

Identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales con posible actividad antiviral frente a la proteasa principal (Mpro) y la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN viral del

SARS-CoV-2

Jeimmy Jatzury Alvarez Jácome

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Dra. en Ciencias Bioquímicas

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa

Dr. en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2023

## **Dedicatoria**

*Le dedico este trabajo de grado a Lucas, por ser mi apoyo incondicional durante todo este recorrido, por acompañarme y escucharme cada vez que lo necesitaba.*

## **Agradecimientos**

*Agradezco primeramente a mis padres, porque sin ellos no tendría este logro, especialmente a mi madre por ser mi apoyo incondicional, a mi hermana y mis amigos, por escucharme y apoyarme cuando me sentía agobiada.*

*A la profesora Stelia por darme la oportunidad de realizar este proyecto y así aprender cosas nuevas e interesantes. A Luis Carlos, por guiarme durante este proceso, por tenerme paciencia y ser tan quisquilloso con todo lo que hacía, haciendo que hoy en día esté acá. A mi compañero Camilo, por su ayuda y complemento en los conocimientos.*

*Muchas gracias a todos.*

## Tabla de Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	13
1. Marco de referencia .....	14
1.1 Coronavirus.....	14
1.2 SARS-CoV-2 .....	15
1.3 Mpro.....	16
1.4 RdRp .....	18
1.5 Diseño de fármacos asistido por computador .....	20
1.5.1 Acoplamiento Molecular .....	20
1.5.1.1 Algoritmos de muestreo.....	21
1.5.1.2 Funciones de puntuación.....	21
1.5.2 Dinámica Molecular.....	23
1.5.2.1 Campos de fuerza.....	24
1.6 Plantas medicinales como antivirales .....	25
2. Objetivos .....	27
2.1 Objetivo General .....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. Metodología .....	27
3.1 Fase de búsqueda .....	28
3.2 Fase <i>in silico</i> .....	29
3.2.1 Preparación de proteínas y ligandos .....	29
3.2.2 Acoplamiento molecular.....	30

3.2.3 Análisis de MM-GBSA .....	31
3.2.4 Simulaciones de dinámica molecular.....	31
4. Resultados y discusión .....	32
4.1 Mejores metabolitos según su potencial inhibitorio .....	32
4.2 Estabilidad del complejo mediante dinámica molecular .....	42
4.3 Análisis de interacciones proteína-ligando .....	45
5. Conclusiones .....	48
6. Recomendaciones .....	48
Agradecimientos .....	48
Divulgación de resultados.....	49
Referencias Bibliográficas .....	50
Anexos .....	69
Anexo A.....	69
Anexo B .....	69
Anexo C .....	71
Anexo D.....	72
Anexo E .....	73
Anexo F.....	73

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1 <i>Puntuaciones de acoplamiento y cálculo de energía libre de unión de los 10 metabolitos mejor clasificados contra la proteasa principal del SARS-CoV-2 (Mpro) junto con sus propiedades ADME. ....</i>	33
Tabla 2 <i>Puntuaciones de acoplamiento y cálculo de energía libre de unión de los 10 metabolitos mejor clasificados contra la RdRp del SARS-CoV-2 junto con sus propiedades ADME .....</i>	38

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1 <i>Estructura cristalina de la proteína Mpro del SARS-CoV-2 a una resolución de 1.95 Å (PDB ID: 6Y2F)</i> .....	17
Figura 2 <i>Estructura cristalina de la proteína RdRp del SARS-CoV-2 a una resolución de 2.50 Å (PDB ID: 7BV2)</i> .....	19
Figura 3 <i>Esquema metodológico del plan de trabajo</i> .....	28
Figura 4 <i>Visualización 3D de las interacciones entre los metabolitos seleccionados y la proteína Mpro</i> .....	35
Figura 5 <i>Visualización 3D de las interacciones entre el inhibidor N3 y la proteína Mpro</i> .....	37
Figura 6 <i>Visualización 3D de las interacciones entre los metabolitos seleccionados y la RdRp</i> . 40	40
Figura 7 <i>Visualización 3D de las interacciones entre el inhibidor Remdesivir y la RdRp</i> .....	41
Figura 8 <i>Valores de RMSD para el complejo Mpro-cleistanina B</i> .....	43
Figura 9 <i>Cambios posicionales de la cleistanina B durante la réplica 1</i> .....	44
Figura 10 <i>Interacciones del complejo Mpro-cleistanina B a lo largo de la simulación</i> .....	46

## Glosario

**Mpro:** proteasa principal del SARS-CoV-2

**RdRp:** ARN polimerasa dependiente de ARN viral

**HTVS:** *High-throughput virtual screening*/ detección virtual de alto rendimiento

**SP:** *Standar precision*/ precisión estándar

**XP:** *Extra precision*/ extra precisión

**CADD:** *Computer-aided drug design*/ Diseño de fármacos asistido por computador

**FF:** *Force field*/ Campo de fuerza

**Propiedades ADME:** absorción, distribución, metabolismo y excreción

**MM-GBSA:** *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area*/ mecánica molecular con Born generalizado y solvatación de área superficial

**RMSD:** *Root-mean-square deviation*/ Desviación cuadrática media de las posiciones atómicas

## Resumen

**Título:** Identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales con posible actividad antiviral frente a la proteasa principal (Mpro) y la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN viral del SARS-CoV-2\*

**Autor:** Jeimmy J. Alvarez-Jácome\*\*

**Palabras Clave:** Proteasa principal, RdRp, Acoplamiento molecular, SARS-CoV-2, COVID-19

La pandemia del COVID-19 causada por el virus del SARS-CoV-2 continúa siendo una crisis de salud pública a nivel mundial debido a las variantes emergentes. A pesar de la existencia de vacunas y tratamientos contra este virus, se siguen reportando miles de casos a diario. por lo que es necesario el desarrollo de nuevas terapias y medicamentos para prevenir y tratar esta enfermedad. En esta investigación, se busca identificar posibles inhibidores para proteínas target de este virus a partir de una base de datos de 4274 metabolitos de plantas medicinales, donde se proponen dos de estos como posibles inhibidores frente a dos proteínas diana del SARS-CoV-2 involucradas en el proceso de replicación; la proteasa principal (Mpro) y a la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp). Para lograr esto, se emplearon herramientas del diseño de fármacos asistido por computador, analizando las interacciones comunes con residuos claves involucrados en el sitio activo de las proteínas, su estabilidad dentro del bolsillo de unión y energía libre de unión. Los resultados obtenidos sugieren a la cleistanina B como inhibidor de la Mpro debido a sus interacciones con residuos claves como His 41, Thr 26, Glu 166, Gln 189, los cuales se encuentran involucrados en el sitio activo de la proteasa desempeñando un papel importante en la catálisis y la especificidad del sustrato. Asimismo, la indometacina se sugiere como inhibidor

de la RdRp al interactuar con residuos claves como Asp 760, Ser 814 y los iones de  $Mg^{2+}$ , los cuales son importantes en la unión de nucleótidos y catálisis de la reacción de polimerización. En general, estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre el posible mecanismo de inhibición de la cleistantina B y la indometacina para inhibir el ciclo de vida viral del SARS-CoV-2.

## Abstract

**Title:** Identification of secondary metabolites of medicinal plants with possible antiviral activity against the main protease (Mpro) and the RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2\*

**Author(s):** Jeimmy J. Alvarez-Jácome\*\*

**Key Words:** Main protease, RdRp, Molecular docking, SARS-CoV-2

The COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus continues to be a global public health crisis due to emerging variants. Despite the existence of vaccines and treatments against this virus, thousands of cases continue to be reported daily. For this, it is necessary to develop new therapies and medicines to prevent and treat this disease. In this research, it is sought to identify possible inhibitors for target proteins of this virus from a database of 4274 medicinal plant metabolites, where two of these are proposed as potential inhibitors against two target proteins of SARS-CoV-2 involved in the replication process; the main protease (Mpro) and viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). To achieve this, computer-aided drug design tools were employed, analyzing common interactions with key residues involved in the active site of proteins, their stability within the binding pocket, and free binding energy. The obtained results suggest cleistanthin B as an Mpro inhibitor due to its interactions with key residues such as His 41, Thr 26, Glu 166, Gln 189, which are involved in the active site of protease playing an important role in catalysis and substrate specificity. Indomethacin is also suggested as an RdRp inhibitor by interacting with key residues

---

\* Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Dra. Stelia Carolina Mendez S. Codirector: Dr. Luis Carlos Vesga.

such as Asp 760, Ser 814, and  $Mg^{2+}$  ions, which are essential for binding nucleotide and catalysis of the polymerization reaction. In general, these results provide new insights into the possible inhibition mechanism of cleistanthin B and indomethacin to inhibit the viral life cycle of SARS-CoV-2.

## Introducción

En 2019, el SARS-CoV-2, un nuevo coronavirus del SARS perteneciente a los betacoronavirus, generó la enfermedad conocida como COVID-19 (Gurung et al., 2020). A marzo de 2023, se han registrado cifras superiores a los 759 millones de casos, pese a que se cuenta con vacunas aprobadas los contagios diarios siguen en aumento, convirtiéndose en uno de los desafíos más importantes para los sistemas sanitarios mundiales (Rut et al., 2021). El análisis del genoma del SARS-CoV-2 reveló que este virus posee cuatro proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápside (N), la proteína de envoltura (E), la proteína pico (S) y la proteína de membrana (M); además de la existencia de las proteínas no estructurales, las cuales son un factor de patogenicidad viral, siendo esenciales para la replicación del genoma y la producción del virión (Ashour et al., 2020). Dentro de las proteínas no estructurales se encuentran las proteínas PLpro, Mpro, la helicasa y la ARN polimerasa, entre otras (Bharadwaj et al., 2020; Raj, 2021). La proteasa principal, Mpro (también conocida como 3CLpro) es una diana farmacológica para el desarrollo de inhibidores, puesto que esta se encarga de escindir a las poliproteínas virales y es sustancial en el ciclo de replicación del virus (Lokhande et al., 2020). Al igual que la Mpro, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) se propone como un blanco terapéutico, ya que está presente en la replicación y transcripción del genoma del SARS-CoV-2, siendo el producto de escisión de las poliproteínas pp1a y pp1ab (Ahmad et al., 2020).

Dado que el SARS-CoV-2 continúa propagándose debido a su evolución constante, surgiendo así nuevas variantes que debilitan la potencia de las vacunas y tratamientos actuales para combatir su enfermedad, existe aún el desafío tanto en el desarrollo de vacunas como de agentes antivirales capaces de prevenir o tratar sus complicaciones (H. Li et al., 2022).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio tuvo como finalidad la identificación de metabolitos secundarios con posible actividad antiviral que interactúen con las enzimas Mpro y RdRp del SARS-CoV-2 mediante ensayos *in silico* y contribuir así a la búsqueda de nuevos compuestos que eviten la propagación del virus.

## 1. Marco de referencia

### 1.1 Coronavirus

Los coronavirus son virus envueltos con genomas de ARN monocatenario de sentido positivo (Chen et al., 2020) que afectan predominantemente a los animales, aunque desde hace algunas décadas han superado la barrera de especies e infectado a los humanos (Schoeman & Fielding, 2020). Se han identificado siete coronavirus humanos (hCoV), 229E, NL63, OC43, HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2, de los cuales, los cuatro primeros causan infecciones autolimitadas de leves a moderadas; mientras que los tres últimos son más virulentos causando en las últimas dos décadas brotes mortales (Chafekar & Fielding, 2018; Liang et al., 2020; Kahn & McIntosh, 2005; Pyrc et al., 2007; Su et al., 2016).

Los coronavirus altamente patógenos se agrupan en cuatro géneros: *alfa*, *beta*, *gamma* y *deltacoronavirus*, los dos primeros a su vez se etiquetan como 1a-1b para los alfacoronavirus y 2a-2d para los betacoronavirus. El SARS-CoV y MERS-CoV pertenecen a los subgrupos 2b y 2c de los betacoronavirus respectivamente (Su et al., 2016); mientras que el SARS-CoV-2 es un nuevo miembro de este género distinto a los mencionados anteriormente (Zhou et al., 2020), haciendo parte del subgénero sarbecovirus (Lvov & Alkhovsky, 2020). Virus como el SARS-CoV infectan las células epiteliales dentro del pulmón e invaden macrófagos y células dendríticas; la

infección de las células dendríticas puede ser necesaria para la activación y secreción de citocinas proinflamatorias o antivirales que en su defecto conducirían a la enfermedad (H. K. W. Law et al., 2005; Sofi et al., 2020). Aunque la causa del daño inmunomediado continua sin ser determinada, se conocen los principales métodos de transmisión los cuales son por gotitas, contacto y fecal-oral; además de sintomatología similar en los tres coronavirus mortales como fiebre, dolor muscular, dificultad para respirar y tos, entre otros (Chen et al., 2020). Este virus, al igual que el SARS-CoV-2 puede causar el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), el cual es la etapa crítica de la enfermedad, donde ocurre una inflamación completa en los pulmones como resultado de la respuesta inmunitaria a la infección viral (Liang et al., 2020).

## **1.2 SARS-CoV-2**

El SARS-CoV-2 es un betacoronavirus esférico que causa la enfermedad COVID-19, cuyo ARN presenta una región 5' no traducible (UTR), un gen que codifica el complejo replicasa (ORF1ab), cuatro proteínas estructurales- proteína pico (S), de envoltura (E), de membrana (M) y nucleocápside (N)-; una región 3' UTR y otros marcos abiertos de lectura (ORFs) (Lam Cabanillas et al., 2021; Zhu et al., 2020).

Por otro lado, es necesario comprender el ciclo de infección del virus para desarrollar tratamientos que combatan la enfermedad. Este comienza con la unión del SARS-CoV-2 a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), a través de la proteína estructural S permitiendo su entrada al citosol de la célula huésped, seguido de su desprendimiento y biosíntesis de polipéptidos empleando la maquinaria de la célula huésped (Ashour et al., 2020; Hu et al., 2021). Luego, se sintetiza su ARN utilizando la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) para formar el complejo de replicación con varias proteínas estructurales y no

estructurales, las cuales son catalizadas por la proteasa principal (Mpro) y la proteasa similar a la papaína (PLpro) (Baric & Yount, 2000; Gajjar et al., 2021; Jin et al., 2020).

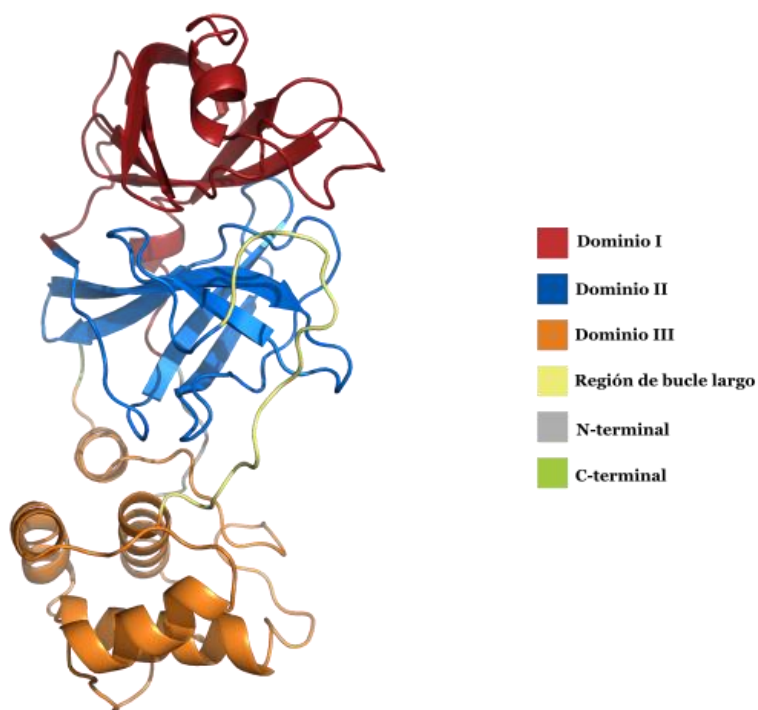
Por consiguiente, las proteínas mencionadas anteriormente, podrían servir como objetivos farmacológicos en la búsqueda de inhibidores del SARS-Cov-2 (Gajjar et al., 2021).

### 1.3 Mpro

La proteasa principal es una de las proteasas que se encargan del procesamiento proteolítico del polipéptido del virus, escindiéndolo en 11 sitios distintos para generar varias proteínas no estructurales importantes en la replicación del virus (Tahir ul Qamar et al., 2020). Esta proteasa desempeña un papel fundamental en la maduración y replicación de las partículas virales, por lo que es un objetivo potencial para el desarrollo de fármacos anti-SARS-CoV-2 (Ghosh et al., 2021). Esta proteasa es una molécula hidrófila de dos cadenas (A y B), compuesta por 306 aminoácidos, los cuales están divididos en tres dominios (dominio I, dominio II y dominio III- **Figura 1**). Los dominios I y II conformados por seis laminas  $\beta$  y los residuos 8-101 y 102-184, respectivamente; cinco hélices  $\alpha$  forman el dominio III (201-303), este dominio se conecta al dominio II a través de una región de bucle largo (185-200). Igualmente tiene un dominio N-terminal encargado de la dimerización que mantiene la conformación activa (1-7) y un extremo C-terminal (304-306) (Mengist et al., 2021; Tahir ul Qamar et al., 2020). La Mpro tiene una díada catalítica formada por los aminoácidos Cys 145-His 41, y el sitio de unión al sustrato está ubicado en una hendidura entre el dominio I y el dominio II (Jin et al., 2020). Algunos autores han subdividido este sitio activo en S1, S1', S2 y S4, donde los inhibidores podrían formar un enlace covalente con el grupo tiol de Cys 145. Este subsitio está formado por Phe 140, Leu 141, Asn 142, Ser 144, His 163-164, Glu 166 e His 172. Luego, en una pequeña cavidad separada por el residuo Asn 142 se ubica el subsitio S1', compuesto por los residuos Thr 25, Thr 26, Leu 27 y Cys 145. El subsitio hidrofóbico S2 está

formado por los residuos His 41, Cys 44, Met 49, Tyr 54. Finalmente, el subsitio S4 está formado por los residuos aminoacídicos Met 165, Leu 167, Phe 189, Thr 190 y Gln 192 (P. Sharma et al., 2021; Vesga et al., 2022).

**Figura 1** Estructura cristalina de la proteína Mpro del SARS-CoV-2 a una resolución de 1.95 Å (PDB ID: 6Y2F)



*Nota.* La figura indica los dominios I (rojo), II (azul) y III (naranja), región de bucle largo (amarillo), y los terminales N- (gris) y C- (verde).

Uno de los inhibidores de la proteasa principal es el Ebselen, un compuesto de organoselenio con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citoprotectoras, con una citotoxicidad extremadamente baja (la dosis letal media en ratas es  $> 4600 \text{ mg kg}^{-1}$ , cuando se toma por vía oral) (Renson et al., 1982). El cual se une de manera covalente al residuo Cys 145 y

mediante un puente de hidrógeno con la His 41, además de mostrar inhibición contra el SARS-CoV-2 con valores de concentración efectiva media máxima individual ( $EC_{50}$ ) de 4,67  $\mu$ M en células Vero infectadas (Jin et al., 2020).

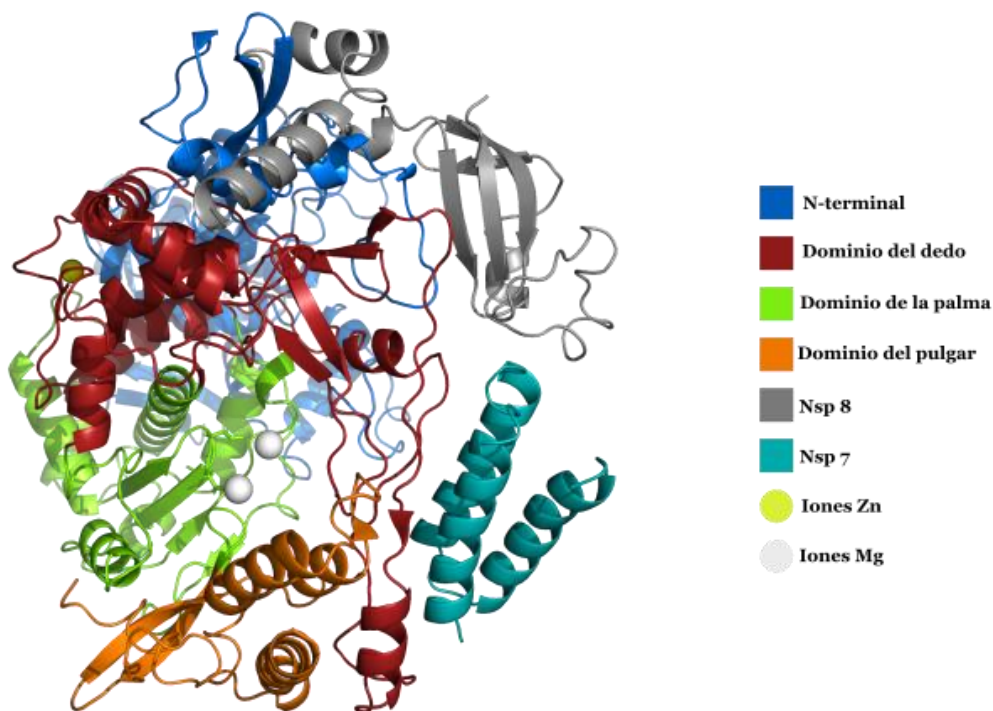
#### **1.4 RdRp**

La ARN polimerasa dependiente de ARN viral es el producto de la escisión de las poliproteínas 1a y 1ab de ORF1a y ORF1ab (Kirchdoerfer & Ward, 2019). Esta enzima también conocida como nsp12, es altamente conservada entre los virus de ARN, la cual para lograr una actividad completa depende de los iones de  $Mg^{2+}$ , ubicados cerca del sitio activo que pueden mejorar la función catalítica, además de las proteínas no estructurales nsp7 y nsp8, las cuales desempeñan funciones esenciales en la formación y actividad de la maquinaria de síntesis del ARN (Kirchdoerfer & Ward, 2019; Mosquera-Yuqui et al., 2020). La RdRp participa en la replicación y transcripción del genoma del SARS-CoV-2 (Ahmad et al., 2020) haciéndola uno de los objetivos farmacológicos más intrigantes y prometedores para el desarrollo de medicamentos (W. Zhu et al., 2020). Esta proteína tiene aproximadamente 900 aminoácidos (Figura 2) y está conformada por el dominio N-terminal (residuos 397) y el dominio principal de polimerasa que a su vez tiene tres subdominios (dedo, palma y pulgar). El subdominio del dedo (residuos 398-581, 638-687), el subdominio de la palma (582-627, 688-815) y el subdominio del pulgar (816-919) (Ahmad et al., 2020; Vesga et al., 2022).

De igual manera, la RdRp requiere de dos iones Zn adicionales para su estabilidad estructural. Estos iones se unen a His 295, Cys 301, Cys 306 y Cys 310 en el dominio N-terminal y a Cys 487, His 642, Cys 645 y Cys 646, ubicados en el subdominio del dedo (Ahmad et al., 2020; Mishra & Rathore, 2022). La RdRp involucra varios residuos clave a la hora de interactuar con

compuestos, sin embargo, su sitio activo está conformado por dos aspartatos adyacentes, Asp 760 y Asp 761 (Ahmad et al., 2020).

**Figura 2** Estructura cristalina de la proteína RdRp del SARS-CoV-2 a una resolución de 2.50 Å (PDB ID: 7BV2).



*Nota.* La figura indica el dominio N-terminal (azul); los subdominios dedo (rojo), palma (verde) y pulgar (naranja), nsp8 (gris), nsp7 (cian), iones Zn (amarillo) y Mg (blanco).

La proteína RdRp cuenta con un inhibidor de acción directa, Remdesivir, el cual es un profármaco de fosforamidato que se metaboliza en las células para producir un análogo de nucleósido trifosfato (NTP) activo, dado que su forma de trifosfato (RDV-TP) es parecida al ATP, por lo que es utilizado como sustrato de varias enzimas o complejos de RdRp (Gordon et al., 2020; Kokic et al., 2021; Siegel et al., 2017), el cual forma interacciones electrostáticas con los

aminoácidos del sitio activo, especialmente con Asp 760, Asp 761, Ser 814, entre otros; siendo una unión estable y que no perturba la estructura de la proteína tras la unión (Khan et al., 2021).

## **1.5 Diseño de fármacos asistido por computador**

Descubrir y desarrollar un nuevo fármaco tarda entre 10 y 15 años y su coste ronda los 800 millones de dólares (Baig et al., 2018). Por tal razón, el diseño de fármacos asistido por computador (CADD- *computer-aided drug design*) ha sido una herramienta útil en la búsqueda de posibles compuestos terapéuticos, siendo así, una alternativa adecuada que se utiliza de forma rutinaria en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, debido a que ayuda a minimizar los esfuerzos de pruebas sintéticas y biológicas centrándose solo en los compuestos más prometedores (Anwar et al., 2021; Tomar et al., 2019). El enfoque CADD se utiliza en 4 fases: (1) identificar aciertos mediante cribado virtual (VS) entre la biblioteca de moléculas pequeñas contra el objetivo, (2) investigar la especificidad de dichos aciertos en el sitio activo de otros objetivos mediante acoplamiento molecular, (3) predecir las propiedades ADME de la molécula prometedora y (4) optimizarla mediante el diseño de mejores moléculas para la síntesis y pruebas. En función de la disponibilidad de la estructura 3D de la proteína diana, las técnicas CADD se agrupan en dos tipos: diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD) y basado en ligandos (LBDD) (Arya & Coumar, 2021).

El SBDD es un método *in silico* que ayuda a identificar posibles aciertos entre cientos de miles de compuestos contra el objetivo de una estructura conocida mediante estudios de acoplamiento y dinámica molecular (Tomar et al., 2019).

### **1.5.1 Acoplamiento Molecular**

El acoplamiento molecular es una técnica computacional ampliamente utilizada para modelar la interacción entre una molécula pequeña y una proteína, lo que permite caracterizar el

comportamiento de estas moléculas en el sitio activo del objetivo (Baig et al., 2018). Este proceso consta de dos pasos básicos: la predicción de la conformación del ligando dentro del sitio activo (pose) y la evaluación de la afinidad de unión, los cuales están relacionados con los algoritmos de muestreo y las funciones de puntuación, respectivamente (Meng et al., 2011).

**1.5.1.1 Algoritmos de muestreo.** Los algoritmos de muestreo permiten la visualización de una gran cantidad de posibles conformaciones entre dos moléculas, teniendo en cuenta los seis grados de libertad de traslación y rotación, así como los grados de libertad conformacionales tanto del ligando como de la proteína. Algunos algoritmos de muestreo son los algoritmos de coincidencia, de construcción elemental, MCSS, Monte Carlo, dinámica molecular, entre otros (Meng et al., 2011).

**1.5.1.2 Funciones de puntuación.** Las funciones de puntuación tienen como propósito delinear las poses correctas de las incorrectas o los aglutinantes de los compuestos inactivos en un tiempo de cálculo razonable. Sin embargo, las funciones de puntuación estiman la afinidad de unión entre la proteína y el ligando y, adoptan varias suposiciones y simplificaciones. Estas se pueden dividir en funciones de puntuación basadas en campos de fuerza, empíricas y basadas en el conocimiento (Meng et al., 2011).

Dos de los softwares usados en el campo del CADD son AutoDock y Glide. El primero emplea una función de puntuación basada en campos de fuerza extendida (Huey et al., 2007), expresada en la **ecuación 1**, la cual muestra que para dos átomos  $i,j$ , la energía atómica por pares se evalúa mediante la suma de Van der Waals, los puentes de hidrógeno, la energía de Coulomb y la desolvatación (Meng et al., 2011).

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}$$

**Ecuación 1.** Función de puntuación basada en campos de fuerza extendida de AutoDock

Por otra parte, Glide emplea una función empírica (Halgren et al., 2004), la cual tiene en cuenta varios términos energéticos diferentes, mostrados en la **ecuación 2**. Esta función está diseñada para maximizar la separación de compuestos con fuerte afinidad de unión de aquellos con poca o nula capacidad de unión y se expresa como la sumatoria de energía empírica producida por la entropía, las interacciones mediadas por puentes de hidrógeno, electrostáticas, Van der Waals, hidrofóbicas y la desolvatación (Friesner et al., 2006; Huang & Zou, 2010).

$$\Delta G_{bind} = C_0 + C_{lipo} \sum f(r_r) + C_{hbond} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{metal} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb} H_{rotb}$$

**Ecuación 2.** Función de puntuación empírica de Glide.

Cabe destacar que las funciones  $f$ ,  $g$  y  $h$  calculan una puntuación completa para distancias de enlace dentro de los límites nominales, así como una puntuación parcial para distancias de enlace fuera de límites (Eldridge et al., 1997). Razón por la cual, Glide demuestra ser una herramienta fundamental para la estimación de puntuaciones de acoplamiento dentro de la interface proteína-ligando, puesto que tiene en cuenta las interacciones involucradas, distancias de enlace generadas y las propiedades termodinámicas.

Además, la metodología de acoplamiento de Glide presenta tres opciones de precisión, desde el modo HTVS (*high-throughput virtual screening*) para enriquecer de manera eficiente bibliotecas muy extensas, seguido del modo SP (*standard precision*) para acoplar de manera confiable decenas a cientos de miles de ligando con una alta precisión, y finalmente el modo XP

(*extra precision*) donde se logra una mayor eliminación de falsos positivos mediante un muestreo más extenso y una puntuación avanzada, dando como resultado un enriquecimiento mayor (Friesner et al., 2004; Halgren et al., 2004).

Asimismo, técnicas de simulación de dinámica molecular proporciona información relevante complementaria con la del acoplamiento, siendo así, una herramienta importante en el descubrimiento de fármacos *in silico*.

### **1.5.2 Dinámica Molecular**

Las simulaciones de dinámica molecular se usan para estudiar las interacciones proteína-ligando de manera más detallada, para generar conjuntos conformacionales para el objetivo y, en combinación con otros métodos utilizados para estimar las energías libres relativas de enlace (Yu & MacKerell, 2017). El estudio de estos comportamientos es dependiente del tiempo y se obtienen resolviendo las ecuaciones diferenciales de segundo orden representadas por la segunda ley de Newton, **ecuación 3**. En esta ecuación, la configuración instantánea está representada por el vector  $\mathbf{x}(t)$ , que describe la posición de los  $N$  átomos que interactúan en el espacio cartesiano.

$$\mathbf{f}_i(t) = m_i \mathbf{a}_i(t) = - \frac{\partial V(\mathbf{x}(t))}{\partial \mathbf{x}_i(t)}$$

**Ecuación 3.** Segunda ley de Newton

Para el descubrimiento y diseño de fármacos, se adopta una descripción mecánica clásica de las fuerzas, por lo que se introduce una función de energía potencial empírica ( $V(\mathbf{x})$ ) mostrado en la ecuación 3), y el modelo que surge de esta representación simplificada se denomina campo de fuerza.

$$V = \sum_i^{\text{bonds}} \frac{k_{l,i}}{2} (l_i - l_{0,i})^2 + \sum_i^{\text{angles}} \frac{k_{\alpha,i}}{2} (\alpha_i - \alpha_{0,i})^2 + \sum_i^{\text{torsions}} \left\{ \sum_k^M \frac{V_{ik}}{2} [1 + \cos(n_{ik} \cdot \theta_{ik} - \theta_{0,ik})] \right\} \\ + \sum_{i,j}^{\text{pairs}} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i,j}^{\text{pairs}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}}$$

**Ecuación 4.** Función de energía potencial

En la **ecuación 4**, los primeros tres términos representan interacciones intramoleculares de los átomos, describiendo las variaciones en la energía potencial como una función del estiramiento, flexión y las torsiones de los enlaces entre los átomos que están directamente involucrados en las relaciones de enlace, a su vez están representados por sumas sobre longitudes de enlace, ángulos y ángulos diédricos, respectivamente (de Vivo et al., 2016).

Las interacciones electrostáticas y de Van der Waals entre átomos, se representan en los términos cuarto y quinto, respectivamente y se denotan como términos “no enlazados”. Estas contribuciones actúan sobre cada par de átomos en el sistema que aún no está cubierto por la contraparte enlazada. La energía se expresa como una función potencia inversa de la distancia entre los átomos considerados,  $r_{ij}$ . Las fuerzas no ligadas surgen debido a las interacciones de Van der Waals, modeladas utilizando el potencial Lennard-Jones 6-12 e interacciones cargadas (electrostáticas), modeladas utilizando la ley de Coulomb (Durrant & McCammon, 2011).

Para realizar estudios de dinámica molecular u otras técnicas CADD, se necesitan campos de fuerzas empíricos para las moléculas de interés. Estos campos de fuerza son utilizados por los respectivos programas para estimar la energía y las fuerzas asociadas con, por ejemplo, un complejo de proteína y fármaco (Yu & MacKerell, 2017).

**1.5.2.1 Campos de fuerza.** Los campos de fuerza (*FF-force field*) se emplean en el modelado molecular debido a que aceleran considerablemente los cálculos, lo que permite

simulaciones de dinámica molecular extendidas de grandes sistemas biomoleculares (de Vivo et al., 2016).

Los campos de fuerza son usados para la clasificación de las poses de ligandos obtenidas mediante un algoritmo de acoplamiento, o en programas de diseño de ligandos de *novο* para sugerir la posición de los fragmentos en sitios de la enzima con la mayor afinidad de unión. De igual manera, los FF son útiles a la hora de calcular la energía de interacción entre la proteína y el ligando como potenciales de interacción por pares que consisten en interacciones electrostáticas y de Van der Waals, además de la energía del puente de hidrógeno entre el ligando y la enzima, del mismo modo, calcular las perturbaciones de energía libre (FEP) que permiten el diseño de nuevos inhibidores con una predicción precisa de su actividad (Pissurlenkar et al., 2009).

## **1.6 Plantas medicinales como antivirales**

Las plantas contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios estructuralmente diversos que se desarrollan principalmente como mecanismos de defensa contra depredadores y herbívoros, que median la polinización, y protegen contra el estrés abiótico (Pichersky & Gang, 2000). Cabe destacar, que las concentraciones de metabolitos secundarios dependen de dos factores: la etapa de crecimiento y el estrés biótico y abiótico al que esté sometida la planta (Puttaswamy et al., 2020); por lo que, generalmente se encuentran bajas concentraciones de estos y requiere emplear gran cantidad de material vegetal para obtener una muestra significativa del compuesto natural requerido.

Por otra parte, el uso de plantas medicinales es una práctica milenaria debido a sus efectos inmunológicos y sus propiedades antivirales. Estudios reportan por medio de ensayos *In vitro*, la evaluación de raíces secas de *Glycyrrhiza glabra*, empleada en el tratamiento del virus de la influenza A, VIH y rotavirus, entre otros; encontrando que las moléculas de esta planta ejercen

actividad antiviral e inhiben el SARS-CoV en las primeras etapas del ciclo de replicación viral (Chandramouli et al., 2021; Cinatl et al., 2003; Goma & Abdel-Wadood, 2021; Hoever et al., 2005). Una razón para explicar lo anterior, es que esta planta contiene fitomoléculas de glicirricina, las cuales tienen la capacidad de interferir con la transducción de señales virales, además de producir una regulación positiva de NO, generando una actividad inmunomoduladora (Fiore et al., 2008). De igual manera, algunos extractos de especies de plantas como *Artemisia annua*, *Pyrrhosia lingua*, *Lindera aggregata*, *Lycoris radiata* y sus derivados han reportado actividad anti-SARS-CoV en ensayos *in vitro*, en los cuales la dependencia de las dosis con actividad antiviral se determinó por medio de diluciones en serie en células Vero E6 y HepG2, realizando pruebas de citotoxicidad para los compuestos activos basados en la viabilidad celular después de tratarlas con distintas concentraciones de compuestos; donde el mecanismo de acción de dichos compuestos naturales, se da principalmente por la inhibición de la replicación viral de SARS-CoV, haciendo que sean viables en los tratamientos contra la enfermedad. (Li et al., 2005).

Por lo anterior, este trabajo de investigación tuvo los siguientes objetivos:

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Identificar metabolitos de plantas medicinales que muestren posible actividad inhibitoria para la proteasa principal (Mpro) o la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN viral del SARS-CoV-2.

### 2.2 Objetivos Específicos

Identificar metabolitos secundarios de plantas de medicinales como posibles inhibidores de las proteínas Mpro y RdRp mediante cribado virtual.

Proponer un modo de acoplamiento entre los inhibidores potenciales y las proteínas diana, usando herramientas computacionales.

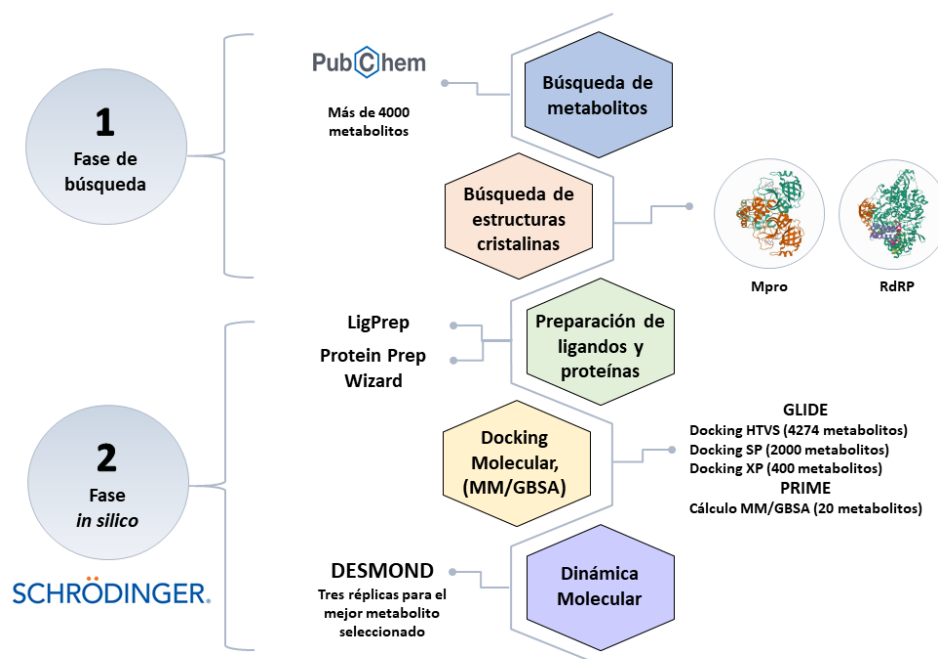
Evaluar la estabilidad de unión de los ligandos en el sitio de unión de las proteínas estudiadas a lo largo de una trayectoria de dinámica molecular.

## 3. Metodología

Este trabajo de grado se llevó a cabo siguiendo el esquema metodológico descrito en la **Figura 3**. En primer lugar, se creó una base de datos de 4274 metabolitos presentes en plantas reportadas con actividad antiviral, teniendo en cuenta las enfermedades que podrían tratar y la planta de procedencia. Luego se realizó un screening virtual con las proteasas Mpro y RdRp, en diferentes precisiones (HTVS, SP y XP) donde se identificaron los mejores metabolitos según las interacciones aminoacídicas presentadas y el puntaje de acoplamiento. Posteriormente a estos metabolitos se les calculó las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y la energía libre de unión de ligandos a proteínas mediante Molecular

Mechanics/Generalized Born Surface Area (MM-GBSA). Por último, se realizaron simulaciones por medio de dinámica molecular para estudiar la estabilidad de la interacción y los contactos entre proteína y ligando.

**Figura 3** Esquema metodológico del plan de trabajo



### 3.1 Fase de búsqueda

En esta primera fase se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la proteasa principal (Mpro) y la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) del SARS-CoV-2 con el fin de conocer su actividad catalítica, sitios activos, residuos involucrados en la actividad proteasa o sitios de unión reportados en la literatura; de igual manera se realizó una búsqueda de metabolitos de plantas medicinales, con los cuales se creó una base de datos que contenía su procedencia y la actividad antiviral que posee. Una vez identificados los metabolitos, se descargaron sus estructuras

químicas de la PubChem en formato .SDF y se consignaron en el software Maestro, donde se realizaron los estudios de la fase *in silico*.

### **3.2 Fase *in silico***

Esta fase se llevó a cabo empleando métodos computacionales como el acoplamiento molecular y la simulación de dinámica molecular.

#### **3.2.1 Preparación de proteínas y ligandos**

Para realizar el cribado virtual, primero se obtuvieron las estructuras cristalinas de las proteínas diana consignadas en la Protein Data Bank (PDB); para la proteasa principal se empleó la estructura consignada bajo la ID: 6Y2F (resolución 1,95 Å) (Fakhar et al., 2021), y para la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN viral (ID: 7BV2, resolución 2,95 Å) (Yin et al., 2020). Estas se prepararon haciendo uso de la herramienta Protein Preparation Wizard presente en el módulo *Drug Discovery de Schrödinger* (Madhavi Sastry et al., 2013), donde se determinaron los estados de protonación a pH 7.2 empleando el campo de fuerza Optimized Potentials for Liquid Simulations (OPLS4) (Lu et al., 2021), se optimizó el espacio de los átomos superpuestos, los hidrógenos faltantes se agregaron, además se minimizó la energía de estas y finalmente se refinó su estructura. En el caso de la RdRp, se preparó la proteína dejando la cadena A, que es la ARN polimerasa dirigida por ARN, los iones  $Mg^{2+}$ , importantes en el sitio activo de la enzima, y los iones  $Zn^{2+}$ , importantes para la estabilidad estructural (Yin et al., 2020); esto con el fin de reducir el costo computacional.

Por otra parte, las estructuras químicas de los metabolitos fueron obtenidas de la PubChem y se cargaron a la interfaz de Maestro 2021-1 de Schrödinger, donde se prepararon a través de la herramienta LigPrep (Madhavi Sastry et al., 2013), disminuyendo la energía de cada uno y

estableciendo su estado de protonación a pH 7.2, además su conformación más estable se estableció empleando el campo de fuerza OPLS4 (Lu et al., 2021).

### ***3.2.2 Acoplamiento molecular***

Una vez preparadas las estructuras tanto de los ligandos como de las proteínas, se analizó el acoplamiento entre ellos, empleando el paquete molecular de Drug Design Schrödinger, versión 2021-1.

Los parámetros del sitio de unión de la proteína para el acoplamiento molecular se establecieron para cada una de las proteínas diana. Para la proteína Mpro, el tamaño de la grid box fue de 15Å con coordenadas centrales en X=9.81, Y=-1.47 y Z=20.51 (Fakhar et al., 2021). Para el caso de la RdRp, la estructura cristalina se encuentra con el Remdesivir, por lo que las coordenadas centrales de la grid box se establecieron en la posición de dicho ligando co-cristalizado (Yin et al., 2020), con un tamaño de 15Å.

Las simulaciones de acoplamiento molecular se establecieron para receptor rígido y ligando flexible. Estas simulaciones se realizaron empleando la herramienta Glide en tres etapas de acoplamiento High Throughput Virtual Screening (HTVS), Standard Precision (SP) y Extra Precision (XP) (Fakhar et al., 2021). En la primera etapa, HTVS se generaron tres poses por ligando y se seleccionaron alrededor del 50% de los metabolitos basándose en la inspección visual, sus interacciones con residuos relevantes para la actividad de la proteína y su puntaje de acoplamiento. Para la segunda etapa del acoplamiento, SP; igualmente se generaron tres poses por ligando, donde se descartó el 30% de los seleccionados en la etapa anterior y los compuestos resultantes de esta etapa se acoplaron posteriormente utilizando acoplamiento XP, el cual es un modo más preciso, generando cinco poses por ligando y seleccionando veinte metabolitos a través de parámetros como el puntaje de acoplamiento e inspección visual de las interacciones con

aminoácidos como His 41, Cys 145 y demás aminoácidos claves en la actividad de la proteína Mpro (Tahir ul Qamar et al., 2020). Por otro lado, para la proteína RdRp se analizaron las interacciones con los aminoácidos Asp 760-761, entre otros (Ahmad et al., 2020). Una vez seleccionados estos metabolitos, se llevó a cabo el cálculo de las propiedades ADME con el fin de conocer el perfil citotóxico de estos, junto con el análisis de MMG-GBSA.

### ***3.2.3 Análisis de MM-GBSA***

La energía libre de enlace se calculó empleando el método MM/GBSA con el fin de predecir en términos energéticos la viabilidad de los metabolitos elegidos en los resultados de las simulaciones de acoplamiento. Para este cálculo, se empleó la herramienta Prime de Maestro 2021-1 (Hayes & Archontis, 2012), la cual recoge un total de las energías presentes de receptores libres, complejos proteína ligando y residuos aminoacídicos que interactúen constantemente con la proteína para finalmente calcular su energía por medio de un campo de fuerza OPLS4 y un modelo de solvatación VSGB (Lu et al., 2021). Igualmente, se tuvo en cuenta la flexibilidad de la proteína a una distancia de 5 Å de los ligandos hacia la proteína (J. Li et al., 2011).

### ***3.2.4 Simulaciones de dinámica molecular***

Teniendo en cuenta los resultados de acoplamiento molecular, energía libre de unión, la absorción oral del ligando y en células gastrointestinales, además de su peso molecular, aceptores y donadores de H, y valor de coeficiente de partición octanol-agua (logP), se eligió el mejor metabolito de la proteasa principal para realizar tres réplicas de simulación de dinámica molecular con trayectorias aleatorias, con el fin de validar la estabilidad del ligando dentro del sitio de unión y sus interacciones propuestas por el acoplamiento molecular. Esta etapa se realizó empleando el módulo Desmond de Maestro 2021-1 (Bharadwaj et al., 2020), donde inicialmente se construyó el sistema proteína-ligando, haciendo uso de la herramienta Desmond System Builder, eligiendo un

campo de fuerza OPLS4 y una caja cúbica con una distancia de 2 Å desde los bordes hasta cualquier átomo del sistema. Seguidamente se adicionaron las moléculas de agua TIP3P para minimizar el sistema y neutralizarlo mediante la adición de tres contraiones de sodio, de acuerdo a la carga del sistema y condiciones de PBC.

Una vez el sistema fue creado, se realizó el proceso de equilibrio empleando un ensamblaje tipo NPT (ensamblaje isotérmico-isobárico) (Uline & Corti, 2005) e implementación del termostato Berendsen (Lin et al., 2017). Para el proceso de minimización, se fijó la temperatura del sistema en 310 K y la presión a 1.01325 bar, teniendo en cuenta los algoritmos para el termostato de cadena Nose-Hoover (Evans & Holian, 1998) y para el barómetro Martyna-Tobias-Klein (Rogge et al., 2015), respectivamente. Finalmente, utilizando la herramienta *Molecular Dynamics* de Desmond, se simularon 200 ns por triplicado, donde cada una de las simulaciones eran independientes y con semillas (seeds) generadas aleatoriamente entre sí, y con un intervalo de video de 250 ps para la obtención de 800 frames.

Las interacciones y los cambios conformacionales de la proteína durante la simulación se analizaron utilizando Simulation Interaction Diagram (SID) para obtener los datos crudos de los Root Mean Square Deviation (RMSD) y los contactos proteína-ligando para comprobar la estabilidad del ligando.

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1 Mejores metabolitos según su potencial inhibitorio**

El acoplamiento molecular en modo XP sugirió 20 metabolitos (anexo A), los cuales pasaron por un proceso de selección donde se tenían en cuenta los valores de acoplamiento molecular, energía libre de unión y violaciones a las reglas de Lipinski para posteriormente elegir

los 10 candidatos más viables como posibles inhibidores de las proteínas diana. Las reglas de Lipinski dicen que para considerar a una molécula como agente terapéutico debe cumplir unos parámetros fisicoquímicos (peso molecular, lipofilicidad, donores y aceptores de enlaces de hidrógeno) es decir, una molécula debe tener una masa molecular inferior a 500 uma, no más de 5 donantes de enlaces de hidrógeno, no más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno y un coeficiente de partición octanol-agua (log P) no superior a 5 (Goodwin et al., 2017; G. Li et al., 2019; Neidle, 2012). Además de analizar esos parámetros, también se tuvieron en cuenta los valores de absorción oral y en células *Caco-2*, debido a que puede ayudar a predecir la absorción *in vivo* de un fármaco (Castillo et al., 2006).

De esta forma, los metabolitos que podrían inhibir la actividad de la proteasa principal Mpro se muestran en la **Tabla 1**, junto con su puntaje de acoplamiento y energía libre, peso molecular, aceptores y donadores de H<sup>+</sup>, log P, absorción oral y en células *Caco-2*; estos parámetros se tuvieron en cuenta para seleccionar aquellos metabolitos que se puedan considerar como agente terapéutico.

**Tabla 1**

*Puntuaciones de acoplamiento y cálculo de energía libre de unión de los 10 metabolitos mejor clasificados contra la proteasa principal del SARS-CoV-2 (Mpro) junto con sus propiedades ADME.*

ID	Metabolito	Puntaje de acoplamiento	$\Delta G$ (kcal/mol)	Mol W	Donador de H <sup>+</sup>	Aceptor de H <sup>+</sup>	LogP	Caco-2	% absorción oral
5281775	Gingerenona A	-8,335	-52,07	356,418	2	5	3,835	393,706	95,846
5281661	Swertianina	-8,185	-40,49	274,229	3	6	1,829	247,556	80,147
119269	Kievitona	-7,804	-43,91	356,374	4	6	2,593	118,629	77,333

119458	Cleistantina B	-7,731	-92,55	542,495	4	12	0,452	122,433	41,046
3108	Dipiridamol	-7,67	-68,47	354,313	6	9	-0,2	119,314	19,247
399491	Artocarpesina	-7,392	-43,74	354,359	4	6	2,741	114,855	79,751
5280507	Alcohol Sinapílico	-7,34	-41,37	210,229	2	4	1,384	1050,261	89,123
185848	Moracín M	-7,083	-40,61	242,231	3	4	1,709	278,537	80,68
160521	Isolariciresinol	-7,04	-47,01	360,406	4	6	2,024	164,263	78,453
20489	Pediflavona	-7,011	-50,31	284,268	2	5	2,571	479,952	89,988

Como se muestra en la **Tabla 1** se sugieren como posibles inhibidores a la gingerenona A (puntaje de acoplamiento -8,335;  $\Delta G$  -52,07 kcal/mol) y el alcohol sinapílico (-7,34; -41,37 kcal/mol), los cuales son compuestos anticancerígenos, antioxidantes e inductores de apoptosis (Sakagami et al., 2005; Yu et al., 2022); estos metabolitos no presentan violaciones a las reglas de Lipinski y a su vez muestran buenos valores de absorción. Asimismo, es sugerida la cleistantina B (-7,731; -92,55 kcal/mol), un metabolito con propiedades anticancerígenas y antihipertensivas (Pradheep Kumar et al., 1998; Raveendran et al., 2014).

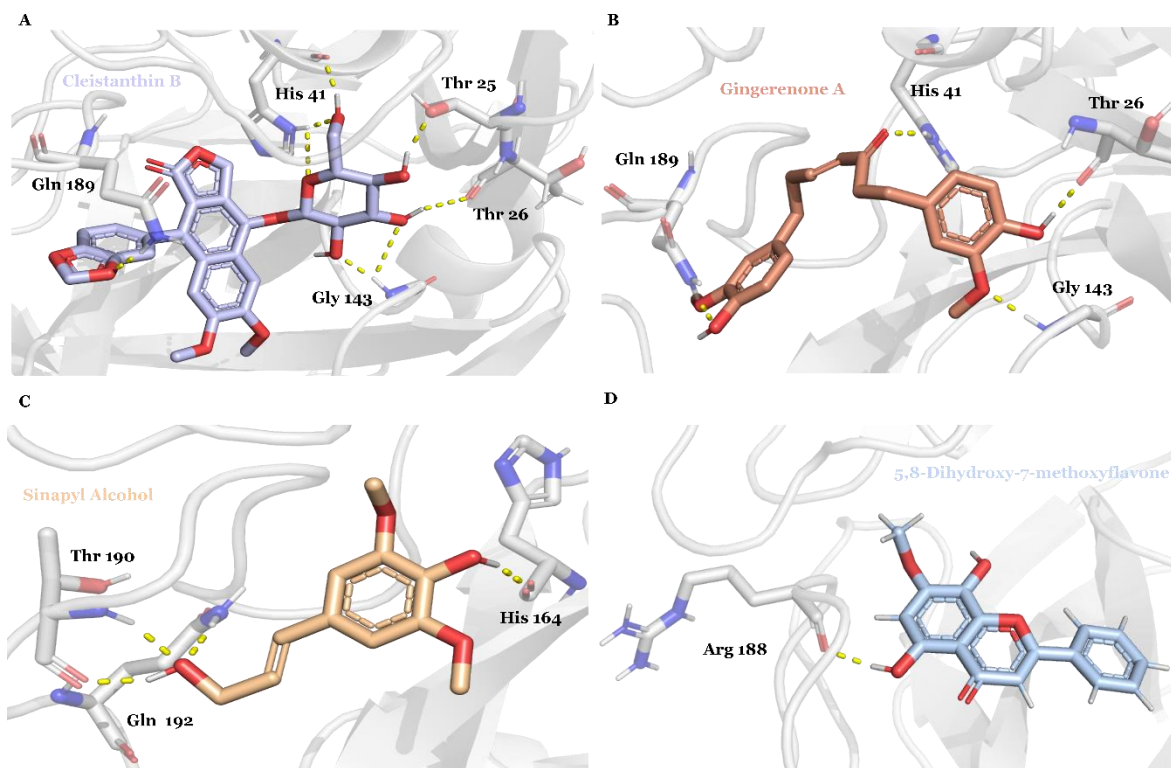
Aparte de los metabolitos mencionados anteriormente, antioxidantes como pediflavona (-7,011; -50,31 kcal/mol), swertianina (-8,185; -40,49 kcal/mol) e isolariciresinol (-7,04; -47,01 kcal/mol) (Kshirsagar et al., 2019; World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific., 2009; Xiao et al., 2014) y antiinflamatorios como la artocarpesina (-7,392; -43,74 kcal/mol) y moracín M (-7,083; -40,61 kcal/mol) (Lee et al., 2020; Víctor Manuel, 2012) también se prevén como inhibidores de la proteasa principal (**Tabla 1**).

Dada la información mencionada anteriormente, se analizaron las interacciones con residuos aminoacídicos mediante inspección visual para los metabolitos que mostraban resultados más prometedores; encontrando que la cleistantina B presenta puentes de hidrógeno entre su hidroximetilo y la His 41, el cual hace parte de la diada catalítica; además de puentes de hidrógeno entre Thr 25, Thr 26, Gly 143 con los alcoholes del hidroximetiloxano y entre uno de los oxígeno

del benzodioxol con Gln 189, residuos relevantes en el sitio activo de la proteína (**Figura 4A**) (Citarella et al., 2021), los resultados de acoplamiento sugieren a este metabolito como un buen candidato inhibidor debido a su interacción mediada por puente de hidrógeno con Gln 189, residuo que une los dominios II y III de la proteína y es fundamental en su actividad enzimática (Jin et al., 2020).

Por otro lado, la gingerenona A y el alcohol sinapílico también se sugieren como potenciales inhibidores de Mpro. Los resultados de acoplamiento molecular sugieren que la gingerenona A se ubica en el bolsillo S1' y S2 presentando interacciones hidrofílicas entre los OH de sus fenilos y Thr 26, Gln 189; además de puente de hidrógeno entre His 41 y el oxígeno de la heptanona, y entre el metoxi del fenilo con Gly 143 (**Figura 4B**). Mientras que para el alcohol sinapílico se sugiere una ubicación en el bolsillo S4 e interacciona con el alcohol del propenol por medio de puentes de hidrógeno con Thr 190, Gln 192, así como entre el alcohol del dimetoxifenol con la His 194 (**Figura 4C**). Finalmente, los resultados de acoplamiento también sugieren que la pediflavona podría ubicarse en el bolsillo S4 y formar puentes de hidrógeno entre la Arg 188 con uno de los alcoholes del anillo del benzopirano (**Figura 4D**).

**Figura 4** *Visualización 3D de las interacciones entre los metabolitos seleccionados y la proteína Mpro.*

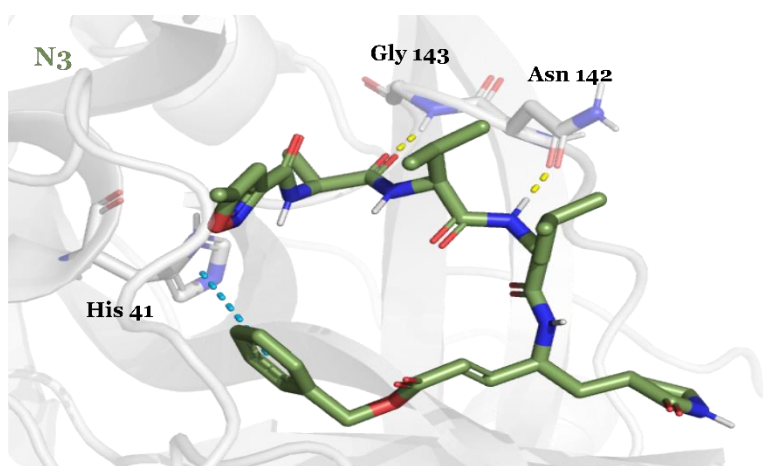


*Nota.* (A) cleistanthina B (lila), (B) gingerenona A (naranja), (C) alcohol sinapílico (crema), (D) pediflavona (celeste). Los carbonos de la proteasa principal se encuentran de color blanco. Las interacciones de tipo puentes de hidrógeno están representadas por líneas discontinuas de color amarillo. Los residuos de la proteína están coloreados según el tipo de átomo de los aminoácidos que interactúan (oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco).

Teniendo en cuenta la información detallada anteriormente, en la cual se analizaron los parámetros importantes para definir a una molécula como agente terapéutico, su perfil biológico y las múltiples interacciones con residuos claves del sitio activo de la proteasa principal, se eligió a la cleistanthina B para continuar con el análisis de la estabilidad del complejo mediante simulaciones de dinámica molecular analizando el acoplamiento formado entre el metabolito y la Mpro en el sitio de unión establecido anteriormente.

Adicionalmente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular con el aceptor de Michael (conocido como N3), inhibidor reportado de Mpro informado por Jin et al., 2020. Los estudios arrojan que este inhibidor se ubicó dentro del sitio activo de la Mpro con un puntaje de acoplamiento de -6,958, una energía de -61.26 kcal/mol e interactuando mediante puentes de hidrógeno con Asn 142 y Gly 143, además de una interacción  $\pi$ - $\pi$  con His 41 (**Figura 5**).

**Figura 5** Visualización 3D de las interacciones entre el inhibidor N3 y la proteína Mpro



*Nota.* Los residuos de la proteína están coloreados según el tipo de átomo de los aminoácidos que interactúan (carbono, blanco; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco). Inhibidor N3 (verde). Las interacciones están representadas por líneas discontinuas, las interacciones de tipo puentes de hidrógeno están coloreadas en amarillo y las interacciones  $\pi$ - $\pi$  en azul.

Por otro lado, la segunda proteína diana, el complejo RdRp desempeña un rol importante en la replicación del genoma del virus y la transcripción de sus genes (Hillen et al., 2020). Los resultados del análisis arrojan varios metabolitos que pudieran ser relevantes para una unión eficaz (anexo B). Dentro de los metabolitos con mejor puntaje de acoplamiento (**Tabla 2**) se encuentran dos antioxidantes, el ácido salvianólico B (puntaje de acoplamiento -15,868;  $\Delta G$  -4,16 kcal/mol) y la soyaaponina I (-14,089; -17,11 kcal/mol), sugiriéndose como posibles inhibidores de la

enzima RdRp (Guang et al., 2014; Murata et al., 2022). Asimismo, se sugieren a la indometacina (-10,974; -10,48 kcal/mol) y el ácido 2-bromo-4,5-dimetoxicinámico (-9,402; -5,14 kcal/mol), los cuales poseen actividad antiinflamatoria (Jabali & Abu Ali, 2016).

**Tabla 2**

*Puntuaciones de acoplamiento y cálculo de energía libre de unión de los 10 metabolitos mejor clasificados contra la RdRp del SARS-CoV-2 junto con sus propiedades ADME*

ID	Metabolito	Puntaje de acoplamiento	$\Delta G$ (kcal/mol)	Mol W	Donador de H <sup>+</sup>	Aceptor de H <sup>+</sup>	LogP	Caco-2	% absorción oral
6451084	Ácido salvianólico B	-15,868	-4,16	718,623	9	14	1,671	0,006	0
122097	Soyasaponina I	-14,089	-17,11	943,133	11	18	-0,04	0,232	0
3715	Indometacina	-10,974	-10,48	357,793	1	4	4,267	160,491	91,405
84128275	Ácido alfa-metoxi-1H-indol-3-propanoico	-10,173	11,11	219,24	2	3	2,185	187,366	80,418
735828	Ácido 2-bromo-4,5-dimetoxicinámico	-9,402	-5,14	287,109	1	4	2,686	204,668	84,035
83697	Ácido L-leucico	-9,338	13,05	132,159	2	3	0,5	112,227	66,563
6398856	Ácido (R)-4-metoxi-2-metil-4-oxobutanoico	-9,28	-2,59	146,143	1	4	0,743	116,915	68,304
442739	Droserona	-9,204	21,53	204,182	2	4	0,516	241,356	72,383
10494	Ácido oleanólico	-8,374	10,62	504,619	5	10	2,634	303,486	71,538
8468	Ácido vanílico	-8,046	8,39	158,149	2	4	1,046	76,628	66,795

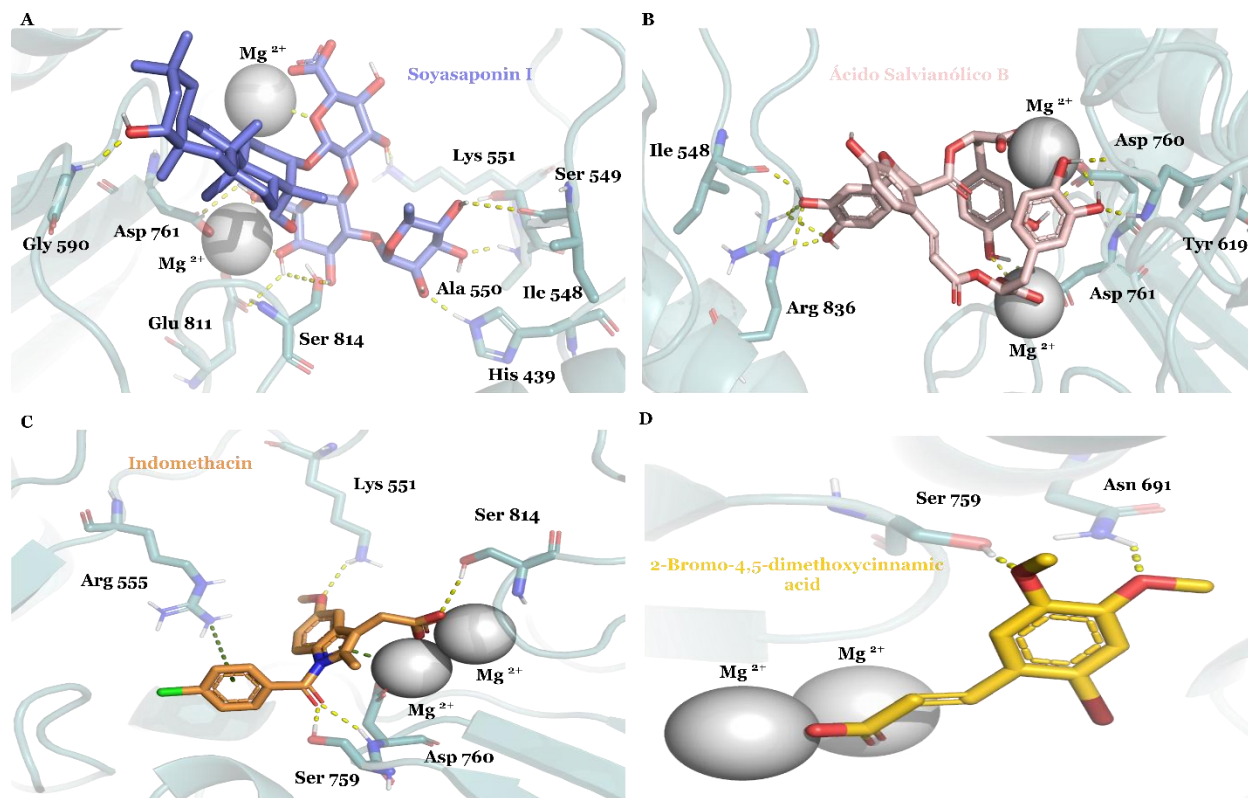
De igual manera, se encontró que agentes antimicrobianos como el ácido alfa-metoxi-1H-indol-3-propanoico (-10.173; 11.11 kcal/mol), ácido oleanólico (-8.374; 10.62 kcal/mol) y vanílico (-8.046; 8.39 kcal/mol) (Ayeleso et al., 2017; Deshaies et al., 2022; Świsłocka et al., 2013); antimaláricos como la droserona (-9.204; 21.53 kcal/mol) (Martínez & Benito, 2005), y anticatabólicos como el ácido L-leucico (-9.338; 13.05 kcal/mol) (Mero et al., 2019) son posibles inhibidores del complejo RdRp (**Tabla 2**).

Dada la información mencionada anteriormente, se analizó la pose sugerida para cada metabolito mediante inspección visual las interacciones con residuos aminoacídicos y los perfiles biológicos de estos. En la **tabla 2** se evidencia que el ácido salvianólico B y la soyasaponina I poseen buena afinidad de acoplamiento y energía libre de enlace, pero no cumplían con los parámetros de Lipinski, tampoco presentaban absorción oral humana y en células *Caco-2*, razón por la cual se descartaron como posibles inhibidores de la enzima, a pesar de formar interacciones del tipo puente de hidrógeno con los -OH del  $\beta$ -D-galactopiranosil de la soyasaponina I con residuos como Asp 761 y Ser 814, entre otros, y puentes salinos entre estos mismos y los iones de  $Mg^{2+}$  (**Figura 6A**); mientras que el ácido salvianólico B presenta interacciones del tipo puente de hidrógeno entre los alcoholes de los hidroxifenilos con residuos como Asp 760, Asp 761, Ser814, entre otros y puentes salinos con los iones Mg 1004, Mg 1005 (**Figura 6B**), los cuales son residuos claves en el sitio activo de la RdRp (Ahmad et al., 2020).

Igualmente, los resultados de acoplamiento sugieren a la indometacina como posible inhibidor presentando valores aptos dentro de los parámetros de Lipinski junto con altas absorciones orales y en células *Caco-2* (**Tabla 2**). Este metabolito se ubicó en un bolsillo compuesto por residuos Lys 551-Arg 555 y Leu 758-Asp 761, lo que genera interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Lys 551 y el metoxi del metil indol, mientras que Ser 759 y Asp 760 forman esta interacción con el oxígeno del clorobenzoil; por su parte Ser 814 forma puente de hidrógeno con el carboxilo, además de presentar interacciones  $\pi$ -catión entre Arg 555 y el clorobenzoil, y el ion  $Mg^{2+}$  con el metil indol; y puentes salinos con los dos átomos de magnesio presentes en la estructura cristalina (**Figura 6C**). Finalmente, también es sugerido el ácido 2-bromo-4,5-dimetoxicinámico, el cual se ubica en un bolsillo formado por los residuos Ser 682-Asn 691 y Ser 759-Asp 761, generando interacciones de puente de hidrógeno entre Ser 759 y Asp

691 con los oxígenos de los grupos metoxilo, y puentes salinos entre los iones de magnesio y el OH del ácido cinámico (**Figura 6D**).

**Figura 6** Visualización 3D de las interacciones entre los metabolitos seleccionados y la RdRp.

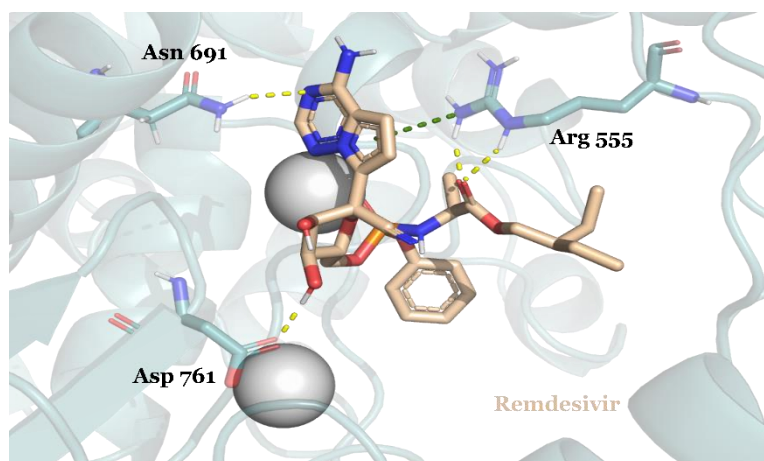


*Nota.* Los carbonos de la enzima RdRp se encuentran representados en color turquesa claro junto con sus átomos de Mg en color blanco. (A) soyasaponina I (morado), (B) ácido salvianólico B (rosado), (C) indometacina (mostaza), (D) ácido 2-bromo-4,5-dimetoxicinámico (amarillo). Las interacciones están representadas por líneas discontinuas, las interacciones de tipo puentes de hidrógeno están coloreadas en amarillo, y las interacciones  $\pi$ -catión en verde. Los residuos están coloreados según el tipo de átomo de los aminoácidos que interactúan (oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco; cloro, verde).

Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados obtenidos sugieren que la indometacina puede inhibir la RdRp del SARS-CoV-2 mediado por sus interacciones con residuos relevantes del sitio activo de la enzima y su posición dentro de esta. Cabe destacar, que después de realizar el análisis de las interacciones de los complejos RdRp-ligando mediante inspección visual y sus perfiles biológicos se evidenció que varios de estos no presentan un valor de energía de afinidad favorable, dado que el sitio de unión de la proteína es rico en aspartatos, un residuo amoniocídico que posee un grupo carboxilo adicional, es decir que puede liberar un protón y cargarse negativamente (Blanco & Blanco, 2022), el cual al interactuar con zonas de los metabolitos que tiendan a perder ese protón y generar así cargas negativas, va a provocar repulsión entre ellos, evidenciándose en una energía de afinidad positiva no favorable (Ryde & Söderhjelm, 2016), razón por la cual se decidió no estudiar la estabilidad de estos complejos y sólo realizar los estudios mediante simulaciones de dinámica molecular con el metabolito seleccionado para la proteasa Mpro.

Adicionalmente se realizaron estudios frente al fármaco antiviral remdesivir, uno de los principales inhibidores de RdRp, con el fin de validar el sitio de unión establecido, obteniendo un puntaje de acoplamiento de -3,997;  $\Delta G$  de 9,40 kcal/mol. El fármaco se ubicó en un bolsillo formado por los residuos Ile 548-Arg555 y Ser 759-Asp 761, formando interacciones del tipo puente de hidrógeno entre el OH del dihidroxi oxolan y el Asp 761 (Koulgi et al., 2020), al igual que entre el oxígeno del etilbutilo y Arg 555 (Vesga et al., 2022), además de una interacción  $\pi$ -cación con este residuo aminoácido (Jang et al., 2021) (**Figura 7**).

**Figura 7** *Visualización 3D de las interacciones entre el inhibidor Remdesivir y la RdRp*



*Nota.* La enzima RdRp se encuentra representada en color turquesa claro junto con sus átomos de Mg en color blanco. Los residuos de la proteína están coloreados según el tipo de átomo de los aminoácidos que interactúan (carbono, turquesa; oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; hidrógeno, blanco; fósforo, naranja). Inhibidor Remdesivir (crema). Las interacciones están representadas por líneas discontinuas, las interacciones de tipo puentes de hidrógeno están coloreadas en amarillo y las interacciones  $\pi$ - $\pi$  en verde.

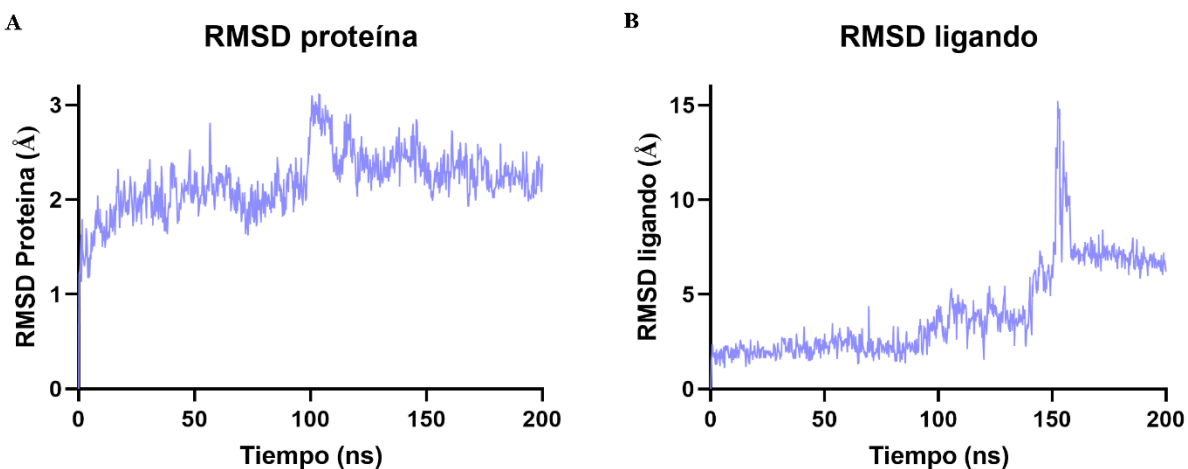
#### 4.2 Estabilidad del complejo mediante dinámica molecular

Tal como se expuso anteriormente, la cleistantina B fue seleccionado como posible inhibidor de la proteasa principal según los resultados obtenidos en las simulaciones de acoplamiento. El siguiente paso consistió en evaluar el comportamiento del complejo proteína-ligando; de modo que, se simularon 200 ns en tres réplicas independientes para estudiar su estabilidad dentro del sitio de unión propuesto por el Docking a través del estudio de la desviación cuadrática media (RMSD- root mean square deviation). El RMSD es la medida de la similitud entre dos coordenadas atómicas superpuestas (Kufareva & Abagyan, 2011), y este valor nos indica cuanto cambia la estructura de la proteína y el ligando en el transcurso de una simulación en

relación con la estructura inicial, donde inicialmente se produce un aumento progresivo del RMSD de la proteína partiendo de 0, hasta llegar a un nivel de equilibrio que se encuentra en torno a los 3 Å (Verli, 2014).

En el estudio realizado y para facilitar el entendimiento de los resultados, se presentarán los datos obtenidos en la réplica 1, mientras que el duplicado y triplicado respectivo se podrán observar en el anexo C y D. A lo largo de la simulación de dinámica molecular, se observa que el RMSD de la proteasa principal presenta pequeñas fluctuaciones entre 1-3 Å hasta los 100 ns y posteriormente se estabiliza hasta el fin de la trayectoria por encima de los 2Å, lo que puede deducirse en que a pesar de que el RMSD fluctúa debido a variaciones en la posición de los C- $\alpha$  de la proteína, no presenta cambios en su estructura secundaria validando de esta manera el protocolo de acoplamiento (**Figura 8A**). Estos valores estables pueden deberse a la calidad de la estructura cristalina, las cuales idealmente tienen valores RMSD más bajos (Kurniawan & Ishida, 2022; Verli, 2014). Cabe mencionar, que valores elevados de RMSD (por encima de 3Å) pueden deberse a la desnaturalización de una hélice  $\alpha$  o su reorientación permaneciendo aún enrollada (Verli, 2014).

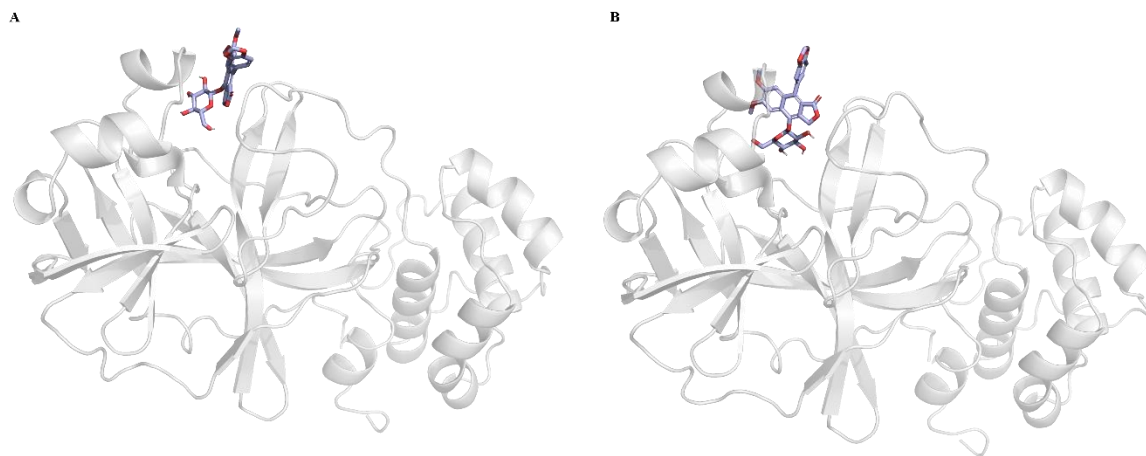
**Figura 8** Valores de RMSD para el complejo *Mpro-cleistanina B*



*Nota.* A) Imagen representativa de los valores de desviación cuadrática media (RMSD) para el complejo proteína-cleistanina B. B) Variación del RMSD del ligando a lo largo del tiempo de simulación para Cleistanina B.

Por otra parte, se estudió el RMSD del ligando, el cual indica la estabilidad del mismo con respecto a la proteína y a su bolsillo de unión (Guterres & Im, 2020). Como se observa en la **Figura 8B**, durante la simulación el ligando se encuentra estable durante la mayor parte de la trayectoria, pero presenta una notoria variación a la altura de 151-159 ns a causa de un cambio conformacional en la cleistanina B, pero sin alejarse del sitio de unión y manteniéndose estable durante el tiempo restante de trayectoria (**Figura 9**).

**Figura 9** Cambios posicionales de la cleistanina B durante la réplica 1



*Nota.* Cleistanina B coloreado de lila. A) Posición del ligando a los 151 ns de simulación. B) Posición del ligando a los 159 ns de la simulación.

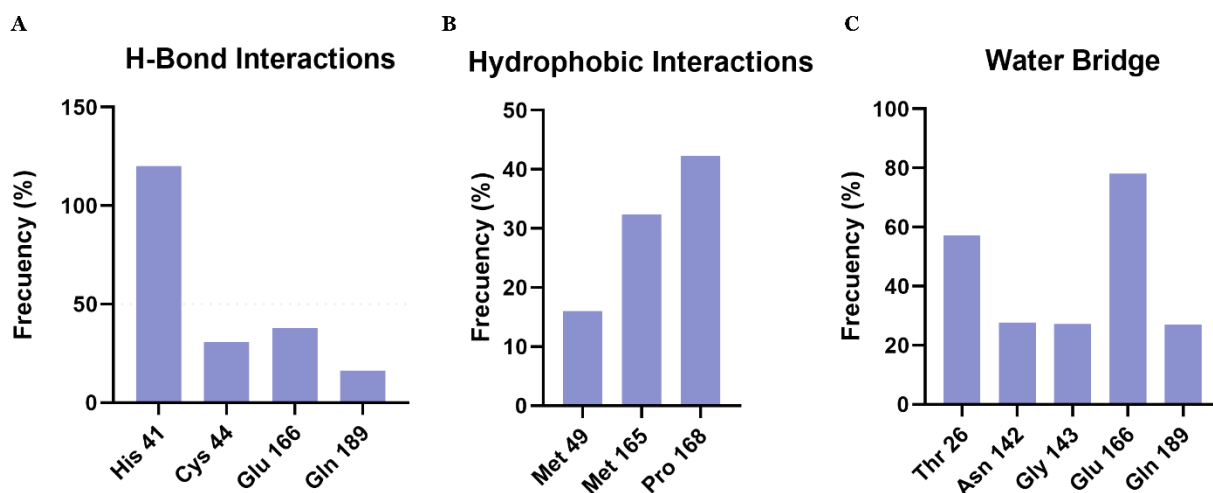
### 4.3 Análisis de interacciones proteína-ligando

Las interacciones no covalentes, son elementos clave en la formación de un complejo proteína-ligando. Estas interacciones pueden ser monitoreadas a lo largo de la simulación mediante el reporte SID (diagrama de interacciones de la simulación), con el fin de conocer más acerca de la estabilidad del complejo en el sitio de unión propuesto. Estas interacciones se clasifican en cuatro tipos: puentes de hidrógeno, hidrofóbicas, iónicas y puentes de agua (Kishk et al., 2020).

Durante las simulaciones se puede observar que la cleistantina B se mantiene dentro del bolsillo de unión al tener interacciones de puente de hidrógeno con residuos del sitio activo como His 41 durante el 120% del tiempo de simulación, esto se debe a la formación de más de un contacto específico con el ligando (Choudhary et al., 2020). Igualmente presenta puente de hidrógeno con Cys 44 (30% de la simulación), Glu 166 (casi el 40% de la simulación) y Gln 189 (16% de la simulación) a lo largo de los 200 ns (**Figura 10A**). Dentro de los residuos mencionados anteriormente, la Cys 44, es una cisteína conservada, la cual Verma et al. (2020b) reporta como hiperreactiva según la valoración de CpHMD (*Constant pH Molecular Dynamics*- dinámica molecular de pH constante), dado que es significativamente más nucleófilo que la Cys 145, ya que se desprotona fácilmente a pH fisiológico. Esta hiperreactividad y su proximidad al bolsillo de unión al sustrato es lo que permite que se formen enlaces covalentes. Al igual que la cleistantina B, se ha logrado identificar que el flavonoide antitumoral; galangina, se une a la Mpro mediante este residuo aminoacídico (Verma et al., 2020b). Además de la Cys 44, el Glu 166 desempeña un papel importante en la inactivación de la enzima, además de acercar el sitio activo a la interfaz del dímero promoviendo el acceso necesario al subsitio S1 para la unión del ligando. Por lo que las interacciones con estos residuos aminoácidos podrían sugerir a la cleistantina B como posible inhibidor de la Mpro. Cabe resaltar que estudios realizados por Patel et al. (2022), presenta

resultados de interacción entre el inhibidor N3 y Glu 166 (Cheng et al., 2010; Patel et al., 2022); al igual que Gln 189, el cual es un residuo que se encuentra involucrado en la afinidad del sustrato y presenta interacciones mediante puente de hidrógeno con el inhibidor N3 (Patel et al., 2021; Vesga et al., 2022).

**Figura 10** Interacciones del complejo Mpro-cleistantina B a lo largo de la simulación



*Nota.* A) Frecuencia de interacciones de tipo puente de hidrógeno. B) interacciones hidrofóbicas. C) interacciones de puentes de hidrógeno mediadas por agua

Además de interacciones de tipo puente de hidrógeno, la cleistantina B presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos Met 49 durante el 16% de la simulación, Met 165 en el 32% y con Pro 168 durante casi el 42% de la simulación (**Figura 10B**). Las metioninas se consideran puntos calientes (hot-spots), es decir, residuos claves en la unión de fármacos a la Mpro, por lo que las interacciones con estos residuos contribuyen al descubrimiento de posibles inhibidores de la proteasa (Luo et al., 2021).

Finalmente, los puentes de agua (puentes de hidrógeno mediados por agua), son redes de moléculas de agua que unen a los aceptores o donores de puentes de hidrógeno cercanos en las

proteínas proporcionando estabilidad y elasticidad para mejorar la expresión de las funciones de esta (P. B. Law & Daggett, 2010; Sabarinathan et al., 2011). Observando la **figura 10C**, estas interacciones están presentes con residuos como Glu 166 (78% de frecuencia), Gln 189 (27% de la simulación), Thr 26 (57%) cuya interacción facilita la formación del complejo proteína-ligando, además, estudios previos reportan interacción en el 100% de las simulaciones de DM entre esta treonina y el genudín, un triterpenoide utilizado en la medicina homeopática (Garg et al., 2020; Zhao et al., 2012). Por su parte, el residuo Gly 143 (28% de frecuencia), es un residuo aminoacídico que hace parte del agujero de oxianión, encontrándose directamente relacionado con la actividad enzimática y la unión al sustrato. Asimismo, Yu et al. (2021) reporta a este residuo como un elemento clave entre la interacción e inhibición del péptido EM y la proteasa principal (Antonopoulou et al., 2022; Yu et al., 2021).

Por último, la cleistantina B forma interacción con Asn 142 (27% de la simulación), residuo perteneciente al subsitio S1 del sitio activo y que según estudios realizados por Ouassaf et al. (2021) presenta interacciones con la 2,5-diaminobenzofenona, agente antimalárico sugerido para inhibir el SARS-CoV-2 (Jin et al., 2020; Ouassaf et al., 2021).

Por consiguiente, se observa una ventaja al emplear el diseño de fármacos asistido por computador como una herramienta efectiva para la selección de compuestos específicos al buscar tratamientos que combatan enfermedades, reduciendo de esta manera tiempo y costos en su desarrollo.

## 5. Conclusiones

Mediante cribado virtual se logró identificar a la cleistantina B y la indometacina como posibles inhibidores de la proteasa principal y la RdRp del SARS-CoV-2, respectivamente, proponiendo un modo de acoplamiento entre estos metabolitos y las proteínas diana.

Las simulaciones de dinámica molecular, sugieren a la cleistantina B como posible inhibidor de la proteasa principal del SARS-CoV-2, Mpro, dada su estabilidad en el sitio de unión y al presentar interacciones de tipo puente de hidrógeno con residuos clave como His 41, Thr 26, Glu 166, Gln 189, entre otros residuos importantes.

## 6. Recomendaciones

Es recomendable realizar más ensayos como pruebas *In vitro* de la actividad de la cleistantina B y la indometacina sobre la Mpro y RdRp, respectivamente para así comprobar la inhibición del ciclo viral del SARS-CoV-2. Igualmente, es recomendable realizar simulaciones de dinámica molecular con trayectorias superiores a los 200 ns para tener una información más clara sobre la estabilidad del complejo proteína-ligando y sus posibles cambios conformacionales.

## Agradecimientos

Agradecimientos a Minciencias por la financiación del proyecto titulado “Fortalecimiento de capacidades instaladas de CyT en el área de Epidemiología Molecular Viroológica de la sede UIS-Guatiguará para aplicación de herramientas para atender problemáticas asociadas con patógenos de alto riesgo para la salud humana Santander”

### Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo de grado fueron presentados en modalidad de poster en el año 2021 en el I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias, Pandemias Persistentes y Emergentes (Anexo E).

Este trabajo de grado hace parte del macroproyecto de Minciencias titulado “Fortalecimiento de capacidades instaladas de CyT en el área de Epidemiología Molecular Viroológica de la sede UIS-Guatiguará para aplicación de herramientas para atender problemáticas asociadas con patógenos de alto riesgo para la salud humana Santander”, del cual se cuenta con la siguiente publicación como coautor “Vesga, L. C., Ruiz-Hernández, C. A., **Alvarez-Jacome, J. J.**, Duque, J. E., Rincon-Orozco, B., & Mendez-Sanchez, S. C. (2022). Repurposing of Four Drugs as Anti-SARS-CoV-2 Agents and Their Interactions with Protein Targets. *Scientia Pharmaceutica*, 90(2), 24. <https://doi.org/10.3390/scipharm90020024>” (Anexo F)

Finalmente, los resultados de este trabajo de grado serán sometidos a una revista indexada por Minciencias, cuyo manuscrito se encuentra actualmente en estado de revisión para posteriormente ser sometido.

### Referencias Bibliográficas

- Ahmad, J., Ikram, S., Ahmad, F., Rehman, I. U., & Mushtaq, M. (2020). SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA polymerase (RdRp) – A drug repurposing study. *Heliyon*, 6(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04502>
- Antonopoulou, I., Sapountzaki, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2022). Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1306–1344. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.009>
- Anwar, T., Kumar, P., & Khan, A. U. (2021). Modern Tools and Techniques in Computer-Aided Drug Design. *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, 1-30. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822312-3.00011-4>
- Arya, H., & Coumar, M. S. (2021). Lead identification and optimization. *The Design & Development of Novel Drugs and Vaccines*, 31-63. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821471-8.00004-0>
- Ashour, H. M., Elkhatib, W. F., Rahman, Md. M., & Elshabrawy, H. A. (2020). Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. *Pathogens*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>
- Ayeleso, T., Matumba, M., & Mukwevho, E. (2017). Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules*, 22(11), 1915. <https://doi.org/10.3390/molecules22111915>
- Baig, M. H., Ahmad, K., Rabbani, G., Danishuddin, M., & Choi, I. (2018). Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative

- Disorders. *Current Neuropharmacology*, 16(6), 740-748.  
<https://doi.org/10.2174/1570159x15666171016163510>
- Baric, R. S., & Yount, B. (2000). Subgenomic Negative-Strand RNA Function during Mouse Hepatitis Virus Infection. *Journal of Virology*, 74(9). <https://doi.org/10.1128/JVI.74.9.4039-4046.2000>
- Bharadwaj, S., Lee, K. E., Dwivedi, V. D., & Kang, S. G. (2020). Computational insights into tetracyclines as inhibitors against SARS-CoV-2 Mpro via combinatorial molecular simulation calculations. *Life Sciences*, 257, 118080.  
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118080>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2022). Proteins. *Medical Biochemistry*, 21-75.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91599-1.00004-3>
- Castillo, R., Chiriboga, C., & Fontanilla, M. R. (2006). Estandarización de un modelo basado en monocapas de células Caco-2 con aplicación en estudios de absorción de fármacos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 35, 177–191.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74182006000200003&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182006000200003&nrm=iso)
- Chafekar, A., & Fielding, B. (2018). MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/v10020093>
- Chandramouli, V., Niraj, S. K., Nair, K. G., Joseph, J., & Aruni, W. (2021). Phytomolecules Repurposed as Covid-19 Inhibitors: Opportunity and Challenges. *Current Microbiology*, 78(10), 3620-3633. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02639-x>

- Chen, B., Tian, E.-K., He, B., Tian, L., Han, R., Wang, S., Xiang, Q., Zhang, S., El Arnaout, T., & Cheng, W. (2020). Overview of lethal human coronaviruses. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0190-2>
- Cheng, S.-C., Chang, G.-G., & Chou, C.-Y. (2010). Mutation of Glu-166 Blocks the Substrate-Induced Dimerization of SARS Coronavirus Main Protease. *Biophysical Journal*, 98(7), 1327–1336. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4272>
- Choudhary, M. I., Shaikh, M., tul-Wahab, A., & ur-Rahman, A. (2020). In silico identification of potential inhibitors of key SARS-CoV-2 3CL hydrolase (Mpro) via molecular docking, MMGBSA predictive binding energy calculations, and molecular dynamics simulation. *PLOS ONE*, 15(7), e0235030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235030>
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., & Doerr, H. (2003). Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *The Lancet*, 361(9374), 2045-2046. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13615-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13615-x)
- Citarella, A., Scala, A., Piperno, A., & Micale, N. (2021). SARS-CoV-2 Mpro: A Potential Target for Peptidomimetics and Small-Molecule Inhibitors. *Biomolecules*, 11(4), 607. <https://doi.org/10.3390/biom11040607>
- De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., & Cavalli, A. (2016). Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(9), 4035-4061. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>
- Deshaies, M., Lamari, N., Ng, C. K. Y., Ward, P., & Doohan, F. M. (2022). The impact of chitosan on the early metabolomic response of wheat to infection by *Fusarium graminearum*. *BMC Plant Biology*, 22(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03451-w>

- Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71>
- Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V., & Mee, R. P. (1997). Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 11(5), 425-445. <https://doi.org/10.1023/a:1007996124545>
- Evans, D. J., & Holian, B. L. (1998). The Nose–Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 83(8), 4069. <https://doi.org/10.1063/1.449071>
- Fakhar, Z., Khan, S., AlOmar, S. Y., Alkhuriji, A., & Ahmad, A. (2021). ABBV-744 as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease enzyme against COVID-19. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79918-3>
- Fiore, C., Eisenhut, M., Krausse, R., Ragazzi, E., Pellati, D., Armanini, D., & Bielenberg, J. (2008). Antiviral effects of Glycyrrhiza species. *Phytotherapy Research*, 22(2), 141-148. <https://doi.org/10.1002/ptr.2295>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1739-1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(21), 6177-6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>

- Gajjar, N. D., Dhameliya, T. M., & Shah, G. B. (2021). In search of RdRp and Mpro inhibitors against SARS CoV-2: Molecular docking, molecular dynamic simulations and ADMET analysis. *Journal of Molecular Structure*, 1239. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130488>
- Garg, S., Anand, A., Lamba, Y., & Roy, A. (2020). Molecular docking analysis of selected phytochemicals against SARS-CoV-2 Mpro receptor. *Vegetos*, 33(4), 766-781. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00162-1>
- Ghosh, K., Amin, S. A., Gayen, S., & Jha, T. (2021). Chemical-informatics approach to COVID-19 drug discovery: Exploration of important fragments and data mining based prediction of some hits from natural origins as main protease (Mpro) inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1224, 129026. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129026>
- Gomaa, A. A., & Abdel-Wadood, Y. A. (2021). The potential of glycyrrhizin and licorice extract in combating COVID-19 and associated conditions. *Phytomedicine Plus*, 1(3), 100043. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100043>
- Goodwin, R. J. A., Bunch, J., & McGinnity, D. F. (2017). *Mass Spectrometry Imaging in Oncology Drug Discovery* (pp. 133–171). <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2016.11.005>
- Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Woolner, E., Perry, J. K., Feng, J. Y., Porter, D. P., & Götte, M. (2020). Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *Journal of Biological Chemistry*, 295(20), 6785-6797. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.013679>

- Guang, C., Chen, J., Sang, S., & Cheng, S. (2014). Biological Functionality of Soyasaponins and Soyasapogenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 8247–8255. <https://doi.org/10.1021/jf503047a>
- Gurung, A. B., Ali, M. A., Lee, J., Farah, M. A., & Al-Anazi, K. M. (2020). Unravelling lead antiviral phytochemicals for the inhibition of SARS-CoV-2 Mpro enzyme through in silico approach. *Life Sciences*, 255, 117831. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117831>
- Guterres, H., & Im, W. (2020). Improving Protein-Ligand Docking Results with High-Throughput Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(4), 2189–2198. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00057>
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>
- Hayes, J. M., & Archontis, G. (2012). MM-GB(PB)SA Calculations of Protein-Ligand Binding Free Energies. *Molecular Dynamics - Studies of Synthetic and Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.5772/37107>
- Hillen, H. S., Kokic, G., Farnung, L., Dienemann, C., Tegunov, D., & Cramer, P. (2020). Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature*, 584(7819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>
- Hoefer, G., Baltina, L., Michaelis, M., Kondratenko, R., Baltina, L., Tolstikov, G. A., Doerr, H. W., & Cinatl, J. (2005). Antiviral Activity of Glycyrrhizic Acid Derivatives against SARS–Coronavirus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(4), 1256–1259. <https://doi.org/10.1021/jm0493008>

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, S. Y., & Zou, X. (2010). Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(8), 3016-3034. <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145-1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>
- Jabali, B., & Abu Ali, H. (2016). New zinc(II) complexes of the Non-steroidal Anti-Inflammatory Drug (indomethacin) and various nitrogen donor ligands. Synthesis, characterization and biological activity. *Polyhedron*, 117, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.06.003>
- Jang, W. D., Jeon, S., Kim, S., & Lee, S. Y. (2021). Drugs repurposed for COVID-19 by virtual screening of 6,218 drugs and cell-based assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.2024302118>
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., Zhang, B., Li, X., Zhang, L., Peng, C., Duan, Y., Yu, J., Wang, L., Yang, K., Liu, F., Jiang, R., Yang, X., You, T., Liu, X., ... Yang, H. (2020). Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
- Kahn, J. S., & McIntosh, K. (2005). History and Recent Advances in Coronavirus Discovery. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 24(11). <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000188166.17324.60>
- Khan, F. I., Kang, T., Ali, H., & Lai, D. (2021). Remdesivir Strongly Binds to RNA-Dependent RNA Polymerase, Membrane Protein, and Main Protease of SARS-CoV-2: Indication

- From Molecular Modeling and Simulations. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.710778>
- Kirchdoerfer, R. N., & Ward, A. B. (2019). Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10280-3>
- Kishk, S. M., Kishk, R. M., Yassen, A. S. A., Nafie, M. S., Nemr, N. A., ElMasry, G., Al-Rejaie, S., & Simons, C. (2020). Molecular Insights into Human Transmembrane Protease Serine-2 (TMPS2) Inhibitors against SARS-CoV2: Homology Modelling, Molecular Dynamics, and Docking Studies. *Molecules*, 25(21), 5007. <https://doi.org/10.3390/molecules25215007>
- Kokic, G., Hillen, H. S., Tegunov, D., Dienemann, C., Seitz, F., Schmitzova, J., Farnung, L., Siewert, A., Höbartner, C., & Cramer, P. (2021). Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20542-0>
- Koulgi, S., Jani, V., Uppuladinne, M. V. N., Sonavane, U., & Joshi, R. (2020). Remdesivir-bound and ligand-free simulations reveal the probable mechanism of inhibiting the RNA dependent RNA polymerase of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *RSC Advances*, 10(45), 26792-26803. <https://doi.org/10.1039/d0ra04743k>
- Kshirsagar, P. R., Jagtap, U. B., Gaikwad, N. B., & Bapat, V. A. (2019). Ethanopharmacology, phytochemistry and pharmacology of medicinally potent genus *Swertia*: An update. *South African Journal of Botany*, 124, 444–483. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.030>
- Kufareva, I., & Abagyan, R. (2011). *Methods of Protein Structure Comparison* (pp. 231–257). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10)

- Kurniawan, J., & Ishida, T. (2022). Protein Model Quality Estimation Using Molecular Dynamics Simulation. *ACS Omega*, 7(28), 24274-24281.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01475>
- Lam Cabanillas, E. R., León Risco, A. O., León Risco, K. B., Llamó Hoyos, G. L., López Zavaleta, R. M., Luzuriaga Tirado, E. del R., Mendoza Blas, A. M., & Huamán Saavedra, J. J. (2021). Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, 21(2).  
<https://doi.org/10.25176/RFMH.v21i1.3327>
- Law, H. K. W., Cheung, C. Y., Ng, H. Y., Sia, S. F., Chan, Y. O., Luk, W., Nicholls, J. M., Peiris, J. S. M., & Lau, Y. L. (2005). Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood*, 106(7). <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4166>
- Law, P. B., & Daggett, V. (2010). The relationship between water bridges and the polyproline II conformation: a large-scale analysis of molecular dynamics simulations and crystal structures. *Protein Engineering, Design and Selection*, 23(1), 27–33.  
<https://doi.org/10.1093/protein/gzp069>
- Lee, J., Mandava, S., Ahn, S.-H., Bae, M.-A., So, K. S., Kwon, K. S., & Kim, H. P. (2020). Potential Moracin M Prodrugs Strongly Attenuate Airway Inflammation *In Vivo*. *Biomolecules & Therapeutics*, 28(4), 344–353. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.212>
- Liang, Y., Wang, M. L., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Yang, Y. P., Lai, W. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T., Chen, Y. J., Chang, P. C., & Chiou, S. H. (2020). Highlight of Immune Pathogenic Response and Hematopathologic Effect in SARS-CoV, MERS-CoV, and

SARS-Cov-2 Infection. *Frontiers in Immunology*, 11.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01022>

Li, G., Shao, K., & Umeshappa, C. S. (2019). Recent progress in blood-brain barrier transportation research. In *Brain Targeted Drug Delivery System* (pp. 33–51). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814001-7.00003-2>

Li, H., Cheng, C., Shi, S., Wu, Y., Gao, Y., Liu, Z., Liu, M., Li, Z., Huo, L., Pan, X., Liu, S., & Song, G. (2022). Identification, optimization, and biological evaluation of 3-O- $\beta$ -chacotriosyl ursolic acid derivatives as novel SARS-CoV-2 entry inhibitors by targeting the prefusion state of spike protein. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 238, 114426.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114426>

Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S., & Friesner, R. A. (2011). The VSGB 2.0 model: A next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 79(10), 2794-2812.

<https://doi.org/10.1002/prot.23106>

LI, S., CHEN, C., ZHANG, H., GUO, H., WANG, H., WANG, L., ZHANG, X., HUA, S., YU, J., & XIAO, P. (2005). Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Research*, 67(1), 18-23.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.007>

Lin, Y., Pan, D., Li, J., Zhang, L., & Shao, X. (2017). Application of Berendsen barostat in dissipative particle dynamics for nonequilibrium dynamic simulation. *The Journal of Chemical Physics*, 146(12), 124108. <https://doi.org/10.1063/1.4978807>

Lokhande, K. B., Doiphode, S., Vyas, R., & Swamy, K. V. (2020). Molecular docking and simulation studies on SARS-CoV-2 Mpro reveals Mitoxantrone, Leucovorin, Birinapant, and

- Dynasore as potent drugs against COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1805019>
- Lu, C., Wu, C., Ghoreishi, D., Chen, W., Wang, L., Damm, W., Ross, G. A., Dahlgren, M. K., Russell, E., Von Bargen, C. D., Abel, R., Friesner, R. A., & Harder, E. D. (2021). OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(7), 4291-4300. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00302>
- Luo, S., Huang, K., Zhao, X., Cong, Y., Zhang, J. Z. H., & Duan, L. (2021). Inhibition mechanism and hot-spot prediction of nine potential drugs for SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> by large-scale molecular dynamic simulations combined with accurate binding free energy calculations. *Nanoscale*, 13(17), 8313–8332. <https://doi.org/10.1039/D0NR07833F>
- Lvov, D. K., & Alkhovsky, S. V. (2020). Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus Sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus Merbecovirus). *Problems of Virology, Russian Journal*, 65(2), 62–70. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70>
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221-234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Martínez, M. J. A., & Benito, P. B. (2005). *Biological Activity of Quinones* (pp. 303–366). [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80036-5](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80036-5)

- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, 7(2), 146-157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Mengist, H. M., Dilnessa, T., & Jin, T. (2021). Structural Basis of Potential Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622898>
- Mero, A. A., Ojala, T., & Hulmi, J. J. (2019). Alfa-Hydroxy-Isocaproic Acid—Effects on Body Composition, Muscle Soreness, and Athletic Performance. In *Nutrition and Enhanced Sports Performance* (pp. 247–250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813922-6.00021-7>
- Mishra, A., & Rathore, A. S. (2022). RNA dependent RNA polymerase (RdRp) as a drug target for SARS-CoV2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(13), 6039–6051. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1875886>
- Mosquera-Yuqui, F., Lopez-Guerra, N., & Moncayo-Palacio, E. A. (2020). Targeting the 3CLpro and RdRp of SARS-CoV-2 with phytochemicals from medicinal plants of the Andean Region: molecular docking and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(5), 2010-2023. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1835716>
- Murata, I., Sugai, T., Murakawa, Y., Miyamoto, Y., Kobayashi, J., Inoue, Y., & Kanamoto, I. (2022). Salvianolic acid B improves the survival rate, acute kidney dysfunction, inflammation and NETosis-mediated antibacterial action in a crush syndrome rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(5), 320. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11249>

- Neidle, S. (2012). Design Principles for Quadruplex-binding Small Molecules. In *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids* (pp. 151–174). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375138-6.00009-1>
- Ouassaf, M., Belaidi, S., Mogren Al Mogren, M., Chtita, S., Ullah Khan, S., & Thet Htar, T. (2021). Combined docking methods and molecular dynamics to identify effective antiviral 2, 5-diaminobenzophenonederivatives against SARS-CoV-2. *Journal of King Saud University - Science*, 33(2), 101352. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101352>
- Patel, C. N., Jani, S. P., Jaiswal, D. G., Kumar, S. P., Mangukia, N., Parmar, R. M., Rawal, R. M., & Pandya, H. A. (2021). Identification of antiviral phytochemicals as a potential SARS-CoV-2 main protease (Mpro) inhibitor using docking and molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99165-4>
- Patel, C. N., Jani, S. P., Prasanth Kumar, S., Modi, K. M., & Kumar, Y. (2022). Computational investigation of natural compounds as potential main protease (Mpro) inhibitors for SARS-CoV-2 virus. *Computers in Biology and Medicine*, 151, 106318.  
<https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.106318>
- Pichersky, E., & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, 5(10), 439-445.  
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01741-6](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01741-6)
- Pissurlenkar, R., Shaikh, M., Iyer, R., & Coutinho, E. (2009). Molecular Mechanics Force Fields and their Applications in Drug Design. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 8(2), 128-150. <https://doi.org/10.2174/187152109787846088>

- Pradheep Kumar, C. P., Pande, G., & Shanmugam, G. (1998). Cleistanthin B causes G1 arrest and induces apoptosis in mammalian cells. *APOPTOSIS*, 3(6), 413-419.  
<https://doi.org/10.1023/a:1009658518998>
- Puttaswamy, H., Gowtham, H. G., Ojha, M. D., Yadav, A., Choudhir, G., Raguraman, V., Kongkham, B., Selvaraju, K., Shareef, S., Gehlot, P., Ahamed, F., & Chauhan, L. (2020). In silico studies evidenced the role of structurally diverse plant secondary metabolites in reducing SARS-CoV-2 pathogenesis. *Scientific Reports*, 10(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77602-0>
- Pyrc, K., Berkhout, B., & van der Hoek, L. (2007). Identification of new human coronaviruses. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(2). <https://doi.org/10.1586/14787210.5.2.245>
- Raj, R. (2021). Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 25.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100847>
- Raveendran, R., Parasuraman, S., & Priyadharsini, R. (2014). Evaluation of the antihypertensive activity and alpha adrenergic receptor interaction of cleistanthins A and B. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 5(4), 109. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.141950>
- Renson, M. (1980, 17 julio). *2-Phenyl-1,2-benzisoxazol-3(2H)-one containing pharmaceutical preparations and process for the treatment of rheumatic diseases*.  
<https://patents.google.com/patent/US4352799A/en>
- Rogge, S., Vanduyfhuys, L., Ghysels, A., Waroquier, M., Verstraelen, T., Maurin, G., & Van Speybroeck, V. (2015). A Comparison of Barostats for the Mechanical Characterization of Metal–Organic Frameworks. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(12), 5583-5597. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00748>

- Rut, W., Groborz, K., Zhang, L., Sun, X., Zmudzinski, M., Pawlik, B., Wang, X., Jochmans, D., Neyts, J., Młynarski, W., Hilgenfeld, R., & Drag, M. (2021). SARS-CoV-2 Mpro inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging. *Nature Chemical Biology*, *17*(2), 222–228. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00689-z>
- Ryde, U., & Söderhjelm, P. (2016). Ligand-Binding Affinity Estimates Supported by Quantum-Mechanical Methods. *Chemical Reviews*, *116*(9), 5520–5566. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00630>
- Sabarinathan, R., Aishwarya, K., Sarani, R., Vaishnavi, M. K., & Sekar, K. (2011). Water-mediated ionic interactions in protein structures. *Journal of Biosciences*, *36*(2), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9067-4>
- Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., & Fujisawa, S. (2005). Molecular requirements of lignin–carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*, *66*(17), 2108–2120. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.013>
- Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2020). Is There a Link Between the Pathogenic Human Coronavirus Envelope Protein and Immunopathology? A Review of the Literature. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02086>
- Sharma, P., Vijayan, V., Pant, P., Sharma, M., Vikram, N., Kaur, P., Singh, T. P., & Sharma, S. (2021). Identification of potential drug candidates to combat COVID-19: a structural study using the main protease (mpro) of SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(17), 6649–6659. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1798286>
- Siegel, D., Hui, H. C., Doerffler, E., Clarke, M. O., Chun, K., Zhang, L., Neville, S., Carra, E., Lew, W., Ross, B., Wang, Q., Wolfe, L., Jordan, R., Soloveva, V., Knox, J., Perry, J.,

- Perron, M., Stray, K. M., Barauskas, O., . . . Mackman, R. L. (2017). Discovery and Synthesis of a Phosphoramidate Prodrug of a Pyrrolo[2,1-*f*][triazin-4-amino] Adenine *C*-Nucleoside (GS-5734) for the Treatment of Ebola and Emerging Viruses. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(5), 1648-1661. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01594>
- Sofi, M. S., Hamid, A., & Bhat, S. U. (2020). SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosafety and Health*, *2*(4). <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.11.002>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, *24*(6). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Świsłocka, R., Piekut, J., & Lewandowski, W. (2013). The relationship between molecular structure and biological activity of alkali metal salts of vanillic acid: Spectroscopic, theoretical and microbiological studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *100*, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.044>
- Tahir ul Qamar, M., Alqahtani, S. M., Alamri, M. A., & Chen, L.-L. (2020). Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(4). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>
- Tomar, V., Mazumder, M., Chandra, R., Yang, J., & Sakharkar, M. K. (2019). Small Molecule Drug Design. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 741-760. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20157-x>
- Uline, M. J., & Corti, D. S. (2005). Molecular dynamics in the isothermal-isobaric ensemble: The requirement of a “shell” molecule. I. Theory and phase-space analysis. *The Journal of Chemical Physics*, *123*(16), 164101. <https://doi.org/10.1063/1.2064512>

- Verli, H. (2014). *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular* (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Ed.; 1st Edition).
- Verma, N., Henderson, J. A., & Shen, J. (2020b). Proton-Coupled Conformational Activation of SARS Coronavirus Main Proteases and Opportunity for Designing Small-Molecule Broad-Spectrum Targeted Covalent Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, *142*(52), 21883-21890. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c10770>
- Vesga, L. C., Ruiz-Hernández, C. A., Alvarez-Jacome, J. J., Duque, J. E., Rincon-Orozco, B., & Mendez-Sanchez, S. C. (2022). Repurposing of Four Drugs as Anti-SARS-CoV-2 Agents and Their Interactions with Protein Targets. *Scientia Pharmaceutica*, *90*(2), 24. <https://doi.org/10.3390/scipharm90020024>
- Víctor Manuel, N.-G. (2012). Antimicrobial activity of artocarpesin from *Artocarpus heterophyllus* Lam. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(34). <https://doi.org/10.5897/JMPR12.699>
- World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific. (2009). *Medicinal plants in Papua New Guinea : information on 126 commonly used medicinal plants in Papua New Guinea* (1st Edition). World Health Organization.
- Xiao, P., Huang, H., Chen, J., & Li, X. (2014). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Radix Isatidis* extract and bioaccessibility of six bioactive compounds after simulated gastro-intestinal digestion. *Journal of Ethnopharmacology*, *157*, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.005>
- Yin, W., Mao, C., Luan, X., Shen, D. D., Shen, Q., Su, H., Wang, X., Zhou, F., Zhao, W., Gao, M., Chang, S., Xie, Y. C., Tian, G., Jiang, H. W., Tao, S. C., Shen, J., Jiang, Y., Jiang, H., Xu, Y., . . . Xu, H. E. (2020). Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA

- polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*, 368(6498), 1499-1504.  
<https://doi.org/10.1126/science.abc1560>
- Yu, T.-J., Tang, J.-Y., Shiau, J.-P., Hou, M.-F., Yen, C.-H., Ou-Yang, F., Chen, C.-Y., & Chang, H.-W. (2022). Gingerenone A Induces Antiproliferation and Senescence of Breast Cancer Cells. *Antioxidants*, 11(3), 587. <https://doi.org/10.3390/antiox11030587>
- Yu, W., & MacKerell, A. D., Jr (2017). Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1520, 85–106. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_5)
- Yu, Z., Kan, R., Ji, H., Wu, S., Zhao, W., Shuiian, D., Liu, J., & Li, J. (2021). Identification of tuna protein-derived peptides as potent SARS-CoV-2 inhibitors via molecular docking and molecular dynamic simulation. *Food Chemistry*, 342, 128366.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128366>
- Zhao, H., Michaelis, M. L., & Blagg, B. S. (2012). Hsp90 Modulation for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Current State of Alzheimer's Disease Research and Therapeutics*, 1-25. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394816-8.00001-5>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel

Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

Zhu, W., Chen, C. Z., Gorshkov, K., Xu, M., Lo, D. C., & Zheng, W. (2020). RNA-Dependent RNA Polymerase as a Target for COVID-19 Drug Discovery. *SLAS Discovery*, 25(10), 1141-1151. <https://doi.org/10.1177/2472555220942123>

## Anexos

## Anexo A

ID	Metabolito	Puntaje de acoplamiento	$\Delta G$ (kcal/mol)	Mol W	Donador de H <sup>+</sup>	Aceptor de H <sup>+</sup>	LogP	Caco-2	% absorción oral
5281775	Gingerenona A	-8,335	-52,07	356,418	2	5	3,835	393,706	95,846
5281661	Swertianina	-8,185	-40,49	274,229	3	6	1,829	247,556	80,147
119269	Kievitona	-7,804	-43,91	356,374	4	6	2,593	118,629	77,333
119458	Cleistantina B	-7,731	-92,55	542,495	4	12	0,452	122,433	41,046
3108	Dipiridamol	-7,67	-68,47	354,313	6	9	-0,2	119,314	19,247
83489	Eriocitrina	-7,534	-64,58	596,541	8	20	-2,052	1,476	0
72277	(-)-Epigallocatequina	-7,429	-46,11	306,271	6	6	-0,187	19,067	35,808
399491	Artocarpesina	-7,392	-43,74	354,359	4	6	2,741	114,855	79,751
5280507	Alcohol Sinapílico	-7,34	-41,37	210,229	2	4	1,384	1050,261	89,123
122850	Aromadendrina	-7,306	-47,56	288,256	3	5	0,727	59,228	62,925
5280445	Luteolina	-7,153	-29,15	286,240	3	4	0,926	40,856	61,205
667639	Piceatannol	-7,122	-35,82	244,246	4	3	1,286	98,622	70,161
185848	Moracín M	-7,083	-40,61	242,231	3	4	1,709	278,537	80,68
160521	Isolariciresinol	-7,04	-47,01	360,406	4	6	2,024	164,263	78,453
5281692	Robinetina	-7,027	-43,04	302,240	5	6	-0,178	15,2	47,056
20489	Pediflavona	-7,011	-50,31	284,268	2	5	2,571	479,952	89,988
5315233	Trans-E-viniferina	-7,007	-67,44	454,478	5	4	3,622	30,798	74,794
443648	Pelargonidina 3-glucósido	-6,969	-63,13	433,39	7	10	-2,09	0	0
5281672	Miricetina	-6,846	-43,51	318,239	5	6	-0,299	6,257	26,816
3085181	Arnottianamida	-6,823	-50,60	381,384	1	7	3,039	1732,257	100

*Nota.* Puntuaciones de acoplamiento y cálculo de energía libre de unión de los 20 metabolitos

sugeridos en el acoplamiento XP como posibles inhibidores contra la proteasa principal del SARS-

CoV-2 (Mpro) junto con sus propiedades ADME.

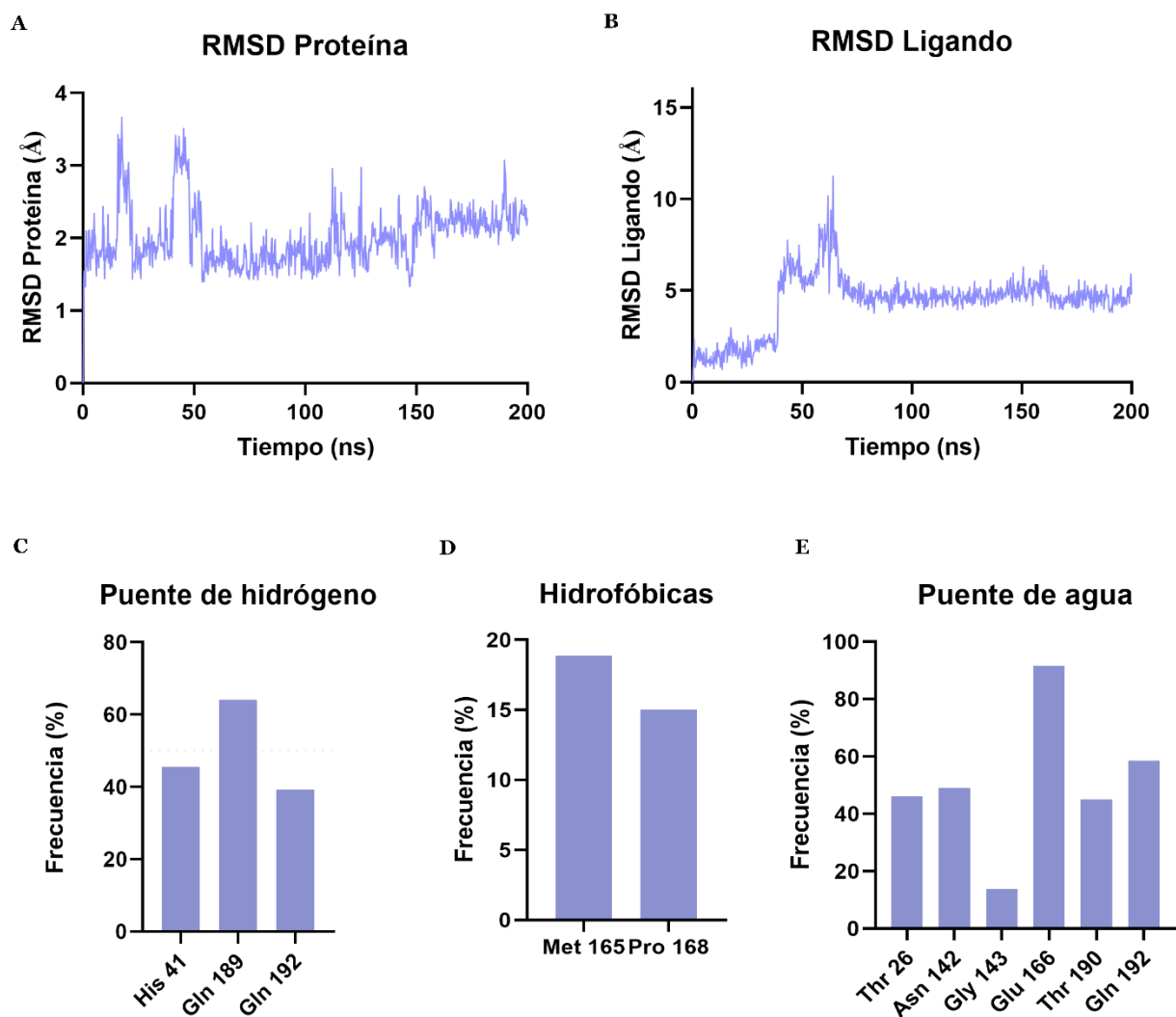
## Anexo B

ID	Metabolito	Puntaje de acoplamiento	$\Delta G$ (kcal/mol)	Mol W	Donador de H <sup>+</sup>	Aceptor de H <sup>+</sup>	LogP	Caco-2	% absorción oral
6451084	Ácido salvianólico B	-15,868	-4,16	718,623	9	14	1,671	0,006	0
9876038	Arecatanino C1	-14,938	13,18	866,784	15	16	0,390	0,026	0
122097	Soyasaponina I	-14,089	-17,11	943,133	11	18	-0,04	0,232	0
3715	Indometacina	-10,974	-10,48	357,793	1	4	4,267	160,491	91,405

84128275	Ácido alfa- metoxi-1H-indol- 3-propanoico	-10,173	11,11	219,24	2	3	2,185	187,366	80,418
464	Ácido Hipúrico	-9,678	28,63	179,175	1,250	3,750	1,499	89,959	70,402
735828	Ácido 2-bromo- 4,5- dimetoxicinámico	-9,402	-5,14	287,109	1	4	2,686	204,668	84,035
83697	Ácido L-leucico	-9,338	13,05	132,159	2	3	0,5	112,227	66,563
6398856	Ácido (R)-4- metoxi-2-metil-4- oxobutanoico	-9,28	-2,59	146,143	1	4	0,743	116,915	68,304
442739	Droserona	-9,204	21,53	204,182	2	4	0,516	241,356	72,383
100980006	Ácido 15-metoxi- 16-oxo-15,16H- estricto	-9,141	7,32	360,449	1	6	3,319	119,799	84,468
13370049	Ácido lambertico	-8,929	34,29	316,439	2	3	4,301	262,288	95,421
2236	Ácido aristolóquico	-8,805	22,53	341,276	1	5	2,592	83,752	76,538
44257206	Glicarina	-8,748	29,56	294,306	0	4	2,909	648,97	95,592
8617	Ácido indol-3- butírico	-8,473	3,25	203,240	2	2	2,646	128,814	80,204
11671	Ácido 2- hidroxiisobutírico	-8,374	18,87	104,105	2	3	0,456	138,183	67,925
10494	Ácido oleanólico	-8,374	10,62	504,619	5	10	2,634	303,486	71,538
23679177	1,4-Dimetil-7-(1- metiletil)-6- azulenosulfónico	-8,313	9,33	278,365	1	4	3,163	228,286	87,680
8468	Ácido vanílico	-8,046	8,39	158,149	2	4	1,046	76,628	66,795
101386282	(10E)-Beta-Ácido santálico	-8,01	12,73	234,338	1	2	3,816	311,831	93,928

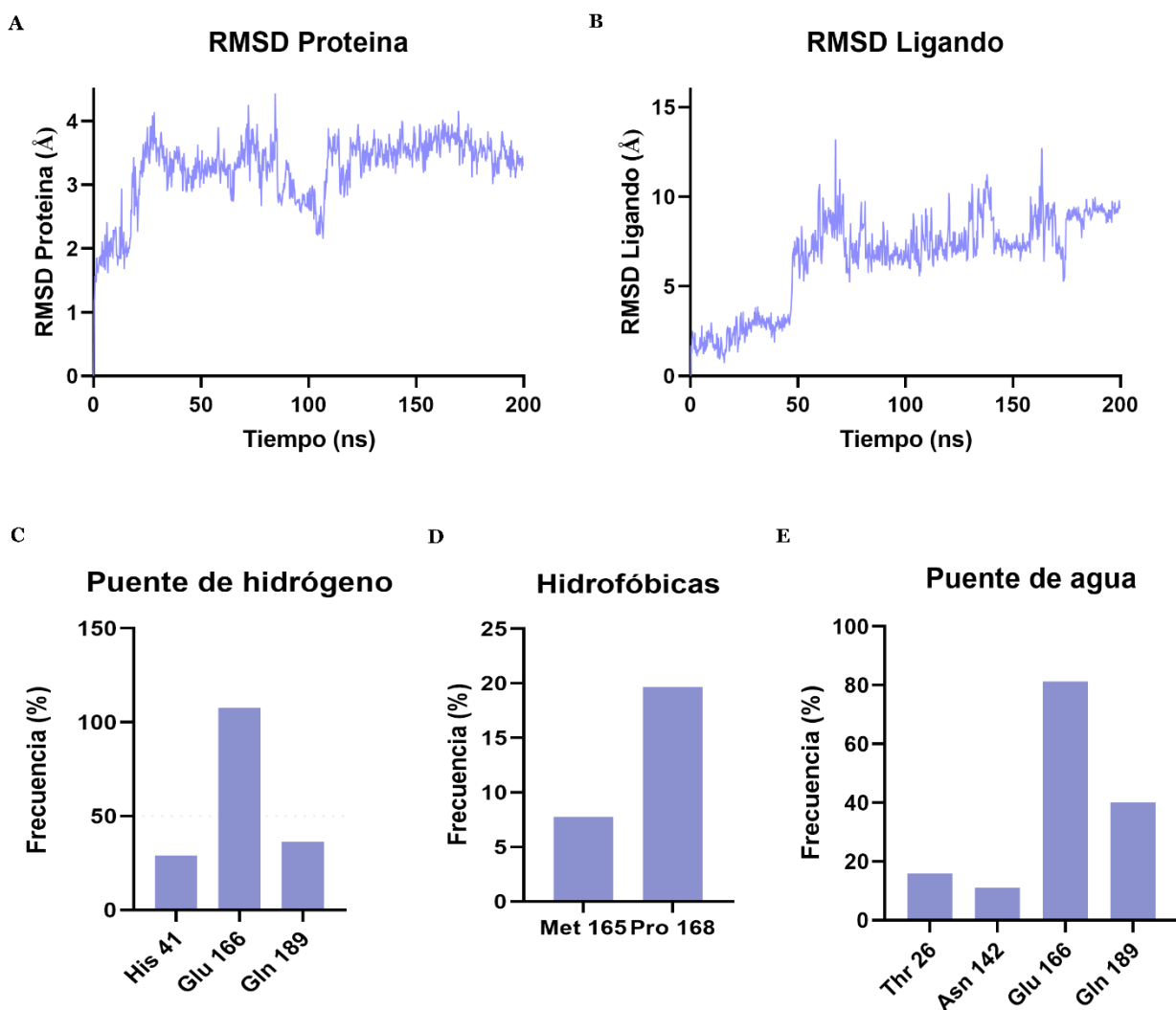
*Nota.* Puntuaciones de acoplamiento y cálculo de energía libre de unión de los 20 metabolitos sugeridos en el acoplamiento XP como posibles inhibidores contra la RdRp del SARS-CoV-2 junto con sus propiedades ADME.

## Anexo C



*Nota.* Datos obtenidos de la réplica 2 de dinámica molecular A) Imagen representativa de los valores de desviación cuadrática media (RMSD) para el complejo proteína-cleistanina B B) Variación del RMSD del ligando a lo largo del tiempo de simulación. C) Frecuencia de interacciones de tipo puente de hidrógeno. D) interacciones hidrofóbicas. E) interacciones de puentes de hidrógeno mediadas por agua

## Anexo D



*Nota.* Datos obtenidos de la réplica 3 de dinámica molecular A) Imagen representativa de los valores de desviación cuadrática media (RMSD) para el complejo proteína-cleistanina B B) Variación del RMSD del ligando a lo largo del tiempo de simulación. C) Frecuencia de interacciones de tipo puente de hidrógeno. D) interacciones hidrofóbicas. E) interacciones de puentes de hidrógeno mediadas por agua

## Anexo E







**LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**  
Certifica que:

**JEIMMY J. ÁLVAREZ JÁCOME**

Participó como ponente del trabajo titulado:

**Identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales con posible actividad antiviral frente a la proteasa Mpro y la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN viral del SARS-CoV-2.**

Por: Jeimmy J. Álvarez Jácome, Luis C. Vesga & Stelia Carolina Méndez Sánchez.

En la modalidad **PÓSTER VIRTUAL**, en el **I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias y Pandemias Persistentes y Emergentes**, organizado por el Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, que se realizó del 11 al 13 de noviembre de 2021, en Bucaramanga, Colombia.

  
**Maria Carolina Velásquez Martínez**  
 Directora Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina

  
**Mario Felipe Negrete Guzmán**  
 Coordinador de Posgrado - Departamento de Ciencias Básicas – Escuela de Medicina

## Anexo F

## Repurposing of Four Drugs as Anti-SARS-CoV-2 Agents and Their Interactions with Protein Targets

by  Luis C. Vesga <sup>1</sup> ,  Camilo A. Ruiz-Hernández <sup>1</sup> ,  Jeimmy J. Alvarez-Jacome <sup>1</sup> ,  
 Jonny E. Duque <sup>2</sup> ,  Bladimiro Rincon-Orozco <sup>1,3</sup>  and  Stelia C. Mendez-Sanchez <sup>1,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Universidad Industrial de Santander A. A. 678, Piedecuesta 681027, Colombia

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP), Universidad Industrial de Santander A. A. 678, Piedecuesta 681027, Colombia

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal CODEIM, Universidad Industrial de Santander A. A. 678, Piedecuesta 681027, Colombia

\* Author to whom correspondence should be addressed.

*Sci. Pharm.* **2022**, *90*(2), 24; <https://doi.org/10.3390/scipharm90020024>

Received: 14 February 2022 / Revised: 23 March 2022 / Accepted: 26 March 2022 / Published: 14 April 2022