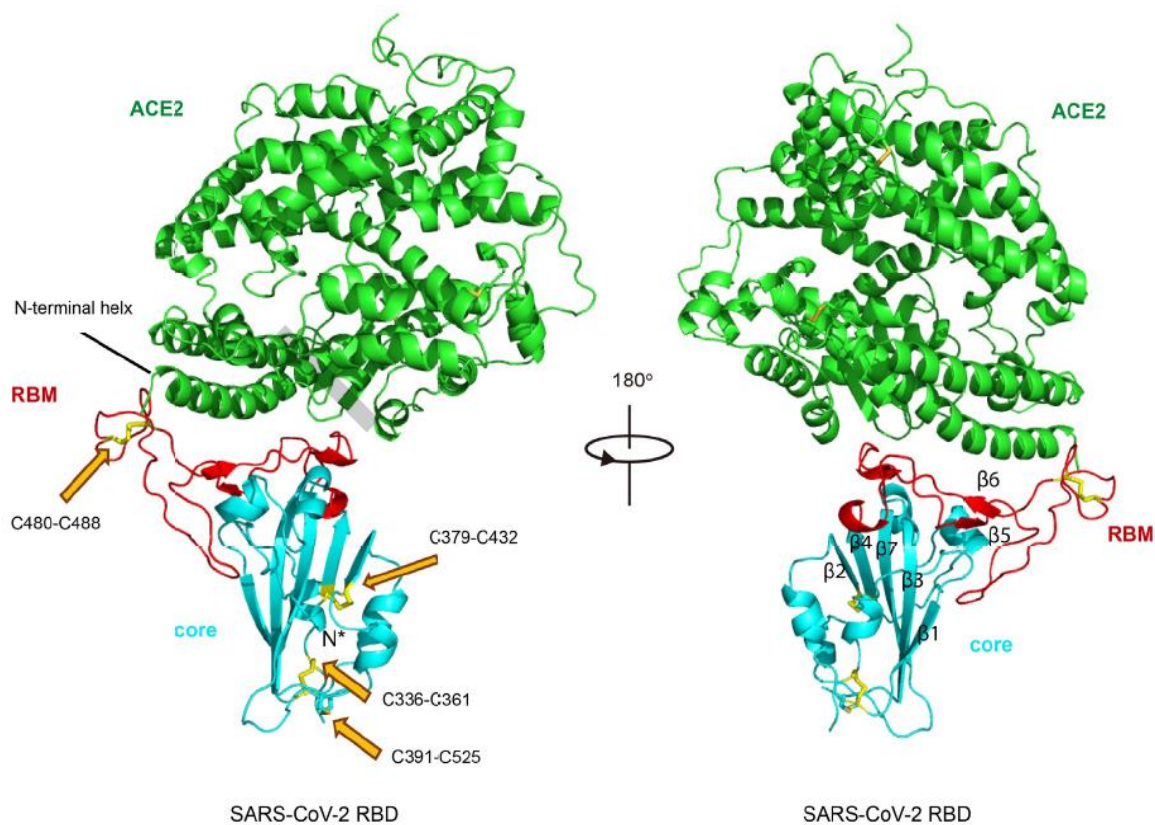
**Fig. 15.** Interacciones entre el ligando RingData\_uff\_E=472.48\_1 (MMV687248) /Tuberculosis, y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

El ultimo complejo corresponde a la librería ChemBridge, es el 3-amino-1-(3-pyridinyl)-1H-benzo[f]chromene-2-carbonitrile\_model\_1 con Spike, este complejo presento la peculiaridad de que todas sus interacciones fueron con aa clave tal que: un puente de hidrogeno con Gln493, un Pi-Alkyl, y tres Amide-Pi-Stacked con Tyr489.



**Fig. 16.** Interacciones entre el ligando 3-amino-1-(3-pyridinyl)-1H-benzo[f]chromene-2-carbonitrile\_model\_1, y la proteína Spike calculadas por BIOVIA Discovery Studio 2020.

Los resultados del número de interacciones recopiladas en la tabla 3 indican que el complejo más relevante sin tomar en cuenta el BA y la Kd, y solo basándose en las el número y tipo de interacciones con los aa clave es RingData\_uff\_E=472.48\_1 (MMV687248)/ Tuberculosis, ya que este interacciona con 4 aa clave que son Cis480, Phe486, Cis488 y Asn487, asimismo cuenta con interacciones fuertes como puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas aromáticas y halógenas, además es destacable mencionar que las interacciones con las cisteínas, son sumamente importantes, ya que se sabe que proteína spike forma puentes disulfuro con hACE2 mismos que juegan un rol sumamente importante ya que participan en la unión entre el la cresta del SARS-CoV-2 RBM y la hélice N-terminal de hACE2 (Lan et al., 2020) Fig.16. También es importante mencionar la presencia de la interacción fluorine ya que el flúor es una herramienta muy valiosa en la farmacología para el aumento de la afinidad (Bauer et al., 2016).



**Fig. 17.** Estructura general del SARS-CoV-2 RBD unido al ACE2 (Lan et al., 2020).

Los demás complejos también mostraron relevantes ya que todos lograron de cualquier manera establecer interacciones con los aa clave, lo cual podría dificultar la unión de ACE2 con la proteína Spike.

**Tabla 3.** Distancias, tipos de interacción, en los ligandos y Spike (los recuadros resaltados corresponden a los aa clave).

CASPeR/DRUGS						
#	Ligando	Aminoácido	Distancia (Å)	Interacción	Binding affinity (kcal/mol)	K <sub>d</sub> <sub>pp</sub> (uM)
1	AZ_628_1	E484	2.19	Puente de hidrogeno	-6.8	16.16
		Y421	3.43	Carbono-Puente de		

				hidrogeno		
		Y489	2.75	Pi-donor-Puente de hidrogeno		
		Y489	5.08	Pi-Alkyl		
		A475	4.89	Pi-Alkyl		
		F456	4.64	Pi-Pi T-shaped		
2	ASTAXANTHIN_1	Y473	2.85	Puente de hidrogeno	-6.7	19.01
		F486	3.58	Carbono-Puente de hidrogeno		
		L455	4.51	Alkyl hidrofóbico		
		L455	5.33	Alkyl hidrofóbico		
		Y489	5	Pi-Alkyl		
		Y489	5.13	Pi-Alkyl		
		Y489	4.88	Pi-Alkyl		
		Y489	4.63	Pi-Alkyl		
		F456	4.75	Pi-Alkyl		
		F456	4.93	Pi-Alkyl		
		F456	4.75	Pi-Alkyl		
		F456	5.31	Pi-Alkyl		
		F456	3.99	Pi-Sigma		
3	CANTHAXANTHIN_(euglenanone)_1	A475	3.74	Alkyl hidrofóbico	-6.7	19.01
		F486	5.3	Pi-Alkyl		
		Y489	4.9	Pi-Alkyl		
		Y489	4.35	Pi-Alkyl		
		Y489	4.85	Pi-Alkyl		
		F456	5.38	Pi-Alkyl		
		F456	5.08	Pi-Alkyl		
		F456	4.24	Pi-Alkyl		

		F456	5.38	Pi-Alkyl		
		F456	5.7	Pi-Alkyl		
		Y473	5.26	Pi-Alkyl		
4	BERBAMINE_HYDROCHLORIDE_1	F486	4.1	Pi-Alkyl	-6.5	26.29
		Y489	4.99	Pi-Alkyl		
		Y489	4.92	Pi-Alkyl		
		Y489	4.99	Pi-Alkyl		
		Y489	4.77	Pi-Pi Stacked		
		G485	4.25	Amide-Pi Stacked		
		E484	3.29	Pi-Anion		
5	GSK503_1	S477	2.08	Puente de hidrogeno	-6.5	26.29
		T478	2.84	Puente de hidrogeno		
		F486	4.94	Pi-Alkyl		
		F486	5.01	Pi-Alkyl		
		F486	4.16	Pi-Alkyl		
		F486	4.01	Pi-Pi Stacked		
		F486	4.67	Pi-Pi Stacked		
		F486	3.95	Pi-Sigma		
6	CX-6258_HCL_1	G485	3.59	Carbono-Puente de hidrogeno	-6.4	30.92
		N487	2.77	Puente de hidrogeno		
		Y478	2.65	Puente de hidrogeno		
		Y478	2.13	Puente de hidrogeno		
		Y478	3.95	Pi-Sigma		



7	ETP-46464_1	C480	3.5	Carbono-Puente de hidrogeno	-6.4	30.92
		F486	2.83	Pi-donor-Puente de hidrogeno		
		T478	2.81	Pi-donor-Puente de hidrogeno		
		F486	4.58	Pi-Alkyl		
		F486	3.89	Pi-Pi Stacked		
		G485	3.9	Pi-Sigma		
		8	LIMONIN_1	F486		
N481	2.12	Puente de hidrogeno				
N481	2.2	Puente de hidrogeno				
T478	2.06	Puente de hidrogeno				
G485	3.48	Carbono-Puente de hidrogeno				
P479	3.71	Carbono-Puente de hidrogeno				
C488	4.34	Alkyl hidrofóbico				

		V483	5.34	Alkyl hidrofóbico		
		V483	5.03	Alkyl hidrofóbico		
		P479	4.3	Alkyl hidrofóbico		
9	Vistusertib_(AZD2014)_1	S477	1.82	Puente de hidrogeno	-6.4	30.92
		T478	2.14	Puente de hidrogeno		
		N481	2.79	Puente de hidrogeno		
		P479	3.41	Puente de hidrogeno		
		V483	4.65	Alkyl hidrofóbico		
		F486	4.95	Pi-Alkyl		
		T478	3.69	Amide-Pi Stacked		
<b>Pathogen Box</b>						
10	RingData_uff_E=472.48_1 (MMV687248)/Tuberculosis	V483	2.68	Puente de hidrogeno	-6.3	36.37
		V483	2.6	Puente de hidrogeno		
		C480	2	Puente de hidrogeno		
		F486	2.83	Puente de hidrogeno		

		P479	2.92	Puente de hidrogeno		
		C488	4.27	Pi-Alkyl		
		F486	5.1	Pi-Pi T-shaped		
		N487	3.61	Fluorine		
<b>ChemBridge</b>						
1	3-amino-1-(3-pyridinyl)-1H-benzo[f]chromene-2-carbonitrile_1	Q493	2.82	Puente de hidrogeno	-6.3	36.37
1		Y489	5.09	Pi-Alkyl		
		Y489	4.85	Amide-Pi Stacked		
		Y489	4.21	Amide-Pi Stacked		
		Y489	5.12	Amide-Pi Stacked		

### 3.1.2 Verificación de la hipótesis

Los estudios informáticos sobre la proteína spike del SARS CoV-2, se llevaron a cabo con la limitación de un docking semi-flexible, no obstante, se obtuvieron resultados aceptables, por lo que se acepta la hipótesis alternativa “Los estudios informáticos sobre la proteína spike del SARS-CoV-2 para el desarrollo de posibles inhibidores son viables, por lo tanto, se encontraron posibles inhibidores del virus” y se rechaza la hipótesis nula.

## CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- La revisión bibliográfica indico que el material genético del virus a ingresa a las células una vez que se forman interacciones entre el subdominio externo de la proteína Spike de SARS-CoV-2 y el subdominio I de hACE2, por tanto, si se logran bloquear estas interacciones se puede impedir que el virus ingrese y continúe replicándose.
- Los análisis informáticos sobre la proteína spike del SARS-CoV-2, dejo en evidencia que muchos compuestos que son capaces de formar interacciones con la proteína S, mismo que servirán como base para el desarrollo de otros posibles inhibidores.
- Los sitios de unión entre hACE2 y Spike son numerosos misma razón por la que su afinidad es sumamente alta, no obstante, con la ayuda de revisiones bibliográficas se escogieron nueve aminoácidos convenientemente cercanos entre sí, que formaban interacciones importantes ya que se encontraban en el subdominio externo de la proteína spike, estos fueron Ala475, Cis480, Phe486, Asn487, Cis488, Tyr489, Phe456, Leu455, Gln493.
- El docking con los 13 602 ligandos de las librerías CASPeR-DRUGS, ChemBridge y Pathogen Box, dejaron 82 ligandos con cuyos binding affinity y Kd estaban en un rango aceptable en términos generales. Pero aun así no se logro conseguir la afinidad entre Spike y ACE2, de estos 82 se eligieron los 11 mejores (9 correspondientes a CASPeR, 1 de ChemBridge 1 la restante de Pathogen Box) y se analizaron sus interacciones.
- Como se mencionó no se hallaron ligandos cuya afinidad supere o siquiera iguale la afinidad entre el receptor hACE2 y Spike, no obstante, los análisis de las interacciones dejo en evidencia que los 11 ligandos analizados formaron entre una y cinco interacciones no covalentes con spike; lo más destacable se observó en el ligando de nombre clave MMV687248, el cual formo interacciones de gran relevancia.

## 4.2 Recomendaciones

- Ya que el docking semi-flexible tiene limitaciones es recomendable analizar los mejores resultados por docking flexible, agregando puntos de rotación en los 9 aminoácidos clave.
- Dado que el docking se realizó en una zona reducida, se deben hacer más estudios, pero con otras zonas de modo que no solo se busquen inhibidores competitivos sino también no competitivos.

## A. Materiales de referencia

### BIBLIOGRAFÍA

- Alberg, D. G., & Schreiber, S. L. (1993). Structure-based design of a cyclophilin-calcineurin bridging ligand. *Science*, 262(5131), 248–250.
- Armstrong, J., Niemann, H., Smeekens, S., Rottier, P., & Warren, G. (1984). Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*, 308(5961), 751–752.
- Astuti, I. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*.
- BADENAS, F. G. (1993). *Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos*. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares.
- Bauer, M. R., Jones, R. N., Baud, M. G. J., Wilcken, R., Boeckler, F. M., Fersht, A. R., ... Spencer, J. (2016). Harnessing fluorine–sulfur contacts and multipolar interactions for the design of p53 mutant Y220C rescue drugs. *ACS Chemical Biology*, 11(8), 2265–2274.
- Beniac, D. R., Andonov, A., Grudeski, E., & Booth, T. F. (2006). Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(8), 751–752.
- Bosch, B. J., Van der Zee, R., De Haan, C. A. M., & Rottier, P. J. M. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, 77(16), 8801–8811.
- Cambridge MedChem. (2020). Molecular Interactions. Retrieved from [https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/molecular\\_interactions.html](https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/molecular_interactions.html)
- Cascella, M., Rajnik, M., Cuomo, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2020). Features, evaluation and treatment coronavirus (COVID-19). In *Statpearls [internet]*. StatPearls Publishing.
- Chang, R., & Goldsby, K. A. (2013). *química*.

- Doman, T. N., McGovern, S. L., Witherbee, B. J., Kasten, T. P., Kurumbail, R., Stallings, W. C., ... Shoichet, B. K. (2002). Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), 2213–2221.
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384–13421.
- Gallivan, J. P., & Dougherty, D. A. (2000). A computational study of cation– $\pi$  interactions vs salt bridges in aqueous media: implications for protein engineering. *Journal of the American Chemical Society*, 122(5), 870–874.
- Grüneberg, S., Wendt, B., & Klebe, G. (2001). Subnanomolar inhibitors from computer screening: a model study using human carbonic anhydrase II. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(2), 389–393.
- Guan, Y., Zheng, B. J., He, Y. Q., Liu, X. L., Zhuang, Z. X., Cheung, C. L., ... Guan, Y. J. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 302(5643), 276–278.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., ... Nitsche, A. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... Gu, X. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506.
- Huang, Z., & Chai, J. (2020). Door to the cell for COVID-19 opened, leading way to therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–2.
- Killerby, M. E., Biggs, H. M., Haynes, A., Dahl, R. M., Mustaquim, D., Gerber, S. I., & Watson, J. T. (2018). Human coronavirus circulation in the United States 2014–2017. *Journal of Clinical Virology*, 101, 52–56.
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., ... Zhang, L. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220.
- Lee, M. S., & Olson, M. A. (2006). Calculation of absolute protein-ligand binding

- affinity using path and endpoint approaches. *Biophysical Journal*, 90(3), 864–877.
- Lei, J., Li, J., Li, X., & Qi, X. (n.d.). *CT Imaging of the 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia. Radiology [Internet]. abril de 2020 [citado 30 de marzo de 2020]; 295 (1): 18-18.*
- Li, F. (2015). Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *Journal of Virology*, 89(4), 1954–1964.
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., ... Wong, J. Y. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *New England Journal of Medicine*.
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., ... Greenough, T. C. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450–454.
- Liu, J., Zheng, X., Tong, Q., Li, W., Wang, B., Sutter, K., ... Yang, D. (2020). Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology*, 92(5), 491–494.
- Malvern Panalytical Ltd. (2020). No Title. Retrieved from Afinidad de unión website: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/binding-affinity>
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292.
- McMurry, J., Mondragón, C. H., & Pozo, V. G. (2008). *Química orgánica* (Vol. 5). Cengage Learning México, DF.
- Mielech, A. M., Chen, Y., Mesecar, A. D., & Baker, S. C. (2014). Nidovirus papain-like proteases: multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. *Virus Research*, 194, 184–190.
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. In *Molecular modeling of proteins* (pp. 365–382). Springer.
- Nanda, V., & Schmiedekamp, A. (2008). Are aromatic carbon donor hydrogen bonds linear in proteins? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70(2), 489–



- 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.
- Phan, L. T., Nguyen, T. V., Luong, Q. C., Nguyen, T. V., Nguyen, H. T., Le, H. Q., ... Pham, Q. D. (2020). Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in Vietnam. *New England Journal of Medicine*, 382(9), 872–874.
- Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2019). Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 124–134.
- Puig, R. P. (n.d.). *Interacciones hidrofóbicas: en qué consisten, importancia biológica y ejemplos*.
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., ... Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Infez Med*, 28(2), 174–184.
- Ringer, A. L., Senenko, A., & Sherrill, C. D. (2007). Models of S/ $\pi$  interactions in protein structures: Comparison of the H<sub>2</sub>S–benzene complex with PDB data. *Protein Science*, 16(10), 2216–2223.
- Rodríguez, P. P., Rojas, H. V. S., & Merino, F. C. G. (n.d.). *Aplicaciones a la genómica y proteómica*.
- Rothan, H. A., & Byrareddy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, 102433.
- Scior, T., Martínez Morales, E., & Salinas Stefanón, E. (2007). *Los modelos in silico. Una herramienta para el conocimiento farmacológico*.
- Sharma, T. (2017). Re: What is meant by pi-alkyl, pi-pi T shaped and pi-Sulphur interaction in protein-ligand binding?. Retrieved from [https://www.researchgate.net/post/What\\_is\\_meant\\_by\\_pi-alkyl\\_pi-pi\\_T\\_shaped\\_and\\_pi-Sulphur\\_interaction\\_in\\_protein-ligand\\_binding/59df1b335b49521404758ada/citation/download](https://www.researchgate.net/post/What_is_meant_by_pi-alkyl_pi-pi_T_shaped_and_pi-Sulphur_interaction_in_protein-ligand_binding/59df1b335b49521404758ada/citation/download).
- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19

- infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*.
- Shoichet, B. K., McGovern, S. L., Wei, B., & Irwin, J. J. (2002). Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(4), 439–446.
- Singh, R. B. (2020). *StatPearls, SARS- CoV 2 Structure*. StatPearls Publishing LLC.
- Smith, D. M., & Woerpel, K. A. (2006). Electrostatic interactions in cations and their importance in biology and chemistry. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(7), 1195–1201.
- Spyrakakis, F., & Cavasotto, C. N. (2015). Open challenges in structure-based virtual screening: Receptor modeling, target flexibility consideration and active site water molecules description. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 583, 105–119.
- Steiner, T., & Koellner, G. (2001). Hydrogen bonds with  $\pi$ -acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 535–557.
- Stohlman, S. A., & Lai, M. M. (1979). Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. *Journal of Virology*, 32(2), 672–675.
- Swain, C. J., Sewart, E. M., Cascieri, M. A., Fong, T. M., Herbert, R., MacIntyre, D. E., ... Owens, A. P. (1995). Identification of a series of 3-(benzyloxy)-1-azabicyclo [2.2. 2] octane human NK1 antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(24), 4793–4805.
- Vestergaard, L. S., & Mølbak, K. (2020). Timely monitoring of total mortality associated with COVID-19: informing public health and the public. *Eurosurveillance*, 25(34), 2001591.
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., ... Yuen, K.-Y. (2020). Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*.
- Wang, W., Tang, J., & Wei, F. (2020). Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 441–447.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., ... Wang, M. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian

coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008.

Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Yip, C. C. Y., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2006). Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. *Journal of Virology*, 80(14), 7136–7145.

Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Current Biology*.

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... Huang, C.-L. (2020). Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*.

Zhou, P., Zou, J., Tian, F., & Shang, Z. (2009). Fluorine Bonding □ How Does It Work In Protein– Ligand Interactions? *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(10), 2344–2355.

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... Lu, R. (2020). China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 382(8), 727–733.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resultados del docking molecular (“mejores resultados de las 3 librerías”).

Nu me ro	CASPeR-DRUGS												
	Ligando	En er gía de Gi bs s	Kd( M)	Kd (u M)	Hydrogen Bonds			Hidrofóbico			Electr ostáti co	Halógen o	Miscel áneo
					Conventional	Carbon	Pi Do no r	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Pi	Pi- Catio n	Fluorine	Pi- Sulfur
1	ASTAXANTHIN_1	- 6.7	1.9 005 9E- 05	19. 01		F(3.58)			Y(5.00);(5.13);(4. 88);(4.63)				
	ASTAXANTHIN_2	- 6.6	2.2 353 9E- 05	22. 35	N(4.45)				Y(4.41);(5.21);(4. 51);(3.78)				
	ASTAXANTHIN_3	- 6.6	2.2 353 9E- 05	22. 35					Y(4.99);(5.12);(4. 90);(5.06)				
	ASTAXANTHIN_4	- 6.4	3.0 923 0E- 05	30. 92	F(2.71)				F(5.46);(5.35)				
	ASTAXANTHIN_5	- 6.4	3.0 923	30. 92				C488(4. 46)	F(5.15)	F(3.59)			

			0E-05										
	ASTAXANTHIN_6	-6.3	3.63702E-05	36.37	A(2.09)			A(4.13)	Y(4.97);(5.26);(5.19)				
	ASTAXANTHIN_7	-6.3	3.63702E-05	36.37	A(2.33)			A(4.49)	F(5.21);Y(4.87);(5.46);(5.25)				
2	Aurora_A_Inhibitor_1	-5.8	8.18593E-05	81.86	F(2.11)				F(5.16)	F(5.39);(3.56)			
	Aurora_A_Inhibitor_2	-5.8	8.18593E-05	81.86	F(2.26)					F(3.62);(5.54);(3.58)			
3	Axitinib_1	-5.8	8.18593E-05	81.86						Y(5.13);(4.27);(4.73)			
4	AZ_628_1	-6.8	1.61594E-05	16.16			Y(2.75)		A(4.89)				
	AZ_628_2	-6.5	2.62916E-05	26.29					A(4.89)	Y(4.51)			

	AZ_628_3	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31	C488(2.02);N(1.91);Y(2.25)				A(3.78);Y(5.13)	Y(4.70)			
	AZ_628_4	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31	C488(2.28)				F(4.72)	F(4.37)			
	AZ_628_5	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31		A(3.73)	Y(2.64)	A(3.81)	Y(5.19)				
	AZ_628_6	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	C488(2.92)	C480(3.37)		C488(3.70)	Y(4.81)				
5	AZ6102_1	- 6.3	3.6 370 2E- 05	36. 37					F(4.23)	Y(5.73);(4.97)			
	AZ6102_2	- 6.2	4.2 777 0E- 05	42. 78					Y(4.88)	Y(5.03)			
6	AZD2461_1	- 6.3	3.6 370 2E- 05	36. 37	N(2.00)				Y(4.41)				
	AZD2461_3	- 6.1	5.0 312	50. 31					Y(4.36)	Y(5.30)			

			4E-05										
	AZD2461_4	-5.9	6.95991E-05	69.60	N(2.99);F(2.70)	C480(3.69);(3.73)				F(4.65)			
	AZD2461_5	-5.8	8.18593E-05	81.86				A(4.31)	Y(4.82)	Y(5.65)			
7	AZD8055_1	-6.2	4.27770E-05	42.78	F(3.05)	F(3.67)			F(4.62)				
	AZD8055_2	-6	5.91751E-05	59.18				F(5.00)	F(3.85)	Y(4.81);(3.84)			
8	BAICALIN_1	-6.1	5.03124E-05	50.31	Y(2.33)					Y(5.37)			
9	BERBAMINE_HYDR OCHLORIDE_1	-6.5	2.62916E-05	26.29					F(4.10);Y(4.99);(4.92);(4.99)	Y(4.77)			
	BERBAMINE_HYDR OCHLORIDE_2	-5.8	8.18593E-05	81.86				C488(4.50)	F(5.15)	F(4.81)			

10	BICUCULLINE(-)_METHIODIDE_1	-5.8	8.18593E-05	81.86	F(3.08)			C488(3.61)					
	BICUCULLINE(-)_METHIODIDE_2	-5.8	8.18593E-05	81.86	Y(2.23)				F(4.96)	Y(4.74)			
11	BILIRUBIN_1	-6.1	5.03124E-05	50.31	N(2.58);A(2.36)				Y(4.32);A(4.57);(5.20)				
	BILIRUBIN_2	-5.9	6.95991E-05	69.60	F(2.85)		F(2.67)		F(4.28)				
	BILIRUBIN_3	-5.9	6.95991E-05	69.60	A(2.27);N(2.53)				A(5.44);(4.71)	Y(5.35)			
12	BIO_1	-6.1	5.03124E-05	50.31				C488(4.99)		F(4.67);(5.14)			C488(5.9)
	BIO_2	-6	5.91751E-05	59.18					F(4.58)C488(4.68)	F(3.71)			
13	BISOCTRIZOLE_1	-5.9	6.9599	69.60					A(5.40);F(5.09)	F(4.93)			



			1E-05										
	BISOCTRIZOLE_2	-5.9	6.95991E-05	69.60	Y(2.84)				F(5.42);A(5.00);(4.87)	Y(4.80)			
	BISOCTRIZOLE_3	-5.9	6.95991E-05	69.60	A(2.05)			A(4.49)	A(4.47);Y(5.14)	F(5.49);(5.91)			
	BISOCTRIZOLE_4	-5.8	8.18593E-05	81.86	N(2.06)								
14	CANTHAXANTHIN_(euglenanone)_1	-6.7	1.90059E-05	19.01				A(3.74)	F(5.30);Y(4.90);(4.35);(4.85)				
	CANTHAXANTHIN_(euglenanone)_2	-6.6	2.23539E-05	22.35				A(3.63)	Y(4.66);(4.08);(5.03);F(5.01);(4.28)				
	CANTHAXANTHIN_(euglenanone)_3	-6.5	2.62916E-05	26.29				A(3.74);(3.93);(4.81)	Y(4.44);(5.10);(4.20);(5.30);(4.78);(5.07)				

	CANTHAXANTHIN_(euglenanone)_4	-6.4	3.09230E-05	30.92				A(3.56);(4.11)	Y(4.84);(4.45);(3.95);(4.76)			
	CANTHAXANTHIN_(euglenanone)_5	-6.4	3.09230E-05	30.92				C488(4.10)	F(5.10);(5.10);(4.65);(5.06);(5.21);Y(4.85)			
15	CELASTROL_1	-6.3	3.63702E-05	36.37					Y(5.48);(4.48);F(5.48)	Y(4.72)		
	CELASTROL_2	-6	5.91751E-05	59.18	Y(2.43)			A(4.82)				
	CELASTROL_3	-5.9	6.95991E-05	69.60					F(4.55);(4.46);(4.81)			
16	CEP-33779_1	-6.1	5.03124E-05	50.31	A(2.01)				A(5.35);(5.03)	Y(3.81)		
	CEP-33779_2	-6	5.91751E-05	59.18	A(2.49)				A(4.85)			

	CEP-33779_3	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	A(2.11);(2.69) N(2.13)				A(2.69);(4.35);(5. 07);(4.27)				
	CEP-33779_4	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	F(2.18)				C488(4.87)	F(4.95)			
	CEP-33779_5	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	N(2.76)	A(3.58)				F(4.71);( 5.01)			
17	CHIR- 99021_(CT99021)_ 1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60				Y(3.73)	Y(4.84);A(4.16)				
	CHIR- 99021_(CT99021)_ 2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C488(2.69);C 480(2.30)	F(3.66)							
	CHIR- 99021_(CT99021)_ 3	- 5.6	1.1 323 9E- 04	11 3.2 4									
18	CLORHEXIDINE_DI HYDROCHLORIDE_ 1	- 6.2	4.2 777 0E- 05	42. 78	C488(2.78);(2 .72)				F(4.92);A(4.68)		Y(3.9 2);(3. 95)		

	CLORHEXIDINE_DI HYDROCHLORIDE_ 2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	Y(2.79)				F(4.95)	A(3.94)	Y(4.8 3);(4. 40)		
	CLORHEXIDINE_DI HYDROCHLORIDE_ 3	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	A(2.19);(2.41) ;(2.85);(2.69)								
19	CX-6258_HCL_1	- 6.4	3.0 923 0E- 05	30. 92	N(2.77)								
	CX-6258_HCL_2	- 6.3	3.6 370 2E- 05	36. 37	N(2.67);F(2.6 8)					F(5.18)			
	CX-6258_HCL_3	- 6.2	4.2 777 0E- 05	42. 78					C488(3.78);(5.46 )				
	CX-6258_HCL_4	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31						F(4.52)			C488(5 .69);(5. 04)
	CX-6258_HCL_5	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	N(2.69)	C488(3 .55)				F(4.91)			
20	DIGITOXIN_1	- 6.2	4.2 777	42. 78	Y(2.51);N(2.0 8)	C488(3 .77)		A(4.00)					

			0E-05										
	DIGITOXIN_2	-5.8	8.18593E-05	81.86	N(2.16);F(2.66);(2.86);C480(2.43)								
21	DIOSMIN_1	-6.3	3.63702E-05	36.37	F(2.01);(2.89)								
	DIOSMIN_2	-6.1	5.03124E-05	50.31	C488(2.12);F(2.15)				F(4.93)				
	DIOSMIN_3	-5.8	8.18593E-05	81.86									
22	DOXYCYCLINE_HYDROCHLORIDE_1	-6.1	5.03124E-05	50.31	C480(2.68);F(2.66)								
	DOXYCYCLINE_HYDROCHLORIDE_2	-5.9	6.95991E-05	69.60	C480(2.43)	F(4.34)							
23	ECAMSULE_TRIETHANOLAMINE_2	-6.1	5.03124E-05	50.31	C480(2.26);C488(4.70)			C480(2.26)	F(4.95);(4.90)	F(4.71)			

	ECAMSULE_TRIET HANOLAMINE_3	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86				C480(5. 48)	F(4.92)				
24	Entrectinib_(RXDX- 101)_1 Revisar	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31					F(4.00)	F(4.23);( 4.77)			
25	ETP-46464_1	- 6.4	3.0 923 0E- 05	30. 92			C480(3 .5)	F( 2. 83 )	F(4.58)	F(3.89)			
	ETP-46464_2	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60									
	ETP-46464_3	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	F(2.77)			F( 2. 96 )					
26	FRIEDELIN_1 Revisar	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18				C488(3. 96)	F(5.44);(5.20);(4. 41)				
27	G-749_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	F(2.49)					F(3.80)			
28	GNF-2_1	-6	5.9 175	59. 18	F(2.22)					F(4.79)			

			1E-05										
	GNF-2_2	-5.8	8.18593E-05	81.86	N(2.90)			C488(4.32)		F(4.76)		is	
29	GSK503_1	-6.5	2.62916E-05	26.29					F(4.16);(5.01)	F(4.67);(4.01)			
	GSK503_2	-6.4	3.09230E-05	30.92	C480(2.14)	F(3.64)	F(3.16)						
	GSK503_3	-6.3	3.63702E-05	36.37									
	GSK503_4	-6.1	5.03124E-05	50.31	F(2.44)	F(3.57)			F(4.72)	F(3.79)			
	GSK503_5	-6	5.91751E-05	59.18	F(3.01)					F(5.31)			
30	GSK1838705A_1	-6	5.91751E-05	59.18					F(5.24);(5.22)	F(4.68)			C488(4.90)

	GSK1838705A_2	-5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C480(1.98);F(2.78);(2.64)		F(2.95)						
	GSK1838705A_3	-5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	F(2.44);(2.04);C480(2.34)			C(4.28)	F(5.13)				
31	GSK2636771_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	C488(2.98)			F(5.08);(4.75)	F(3.73);(3.76)				
	GSK2636771_2	-5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60				F(5.32);(4.04)	F(3.81);(3.84)				
	GSK2636771_3	-5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	F(3.09)		F(3.06)	F(4.73);(3.86);(4.95)	F(4.56)			C488(5.90)	
32	LIMONIN_1	-6.4	3.0 923 0E- 05	30. 92	F(2.51)			C488(4.34)					
	LIMONIN_2	-6.4	3.0 923 0E- 05	30. 92									



33	Nilotinib_(AMN-107)_1	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31	F(2.27);(3.07)			C488(3. 69)	F(4.47):(5.36)			
	Nilotinib_(AMN-107)_2	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60					F(5.22);(5.44)		F(3.19)	
34	NVP-BHG712_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	F(2.33)	C480(3 .39)			F(5.46)	F(4.50)		
35	Pazopanib_HCL_(GW786034_HCL)_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	N(2.43)	C480(3 .43);(3. 66)				F(4.77)		F(5.65)
36	PF-573228_1	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31	F(2.32)				C488(4.93)	F(4.70)		F(6.00)
	PF-573228_2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	F(2.12)				C488(4.76)			
37	RAF265_(CHIR-265)_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	C480(2.21)					F(4.82);(4.95);(5.30)	N(3.43)	
	RAF265_(CHIR-265)_2	- 5.8	8.1 859	81. 86	F(2.73)	C480(3 .69)						

			3E-05									
38	Regorafenib_(BAY_73-4506)_1	-5.9	6.95991E-05	69.60	C480(2.31);F(2.41)				F(5.08);(4.93)		N(3.12);(3.16)	
	Regorafenib_(BAY_73-4506)_2	-5.8	8.18593E-05	81.86	N(2.01);Y(2.40)			C488(4.21)			C480(3.19)	
	Regorafenib_(BAY_73-4506)_3	-5.8	8.18593E-05	81.86								
	Regorafenib_(BAY_73-4506)_4	-5.8	8.18593E-05	81.86				C488(3.88)	F(5.00)		F(3.15);(3.30);(3.20)	
39	SR-2640_1	-6	5.91751E-05	59.18	F(2.73)				F(5.27);(4.75)			
	SR-2640_2	-5.9	6.95991E-05	69.60	N(2.36)	F(3.17)			F(5.02)			
40	Telatinib_1	-6	5.91751E-05	59.18	F(2.21);(2.49)							C488(5.56)

	Telatinib_2	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	F(2.19)		F( 2. 88 )			F(3.96); F(5.96)			C488(5 .51)
	Telatinib_3	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	F(2.26);(2.51)								C488(5 .37)
41	TG101209_1	- 6.2	4.2 777 0E- 05	42. 78	N(2.13)				F(4.85)	F(4.79)			C(5.23 ;F(5.64 )
	TG101209_2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86									
	TG101209_3	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86									
	TG101209_4	- 5.6	1.1 323 9E- 04	11 3.2 4	F(2.66);	N(3.60 )				F(4.97)			
42	TROGLITAZONE_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	C480(2.77)				F(5.27);(5.42)	F(5.27);( 4.75)			

43	Vistusertib_(AZD2014)_1	-6.4	3.0 923 0E-05	30. 92					F(4.95)				
	Vistusertib_(AZD2014)_2	-6	5.9 175 1E-05	59. 18		C480(3.22)			F(4.98);(5.37)				
Pathogen Box													
1	308_uff_E=570.62_1	-5.8	8.1 859 3E-05	81. 86						F(4.81)			C488(5.00)
2	RingData_uff_E=2 30.33_1	-5.8	8.1 859 3E-05	81. 86				C488(4.33)		F(3.70)			F(3.15)
	RingData_uff_E=2 30.33_2	-5.7	9.6 279 2E-05	96. 28					F(5.45)			N(3.13); (3.14)	
3	RingData_uff_E=2 60.92_1	-5.8	8.1 859 3E-05	81. 86		C480(2.35)			F(3.91)		F(3.99)		C488(5.63)
	RingData_uff_E=2 60.92_2	-5.5	1.3 318 7E-04	13 3.1 9					F(4.72);C488(4.68)				C480(2.15)

4	RingData_uff_E=3 83.44_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	C480(2.86);F( 2.72);(2.26)								
	RingData_uff_E=3 83.44_2	- 5.5	1.3 318 7E- 04	13 3.1 9	C480(2.40)				F(4.75)				
5	RingData_uff_E=3 85.69_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	C480(2.78);(2 .29)					F(4.74)			
	RingData_uff_E=3 85.69_2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C480(2.66)					F(4.73)			
	RingData_uff_E=3 85.69_3	- 5.6	1.1 323 9E- 04	11 3.2 4	C480(2.39)					F(4.75)			
6	RingData_uff_E=3 96.23_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	C480(2.71)					F(5.15)			
	RingData_uff_E=3 96.23_2	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	C480(2.20)					F(5.24)			

7	RingData_uff_E=4 15.56_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	F(2.46);(2.81) ;C488(2.88)				F(4.93);( 4.03)			C488(4 .82)
8	RingData_uff_E=4 34.96_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	C480(2.71);Y( 2.00)			F(4.67)	F(4.91)			
	RingData_uff_E=4 34.96_2	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	Y(2.03);C480( 1.97)			F(4.83);C488(4.6 4)	F(5.02)			
9	RingData_uff_E=4 72.06_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	C488(2.90);F( 2.72);(2.91)			F(5.08)				C488(5 .06);(4. 78)
	RingData_uff_E=4 72.06_2	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	F(2.73);(2.14)			F(4.76)				C488(5 .15);(4. 89)
10	RingData_uff_E=4 72.48_1	- 6.3	3.6 370 2E- 05	36. 37	C480(2.00);F( 2.83)			C488(4.27)	F(5.10)		N(3.61)	
	RingData_uff_E=4 72.48_2	- 6.2	4.2 777 0E- 05	42. 78	C480(2.00);F( 2.85)			C488(4.24)	F(5.05)		N(3.49)	

11	RingData_uff_E=4 96.71_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18	F(2.65)			C488(5. 23)	F(5.09)				
12	RingData_uff_E=4 97.83_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86			F( 3. 20 )			F(3.82);( 4.00)			
	RingData_uff_E=4 97.83_2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C488(3.07)								
13	RingData_uff_E=5 05.94_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C480(2.60)				C488(4.23)	F(5.34);( 5.01)			
14	RingData_uff_E=5 30.99_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86				C488(5. 12)		F(4.81);( 5.14)			
15	RingData_uff_E=4 57.06_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86					F(4.33)				C488(4 .99)
16	RingData_uff_E=5 59.08_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	F(2.38)	C480(3 .59)		C488(4. 35)					C488(3 .84)

17	RingData_uff_E=5 71.32_1	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	F(2.51);(2.32)		F( 3. 23 )						C488(5 .19)
	RingData_uff_E=5 71.32_2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C488(3.03)			C488(4. 97)	C488(4.95)				
18	RingData_uff_E=5 99.23_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C488(2.89);48 0(2.53);(N2.0 8)					F(5.49);( 4.67)			
19	RingData_uff_E=6 15.84_1	- 6.2	4.2 777 0E- 05	42. 78	N(1.83)	C480(3 .37)		C488(4. 70)					F(5.95)
	RingData_uff_E=6 15.84_2	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60	N(2.38)	C480(3 .49)		C488(4. 96)		F(4.73)			F(5.82)
20	RingData_uff_E=6 19.73_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18					F(4.69)	F(4.41)			
21	RingData_uff_E=8 63.81	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31					C488(4.57)	F(5.25)			



22	RingData_uff_E=8 92.76_1	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31				C488(3. 97)	F(5.37)				
23	RingData_uff_E=9 14.57_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	N(3.05)	F(3.35)							F(5.56)
24	RingData_uff_E=1 017.99_1	- 6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31	N(2.56)				C488(4.85)	F(4.83)			F(5.55)
25	RingData_uff_E=1 611.79_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86	C480(2.82)				C488(5.01)	F(3.97)			
ChemBridge													
1	2-amino-4-(2,4- dimethylphenyl)-5- oxo-5,6,7,8- tetrahydro-4H- chromene-3- carbonitrile_1	- 6.2	4.2 777 0E- 05	42. 78									

	2-amino-4-(2,4-dimethylphenyl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chromene-3-carbonitrile_2	- 5.9	6.9 599 1E- 05	69. 60					Y(4.75)			
2	2-amino-5-phenyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(3H)-one_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86					Y(5.08)			
	2-amino-5-phenyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(3H)-one_2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86					Y(5.04)			

3	2-chloro-N-phenyl-5-(4H-1,2,4-triazol-4-yl)benzamide_3	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18					Y(5.21)	Y(4.89)			
4	2-methyl-2,6-diphenyl-4-piperidinol_hydrochloride_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18					Y(4.93)	Y(4.04);(5.14)			
	2-methyl-2,6-diphenyl-4-piperidinol_hydrochloride_2	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18					Y(4.90)	Y(4.04);(5.12)			
5	2-methyl-4-(3-methyl[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol-6-yl)aniline_1	-6.1	5.0 312 4E- 05	50. 31						Y(4.99)			

	2-methyl-4-(3-methyl[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol-6-yl)aniline_2	-6	5.9 175 1E-05	59. 18					Y(4.84)			
6	2-oxo-N-4-pyridinyl-1,2-dihydro-4-quinolinecarboxamide_1	- 6.1	5.0 312 4E-05	50. 31					Y(4.93)			
	2-oxo-N-4-pyridinyl-1,2-dihydro-4-quinolinecarboxamide_2	-6	5.9 175 1E-05	59. 18					Y(4.93);(5.39)			
7	3-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-beta-carbolin-1-yl)phenol_2	- 5.9	6.9 599 1E-05	69. 60					Y(4.78)			

8	3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-1,2,4-triazin-5(4H)-one_1	-6	5.9 175 1E- 05	59. 18					Y(4.54)	Y(4.04)			
9	3-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-6-hydrazinopyridazine_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86					Y(5.41)	Y(5.06)			
10	3-amino-1-(3-pyridinyl)-1H-benzo[f]chromene-2-carbonitrile_1	- 6.3	3.6 370 2E- 05	36. 37					Y(5.09)	Y(4.85); (4.21);(5. 12)			

	3-amino-1-(3-pyridinyl)-1H-benzo[f]chromene-2-carbonitrile_2	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86						Y(4.18);(4.88);(5.19)		
11	3-hydrazino-6-(4-methylphenyl)pyridazine_1	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86						Y(4.76)		
12	3-hydrazino-6-phenylpyridazine	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86						Y(4.80)		
13	9-hydroxy-5-(3-methylphenyl)-7-oxa-5-azatetracyclo[6.3.0.0~2,6~.0~3,10~]undecan-4-one	- 5.8	8.1 859 3E- 05	81. 86					C488(4.50)	F(4.60)		

