



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS-ICUAP  
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Tesis para obtener el título de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

---

“ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES MOLECULARES  
EXPERIMENTALES Y SIMULADAS ENTRE ALBÚMINAS U  
OTROS RECEPTORES Y SUS LIGANDOS”

---

Presenta:  
LIC. SUSANA DANIELA LÓPEZ NÚÑEZ

Director:  
DR. THOMAS R. F. SCIOR

Junio, 2021

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del:

- Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, *CONACYT*, para realizar estudios de Maestría, con número de Becario: 618630

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios por darme las fuerzas para continuar.*

*A mamá y a papá por su amor incondicional, son todo para mí.*

*A mis hermanos, Daniel y Martin, por su apoyo, paciencia, ánimo, que orgullosa me siento de ustedes, los quiero tanto.*

*A todos aquellos que han sembrado en mi vida, deseo de todo corazón que su cosecha sea próspera.*

*Hay cosas que sabemos que son ciertas, pero que no podemos probar.*

*Teorema de incompletitud*

## RESUMEN

*Los sustratos se acoplan a enzimas y forman interfaces ligando/receptor (IRL), de la misma manera que otro tipo de ligandos ya sean agonistas o antagonistas con sus dianas proteicas, e. g. canales iónicos, receptores tirosina-quinasa, receptores acoplados a proteínas G, entre otras biomoléculas. La fuente principal para el análisis de la interacción estructural tridimensional en las IRL, son las estructuras cristalográficas tridimensionales obtenidas de la base de datos PDB. La otra fuente de conocimiento son las simulaciones moleculares computacionales mediante el procedimiento de acoplamiento molecular llamado “docking”, en donde se predicen acoplamientos de los modelos tridimensionales en la IRL. Debido a la gran cantidad y diversidad de proteínas registradas en la base de datos PDB se han observado patrones de interacción, es decir, ciertos átomos del receptor en el sitio de unión interactúan con ciertos átomos del ligando para formar la interfaz, los cuales se repiten y conservan entre ligandos y proteínas. Dichas interacciones moleculares se pueden clasificar en ciertos tipos, tales como puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , enlaces halógenos, interacciones hidrofóbicas  $\pi$ , entre otras. Diversos estudios in silico reportan un acoplamiento molecular con energías mínimas de interacción y un número considerable en un clúster, donde se predice que el resultado es el más óptimo. Sin embargo, pocos estudios han analizado ¿Hacia qué inclinaciones electrónicas ó estéricas el programa de acoplamiento tiende a yuxtaponer la posición y conformación del ligando en el sitio de unión del receptor?*

*Determinar las predicciones de las coordenadas espaciales de la posición y conformación del ligando en el sitio de unión implica que la función de puntuación de la herramienta computacional ha reconocido las variables fisicoquímicas. Sin embargo, los algoritmos de predicción y resolución del programa de acoplamiento no determinan en la emulación ciertas variables importantes como el área enterrada SAS y otros enlaces que se presentan en el acomodo espacial de la posición y conformación del ligando indirectamente, los cuales se pueden determinar por medio de otros programas, en donde estas mediciones presentan patrones de interacción hacia cierto tipo de enlaces y área enterrada SAS.*

*En el presente trabajo, se estudiaron las interacciones electrónicas y estéricas de las interfaces ligando/receptor predichas por el programa de acoplamiento, el cual yuxtapone la posición y conformación del ligando formando dos fenómenos en el acoplamiento molecular: electrónico y estérico en el sitio de interacción nativo del receptor.*

*Los resultados demuestran que el programa tiende a posicionar indirectamente el ligando en la cavidad del receptor hacia enlaces  $\pi$  - catión, halógenos y otros tipos de puentes de hidrógeno en las estructuras analizadas formando el fenómeno de acoplamiento molecular electrónico.*

*Por otra parte, los resultados del análisis estérico demuestran que en la predicción de las coordenadas del ligando en la cavidad del receptor determinado por el programa de acoplamiento, tiende a incrementar el área de interfaz y disminuir el volumen que hay entre el ligando y la cavidad.*

*Los métodos diseñados para determinar patrones de interacción en la interfaz ligando/receptor elucidaron residuos y características específicas en las cavidades de los receptores de albúmina de suero humano y la proteasa principal del SARS Cov-2, los cuales son piezas claves en la interacción con diversos ligandos y podrían contribuir en investigaciones a futuro en estudios de súper computo de dinámicas moleculares, estudios in vitro en biología molecular, entre otras áreas.*

# ÍNDICE GENERAL

I.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
1.1.	<i>Reconocimiento molecular</i>	9
1.1.1.	<i>Sitios de unión de proteínas a ligandos</i>	10
1.2.	<i>Interacciones moleculares</i>	13
1.2.1.	<i>Enlace de hidrógeno</i>	14
1.2.2.	<i>Puente de sal</i>	15
1.2.3.	<i>Interacciones hidrofóbicas</i>	16
1.2.4.	<i>Interacciones <math>\pi</math>-<math>\pi</math> y H-<math>\pi</math></i>	16
1.2.5.	<i>Interacciones <math>\pi</math>-catión</i>	17
1.2.6.	<i>Enlace halógeno</i>	18
1.3.	<i>Propiedades fisicoquímicas en sitios de unión de proteínas/ligandos</i>	20
1.3.1.	<i>Propiedades estéricas</i>	20
1.3.2.	<i>Propiedades electrónicas</i>	21
1.3.3.	<i>Potencial electrostático de superficie molecular</i>	21
1.3.4.	<i>Área polar y no polar del receptor</i>	21
1.4.	<i>Acoplamiento molecular</i>	22
1.5.	<i>Albúmina de suero humano</i>	26
1.5.1.	<i>Estructura de la ASH</i>	26
1.5.2.	<i>Función</i>	27
1.6.	<i>SARS-CoV-2</i>	28
1.6.1.	<i>Estructura y función de la proteasa principal del SARS-CoV-2</i>	28
II.	<b>ANTECEDENTES GENERALES</b>	30
III.	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	32
IV.	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	33
V.	<b>OBJETIVOS</b>	37
5.1.	<i>Objetivo general</i>	37
5.2.	<i>Objetivos específicos</i>	37
VI.	<b>HIPÓTESIS</b>	38
VII.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	39
7.1.	<i>Recopilación de estructuras en formato PDB</i>	40
7.2.	<i>Preparación y optimización de estructuras</i>	40
7.2.1.	<i>Receptores</i>	40
7.2.2.	<i>Ligandos</i>	41
7.3.	<i>Determinación del sitio de unión</i>	41
7.4.	<i>Simulación del acoplamiento molecular REC/ORI</i>	42
7.4.1.	<i>Minimización de Ligandos ORI</i>	42
7.4.2.	<i>Acoplamiento molecular REC/ORI</i>	42
7.5.	<i>Determinación de propiedades fisicoquímicas de interfaz en las C-R/Ls</i>	42
7.5.1.	<i>Emulación e identificación de enlaces en la interfaz de REC/ORI y REC/DOC</i>	42
7.5.2.	<i>Calculo de superficies y volúmenes en la interfaz de REC/ORI y REC/DOC</i>	43
7.5.2.1.	<i>Superficies de interfaz de las C-R/Ls</i>	43
7.5.2.2.	<i>Volúmenes que se forman en la interfaz de las C-R/Ls</i>	43
7.5.3.	<i>Identificación de residuos en la interfaz de REC/ORI y REC/DOC</i>	43
7.6.	<i>Modificación de ligandos ORI</i>	43
7.7.	<i>Acoplamiento molecular REC/ORI-M</i>	44
7.8.	<i>Determinación de propiedades fisicoquímicas de interfaz en las C-R/L-Ms</i>	44

<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	45
8.1. <i>Análisis estructural de enlaces en las C-R/Ls</i> .....	45
8.2. <i>Análisis de áreas SAS de interfaz en las C-R/Ls</i> .....	51
8.3. <i>Análisis de volúmenes de interfaz en las C-R/Ls</i> .....	58
8.4. <i>Análisis e identificación estructural de residuos en las C-R/Ls</i> .....	62
8.5. <i>Análisis estructural de enlaces en las C-R/L-Ms</i> .....	66
8.6. <i>Análisis de áreas SAS de interfaz en las C-R/L-Ms</i> .....	78
8.7. <i>Análisis de volúmenes de interfaz en las C-R/L-Ms</i> .....	83
8.8. <i>Análisis de residuos en las C-R/L-Ms</i> .....	83
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	85
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	86
<b>XI. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	98
11.1. <i>Script en código Python para la preparación del receptor en Autodock4</i> .....	125
11.2. <i>Script en código Python para la preparación del ligando en Autodock4</i> .....	128
11.3. <i>Script en código Python para el cálculo de área enterrada SAS</i> .....	131

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Interacciones no covalentes en IRLs</i> .....	14
<b>Tabla 2.</b> <i>Softwares de AM proteína-ligando y su algoritmo de búsqueda</i> .....	25
<b>Tabla 3.</b> <i>Estructuras determinadas por CRX de ASH y PPS en interfaz con sus respectivos ligandos</i> .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Puentes de sal en el complejo estructural ASH/CAM.</i>	15
<i>Figura 2. Representaciones geométricas de apilamientos <math>\pi</math>-<math>\pi</math>.</i>	17
<i>Figura 3. Representaciones geométricas de interacciones <math>\pi</math>-catión.</i>	18
<i>Figura 4. Representación esquemática del enlace halógeno.</i>	19
<i>Figura 5. Representación del modo de unión del complejo ligando/receptor.</i>	23
<i>Figura 6. Diagrama general del acoplamiento molecular IRL convencional.</i>	24
<i>Figura 7. Estructura resuelta por CRX de la ASH con sitios de unión a fármacos.</i>	27
<i>Figura 8. Estructura resuelta por CRX de la PPS con sitios de unión a inhibidores experimentales.</i>	29
<i>Figura 9. Diagrama de la metodología utilizada para realizar el AM, cálculos electrónicos y estéricos.</i>	39
<i>Figura 10. Interacciones moleculares totales de las C-R/Ls.</i>	46
<i>Figura 11. Análisis de interacciones moleculares de las C-L/Rs.</i>	48
<i>Figura 12. Análisis estructural de interacciones de ASH/ARI.</i>	49
<i>Figura 13. Análisis estructural de interacciones de ASH/IBC.</i>	50
<i>Figura 14. Área de interfaz enterrada SAS de las C-R/Ls.</i>	53
<i>Figura 15. Área de interfaz SAS de los átomos que componen a los residuos polares y no polares de las C-R/Ls.</i>	54
<i>Figura 16. Superficie de interfaz SAS de los átomos que componen a los residuos polares y no polares en la C-R/L de ASH/ARI.</i>	55
<i>Figura 17. Área de interfaz SAS de los átomos polares, carbonos y anillos aromáticos de las C-R/Ls.</i>	56
<i>Figura 18. Superficie de interfaz SAS de los átomos polares, carbonos y anillos aromáticos de la C-R/L de ASH/ARI.</i>	57
<i>Figura 19. Volúmenes de interfaz de las C-R/Ls.</i>	58
<i>Figura 20. Volumen total en la interfaz de las superficies SES de la C-R/L de ASH/CAM.</i>	60
<i>Figura 21. Volumen del solvente en la interfaz de las superficies SES de la C-R/L de ASH/CAM.</i>	61
<i>Figura 22. Residuos de las C-R/Ls que forman la interfaz del área enterrada SAS.</i>	63
<i>Figura 23. Interacciones de ALA291 y LEU260 en el sitio de interacción sludow I de ASH/OXI ORI.</i>	64
<i>Figura 24. Interacciones de PRO168 en el sitio de interacción catalítico de la PPS/MI23.</i>	66
<i>Figura 25. Modo de unión típico de fragmentos frente a impactos en una cavidad proteica.</i>	67
<i>Figura 26. Análisis de interacciones moleculares de las C-R/L-Ms.</i>	68
<i>Figura 27. Modificación de DIF.</i>	68
<i>Figura 28. PES de DIF ORI.</i>	69
<i>Figura 29. Análisis estructural de enlaces de ASH/DIC ORI-M y ASH/DIC DOC-M.</i>	71
<i>Figura 30. Análisis estructural estérico de ASH/DIC ORI-M y ASH/DIC DOC-M.</i>	71
<i>Figura 31. Modificación de BIC.</i>	72
<i>Figura 32. Análisis estructural de enlaces de ASH/BIC ORI-M y ASH/BIC DOC-M.</i>	73
<i>Figura 33. Análisis estructural estérico de los anillos aromáticos de BIC ORI-M y BIC DOC-M.</i>	74
<i>Figura 34. Modificación 1 de OXI.</i>	75
<i>Figura 35. Análisis estructural de enlaces de ASH/OXI ORI-M1 y ASH/OXI DOC-M1.</i>	76
<i>Figura 36. Modificación 2 de OXI.</i>	77
<i>Figura 37. Análisis estructural de enlaces de ASH/OXI ORI-M2 y ASH/OXI DOC-M2.</i>	78
<i>Figura 38. Área de interfaz enterrada SAS de las C-R/L-Ms.</i>	78
<i>Figura 39. Área de interfaz SAS de los átomos que componen a los residuos polares y no polares de las C-R/L-Ms.</i>	79
<i>Figura 40. Área de interfaz SAS de los átomos polares, carbonos y anillos aromáticos de las C-R/L-Ms.</i>	80
<i>Figura 41. Modificación de IND.</i>	81
<i>Figura 42. Contactos de las superficies atómicas que forman el área enterrada SAS de ASH/IND.</i>	82
<i>Figura 43. Volúmenes de interfaz de las C-R/L-Ms.</i>	83
<i>Figura 44. Residuos de las C-R/L-Ms que forman la interfaz del área enterrada SAS.</i>	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

CLR	Complejos ligando/receptor
a/b	Interfaz de moléculas a y b
SAS	Superficie accesible al solvente
SARS-CoV-2	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo de tipo 2
IM	Interacciones moleculares
CRX	Cristalografía de rayos X
RMN	Resonancia magnética nuclear
MCE	Microscopía crio-electrónica
PDB	Protein Data Bank
IRL	Interfaz del complejo receptor-ligando
sc-PDB	Base de datos de sitios de unión a fármacos
UniProt	Base de datos de secuencias de proteínas UniProt
ASH	Albúmina sérica humana
PPS	Proteasa Principal del SARS-CoV-2
PLIP	Protein Ligan Interaction Profiler
PES	Potencial electrostático de superficie molecular
Kcal	Kilocalorías
AM	Acoplamiento molecular
COVID-19	Coronavirus 2019
CoV	Coronavirus
ERX	Espectrometría de rayos X
AD4	Autodock 4.0
Kcal	Kilocalorías
AA	Aminoácidos
REC	Receptores proteicos
C-R/L	Cavidad del receptor en interfaz con el ligando
C-R/L-M	Cavidad del receptor en interfaz con el ligando modificado
ARI	Aripiprazol
IBC	Idarubicina
IVDW	Interacciones de Van der Waals
DIF	Diclofenaco
PRO	Propofol
BIC	Bicatulamida
OXI	Oxifenbutazona
LID	Lidocaína
IND	Indometacina
WAR	Warfarina
FBZ	Fenilbutazona
APP	Azapropazona
TPV	Telaprevir
BCP	Boceprevir
NPV	Narlaprevir
vdW	Van der Waals
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
PSA	Polar Surface area
NPSA	No polar Surface area
SES	Solvent-excluded Surface
CAM	Camptotecina
NAT	Nativa
M2	Modificada número 2
NP	No polares
P	Polares
CYS	Cisteínas
ARO	Aromáticos
CN	Cargados negativos
CP	Cargados positivos
AE	Área enterrada
CP	Cargas parciales
ORI	Posición y conformación del ligando en la IRL determinada por CRX
DOC	Posición y conformación del ligando en la IRL determinada por el AM
ORI-M	Posición y conformación del ligando modificado en la IRL igual a ORI
DOC-M	Posición y conformación del ligando ORI-M en la IRL determinada por el AM

# I.INTRODUCCIÓN

*Molecules do not act if they are not bound.*

**Paul Ehrlich**

## ***1.1. Reconocimiento molecular***

El reconocimiento molecular es el proceso por el cual las macromoléculas interactúan entre sí o con diversas moléculas pequeñas con alta especificidad y afinidad para formar un complejo, el cual constituye la base para la coordinación de una gran cantidad de eventos biológicos esenciales [Janin, 1995].

La mayoría de los procesos en los organismos vivos se controlan mediante el reconocimiento molecular en proteínas [Rose *et al.*, 2015]. Específicamente, las interacciones moleculares (IM) en proteínas/ligandos son indispensables para muchas funciones celulares, debido a los papeles imprescindibles que desempeñan en una amplia variedad de vías biomoleculares [Chandel *et al.*, 2018; Linkuvienė *et al.*, 2018].

Técnicas experimentales de cristalografía de rayos X (CRX), resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopía crio-electrónica (MCE), se utilizan para el estudio y elucidación de asociaciones entre proteínas y otras moléculas a escala atómica [Hol *et al.*, 1987; Boland *et al.*, 2017]. Los datos obtenidos han permitido que una amplia diversidad de complejos estructurales se encuentre disponible en la base de datos de proteínas PDB, la cual alberga cerca de 100,000 estructuras de proteínas depositadas, y más del 75% de ellas están resueltas en complejos con al menos un ligando de molécula pequeña [Berman *et al.*, 2008]. Con la abundante información estructural recopilada que proviene de un gran número de organismos de la base de datos PDB, se pueden obtener conocimientos detallados sobre cómo los ligandos interactúan con sus objetivos proteicos para la resolución de interfaces que conducen al entendimiento de su función [Ezkurdia *et al.*, 2009].

Simultáneamente, junto con los métodos experimentales los enfoques computacionales para detectar y analizar las interfaces de complejos receptor-ligando (IRLs) han contribuido notablemente a numerosos recursos para clasificar complejos biológicos, como sc-PDB, UniProt, entre otros [Konc y Janežič, 2014; Desaphy *et al.*, 2015].

### ***1.1.1. Sitios de unión de proteínas a ligandos***

¿Qué hace que un sitio de unión sea un sitio de unión? Muchos estudios han abordado este intrigante e importante problema. Ser capaz de *a priori* predecir sitios de unión, limitaría la búsqueda de conformación en el diseño de fármacos, facilitaría la predicción de interacciones proteína/proteína y podría proporcionar pistas para el diseño del sitio de unión.

El reconocimiento molecular de alta especificidad es uno de los principios fundamentales del funcionamiento de los sistemas vivos, lo cuales están involucrados en todos los procesos biológicos más importantes, como las interacciones hormona/receptor y antígeno/anticuerpo, reacciones enzimáticas, transporte transmembrana de diversas sustancias, entre otros. Desde un punto de vista general, el reconocimiento molecular es un concepto clave de la química supramolecular. Puede describirse como un proceso de interacción de alta afinidad y unión selectiva de un ligando por un receptor [Dean, P. M., 1987].

La unión ligando/receptor es un mecanismo utilizado por los sistemas biológicos para iniciar, propagar o completar muchos procesos funcionales diferentes. Un ejemplo específico es la familia de mecanismos de señalización que se activan por la unión de proteínas de la matriz extracelular a receptores específicos en la superficie celular [Longo *et al.*, 2008].

Normalmente, los ligandos son sustancias relativamente simples de diversa naturaleza, por ejemplo, péptidos, proteínas, ADN o ARN corto, esteroides, partes de virus o bacterias o compuestos artificiales y fármacos. Por el contrario, los receptores son macromoléculas solubles en agua, ancladas o incrustadas en la membrana con una estructura 3D compleja [Hollenstein *et al.*, 2013; Zuber y Unwin, 2013; Garrett *et al.*, 2002].

Las alteraciones del estado de los receptores celulares estimuladas por ligandos dan como resultado respuestas fisiológicas, que constituyen la actividad biológica de diversas biomoléculas, así como la acción de fármacos.

[[Kenakin et al., 2014](#); [Imming et al., 2006](#)]

El receptor y el ligando forman un par complementario con enlaces no covalentes relativamente fuertes formados por fuerzas de vdW, interacciones hidrófobas que involucran interacciones  $\pi$ , electrostáticas, enlaces halógenos, puentes de hidrógeno, entre otras. El tipo de estas interacciones depende de la compatibilidad estructural y energética de las moléculas involucradas en la interacción [[Lodish y Harvey, 2000](#)].

Las IRL son esenciales para la funcionalidad biológica y están implicadas en todas las funciones bioquímicas. Por lo tanto, el estudio de los sitios de unión proteína/ligando y sus residuos asociados, es un paso importante en la elucidación funcional en proteínas. Resolver las IRL en el contexto de los sitios de unión a los ligandos es importante para comprender los mecanismos celulares y es fundamental para obtener las respuestas a los fármacos [[Roche et al., 2015](#)].

En las últimas décadas, se ha realizado abundante trabajo teórico para lograr la interpretación correcta de estos parámetros y relacionarlos con las propiedades estructurales de los receptores y ligandos combinados con el conocimiento actual de las fuerzas intermoleculares. Desde entonces, al menos cinco avances importantes han dado un nuevo impulso al estudio de las IRL:

- (i) El progreso continuo en el campo de la cristalografía y la bioquímica ha puesto a disposición la estructura de muchos complejos IRL con resolución en Å
- (ii) El uso adecuado de la mutagénesis sitio dirigida nos ha permitido evaluar la contribución de los aminoácidos individuales a la afinidad de unión y la especificidad de los receptores de proteínas.
- (iii) El aumento continuo de la potencia de las computadoras para análisis y una innumerable cantidad de métodos *in silico*, nos ha permitido aprovechar al máximo las técnicas de simulación desarrolladas para resolver y entender diversas funcionalidades biológicas, en donde estas técnicas han proporcionado información valiosa sobre el comportamiento de sistemas moleculares realistas y virtuales.

(iv) El progreso continuo en la biología celular dejó en claro que la descripción convencional de las IRL (a través del equilibrio y las constantes cinéticas) era insuficiente para explicar todos los fenómenos impulsados por interacciones entre receptores de superficie sometidos a estrés mecánico e impuestos por desplazamiento.

(v) Recientemente, una variedad de métodos experimentales *in silico* desarrollados por físicos, químicos, bioinformáticos, farmacéuticos, biólogos y otros peritos de diversas áreas ha permitido el monitoreo directo de las IRL a nivel de un solo complejo molécula/molécula.

[[Pierre Bongrand, 1999](#); [Yakimchuk, 2011](#)].

En términos evolutivos, la interacción entre proteínas y ligandos se produce en los sitios de unión que a menudo están formados por aminoácidos conservados. Con el fin de hacer que la investigación de nuevos medicamentos sea lo más productiva posible, es necesario explorar técnicas "*in silico*", de alto rendimiento y cribados virtuales a base de fragmentos que requieren la identificación de cavidades farmacológicas en la superficie de las proteínas, que pueden o no corresponder a sitios activos [[Khazanov y Carlson, 2013](#)]. Las proteínas son macromoléculas caracterizadas por estructuras complejas cuya función principal es mantener sitios activos relativamente pequeños. De hecho, es necesaria una arquitectura 3D precisa para unir ligandos de manera eficiente. Una superficie proteica representa una topología irregular de hendiduras. Puede haber varios sitios de unión en una sola proteína y los ligandos pueden ser tan pequeños como iones o polímeros grandes que pueden funcionar como sustratos, inhibidores o moduladores alostéricos [[Burley et al., 1999](#); [Liolios et al., 2006](#); [Galperin, 2006](#)].

Varios estudios han examinado los atributos de los sitios de unión a proteínas. Muchos de éstos han demostrado que en las proteínas los sitios de unión varían sus características inherentes de acuerdo a la funcionalidad y especificidad del complejo estructural receptor/ligando [[Edwards y Cottage, 2003](#)].

Los sitios de unión en superficies enzimáticas suelen estar constituidas en una forma de hendidura cóncava a diferencia de los complejos proteína/proteína más grandes. Se ha demostrado que los sitios de unión a enzimas con frecuencia son las cavidades más grandes de la superficie molecular proteica. Por otra parte, la forma del sitio de unión de

los dímeros suele ser bastante plana y prácticamente no se distingue de otros sitios de interacción en la superficie proteica.

Abordar el problema de la conservación de residuos en superficies y en IRL requiere un método de comparación estructural que sea independiente del orden de secuencia de aminoácidos. Además, para derivar de forma única los intercambios (y la conservación) dentro de un conjunto de moléculas se requiere un método de comparación de múltiples estructuras. Iniciar desde un punto de partida de alineación de pares macromoleculares puede causar un sesgo [Bonneau y Baker, 2001; Halling, 1992; Branden y Tooze, 1999].

Finalmente, debido a la amplia gama de funciones biológicas que desempeñan las proteínas, una comprensión detallada de las interacciones entre proteínas y ligandos es fundamental para comprender la biología estructural a nivel molecular [Du *et al.*, 2016].

## **1.2. Interacciones moleculares**

Las IM son de vital importancia para el diseño y procesos de reconocimiento molecular, tanto en sistemas sintéticos como biológicos [Gohlke y Klebe, 2002]. El análisis preciso de las IM con métodos teóricos de alto nivel ayuda a diseñar nuevas moléculas funcionales y materiales con las propiedades físicas y químicas deseadas [Aliakbar *et al.*, 2016].

Las IM se clasifican de acuerdo al tipo de enlace involucrado: covalente y no covalente. Las interacciones no covalentes difieren del enlace covalente ya que el primero se basa en interacciones electrostáticas en lugar de compartir electrones [Cerný y Hobza, 2007].

Existe una variedad de interacciones no covalentes que han sido estudiadas en la unión de ligandos a proteínas, e. g. enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ -catión,  $\pi$ - $\pi$ , enlaces iónicos, puentes de sal, amida- $\pi$ , enlaces halógenos, entre otras [Frieden R., 1975]. En resumen, en la Tabla 1 se muestran las principales interacciones no covalentes reportadas en sistemas biológicos.

*Tabla 1. Interacciones no covalentes en IRLs.*

<b>Interacción no covalente</b>	<b>Fuerza</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplo</b>
Puente de hidrógeno	4-4.5 kcal/mol	Comparten hidrógenos entre dos AEN	Agua, formación de $\alpha$ -hélices y apilamiento de hojas $\beta$ en proteínas, IRL, interacciones proteína-proteína, redes de HOH
Enlace hidrofóbico	0.7-1.0 kcal/mol	IM entre dos moléculas de naturaleza no polar	Interacciones entre anillos aromáticos y cadenas de carbonos
Interacción de apilamiento $\pi$ - $\pi$	Débil	Interacciones $\pi$ de dos sistemas aromáticos apilados por deslocalización de electrones	Reconocimiento entre cadenas laterales de aminoácidos aromáticos y ácidos nucleicos.
Interacción iónica	Fuerte entre cargas diferentes y repulsivo entre cargas similares	Atracción electrostática fuerte entre dos átomos cargados ó ionizados	Interacciones inter e intra moleculares de proteínas, interacciones enzimáticas proteína-cación, IRL

*AEN: átomos electronegativos; kcal: kilocalorías. Tomada y modificada de Frieden, 1975.*

En las secciones 1.2.1. – 1.2.6., se mencionan las descripciones y características principales de los ejemplos más importantes de interacciones no covalentes para la formación de IRLs.

### **1.2.1. Enlace de hidrógeno**

El enlace de hidrógeno se refiere a la formación de un enlace débil entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo fuerte y otro átomo de electronegatividad más alta. Por lo tanto, el átomo de hidrógeno, que está conectado a un átomo altamente electronegativo (por ejemplo, oxígeno, nitrógeno y azufre) a través de un enlace covalente, desarrolla una carga positiva parcial y es atraído por otro átomo electronegativo fuerte (por ejemplo, oxígeno, flúor, nitrógeno, y azufre), que ha desarrollado una carga parcial negativa debido a la atracción entre la nube de electrones y su átomo vecino [Jeffrey y Saenger, 1994].

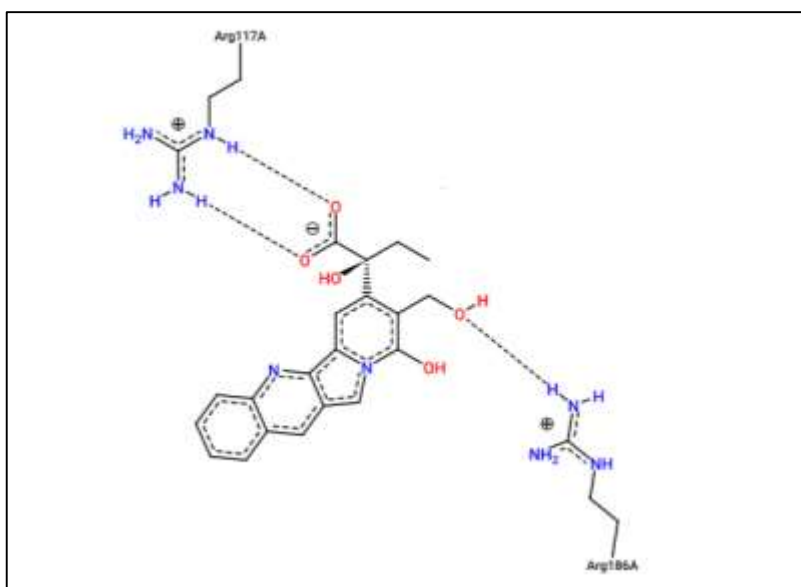
Los enlaces de hidrógeno proporcionan la mayoría de las interacciones direccionales que sustentan el plegamiento de proteínas, la estructura de las proteínas y el reconocimiento molecular [Habermann y Murphy, 1996].

### 1.2.2. Puente de sal

Un puente de sal se puede definir como una interacción entre dos grupos de carga opuesta en la que al menos un par de átomos pesados está dentro de la distancia de enlace de hidrógeno. Cabe señalar que la atracción o repulsión carga-carga podría ser significativa incluso si los centros geométricos de los grupos funcionales están separados por distancias superiores a 4 Å, la distancia que se suele utilizar para identificar un puente de sal [Kakiuchi, 2011].

Estas interacciones no covalentes asistidas por carga juegan papeles importantes en agrupaciones iónicas, equilibrios ácido-base, solvatación de iones, reconocimiento molecular, transportes de iones, plegamiento de proteínas, entre otros [Kurczab *et al.*, 2018]. En particular, los puentes de sal en cavidades pueden hacer contribuciones cruciales a la unión de ligandos [Bosshard *et al.*, 2004].

En la Figura 1, se muestran dos puentes de sal en la cavidad de ASH y camptotecina.



**Figura 1.** Puentes de sal en el complejo estructural ASH/CAM. Formación de puente de sal en la cavidad de ASH (Arg117A) y CAM, entre un grupo guanidinio y un grupo carboxilato del ligando. Tomada de PoseView, <https://proteins.plus/419k>.

### **1.2.3. Interacciones hidrofóbicas**

Los contactos hidrofóbicos son las interacciones más comunes en los complejos proteína/ligando [Patil *et al.*, 2010]. Estas interacciones juegan un papel fundamental en la formación y estabilidad de proteínas, membranas biológicas, IRL y otros complejos [Pace *et al.*, 2011].

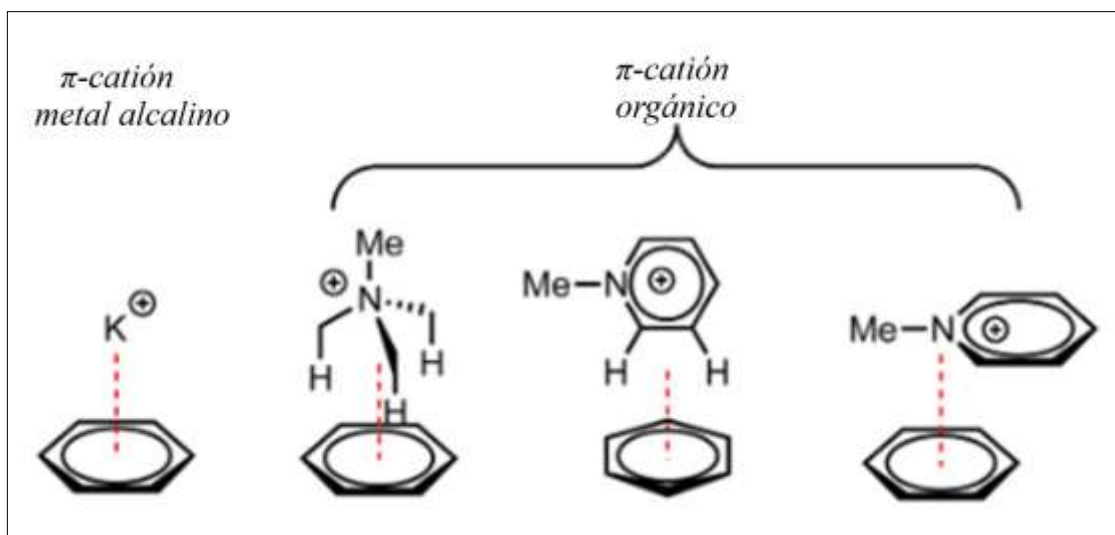
Algunos programas utilizados para detectar IMs como PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler), establecen que un átomo se clasifique como hidrófobo si es un carbono y solo tiene átomos de carbono o hidrógeno como vecinos [Salentin *et al.*, 2015]. Se sabe, que las interacciones alifático-aromáticas que involucran grupos alquilo y anillos aromáticos son interacciones que ocurren comúnmente en interfaces no polares [Pereira de Araujo *et al.*, 1999].

### **1.2.4. Interacciones $\pi$ - $\pi$ y H- $\pi$**

Se ha prestado especial atención a las interacciones que involucran sistemas aromáticos ya que participan en la estabilización de estructuras macromoleculares [Burley y Petsko, 1985].

Las interacciones entre anillos aromáticos, donde involucran H- $\pi$  (Apilamiento en forma de T) y  $\pi$  -  $\pi$  (apilamientos cara-cara y cara-cara desplazados) se denominan interacciones atractivas no covalentes de la nube electrónica  $\pi$  de un compuesto aromático con el resto de H cargado positivamente (en CH, NH, etc.) y la nube electrónica  $\pi$  de otro compuesto aromático, respectivamente [Martinez y Iverson, 2012]. En la asociación entre dos anillos aromáticos pueden darse diferentes disposiciones (tipos de interacciones  $\pi$ ), las cuales se muestran en la Figura 2 [Lee *et al.*, 2007].



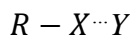


(b)

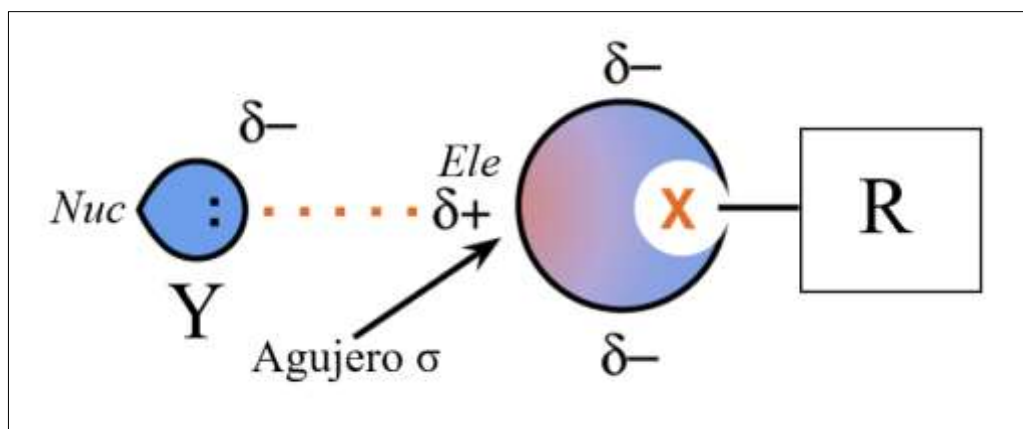
**Figura 3.** Representaciones geométricas de interacciones  $\pi$ -cación. (a) Potencial electrostático de superficie molecular: rojo (PES electronegativo), Azul (PES electropositivo), Verde (PES electropositivo con valores cercanos a 0), amarillo (PES electronegativo con valores cercanos a 0) con valores de -5 a 5 kcal/mol que ilustra la base electrostática de una interacción  $\pi$ -cación entre benceno y un catión amonio; (b) Ejemplos de diferentes modos de interacción para sistemas de moléculas pequeñas que participan en interacciones  $\pi$ -cación. Las líneas punteadas en rojo indican la interacción electrostática. Tomada y modificada de Kennedy, et al., 2016.

### 1.2.6. Enlace halógeno

El enlace halógeno se define mediante la siguiente ecuación:



En donde un átomo halógeno (X) se encuentra covalentemente unido a un grupo ó cadena (R) y tiene una región electrofílica o una región potencialmente electrofílica, en su MEP. Puede suceder que X esté unido covalentemente a más de un grupo R. En tales casos, el halógeno también puede formar más de un enlace halógeno. El aceptor XB (Y): donante de densidad de electrones, el cual puede ser un anión o una especie neutral que posee al menos una región nucleófila, e. g. un átomo que posee un par solitario de electrones o un sistema  $\pi$ , Figura 4.



**Figura 4.** Representación esquemática del enlace halógeno. X: cualquier átomo halógeno; R: grupo ó átomo unido covalentemente a X; Y: átomo nucleófilo donador; Regiones de densidad de electrones positivas y negativas en rojo y azul, respectivamente; Nuc: nucleófilo; Ele: Electrófilo.

En los últimos años, los enlaces halógenos han recibido gran atención debido a su importante papel en diferentes campos de la química, bioquímica, biología estructural, entre otras áreas. Debido a la naturaleza de atracción de los enlaces halógenos, las distancias  $X \cdots Y$  son más cortas que la suma de los radios de vDW de los átomos X y Y. De hecho, la distribución anisotrópica de carga alrededor del átomo de halógeno es responsable para la formación del enlace halógeno. En un átomo halógeno enlazado covalentemente, el radio del halógeno en la dirección a lo largo del enlace RX es más corto que a lo largo de las direcciones perpendiculares a este enlace. En consecuencia, los halógenos muestran caracteres tanto electrofílicos (a lo largo de RX) como nucleofílicos (a lo largo de vectores perpendiculares a RX).

El enlace halógeno, en la actualidad, está recibiendo mayor atención en el estudio de complejos proteína/ligando. Muchos fármacos halogenados se estabilizan con enlaces halógenos con diversas biomoléculas. Los átomos de halógeno, comúnmente flúor y cloro, se han utilizado durante varios años para el diseño de fármacos. Se estima que una cuarta parte del número total de artículos y patentes estrechamente relacionados con la química médica implican la inserción de halógenos durante la síntesis de compuestos finales [Sirimulla *et al.*, 2013].

Los halógenos, juegan un papel importante en los sistemas naturales. Las hormonas tiroideas representan una clase de moléculas yodadas naturalmente en las que los enlaces halógenos desempeñan un papel importante en su reconocimiento. Actualmente, se

conocen 3500 metabolitos que contienen halógenos, incluidos los importantes antibióticos cloranfenicol, 7-clorotetraciclina y vancomicina. Además, la halogenación directa de proteínas y ácidos nucleicos puede resultar de la halogenación oxidativa por una serie de peroxidasas implicadas en respuestas inflamatorias [Auffinger, Pascal *et al.*, 2004].

### ***1.3. Propiedades fisicoquímicas en sitios de unión de proteínas/ligandos***

Muchos procesos biológicos como la transducción de señales, la regulación celular y la respuesta inmune, involucran la unión proteína/ligando. La identificación y caracterización de los sitios de unión a proteínas para moléculas pequeñas son cruciales para comprender las funciones tanto de los ligandos endógenos como moléculas similares a fármacos [Guo *et al.*, 2015].

Las propiedades fisicoquímicas más importantes implicadas en el reconocimiento molecular son las características electrónicas y estéricas, que permiten que un ligando biológicamente activo interactúe con su receptor diana [Görbitz, 2018].

Las interfaces son regiones localizadas de superficies con diferentes propiedades fisicoquímicas en comparación con el resto de las superficies, lo que impulsa la unión a otras moléculas [Sowmya y Ranganathan, 2015]. Las características físicas y químicas (incluida la hidrofobicidad, las interacciones electrostáticas, la energía de unión, el tamaño de la interfaz, la complementariedad de forma, los grupos químicos de aminoácidos y los grupos de residuos conservados) rigen la formación de interfaces de proteínas [Jones y Thornton, 1996; Lo Conte *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1987; Saha *et al.*, 2006].

Debido a su importancia, las interfaces de proteínas y los sitios de unión a ligandos han sido el foco de muchos estudios computacionales [Gao y Skolnick, 2012]. A continuación, se describirán algunas de las propiedades que participan en la formación de interfaces de proteínas y sitios de unión a ligandos.

#### ***1.3.1. Propiedades estéricas***

Las propiedades estéricas están relacionadas principalmente con la disposición espacial 3D de moléculas [Hlavacek *et al.*, 1999]. Para satisfacer el requisito de una

ubicación espacial específica en la cavidad del receptor (es decir, que se ajuste al receptor), las características estéricas adecuadas en la interfaz son esenciales para las moléculas bioactivas, incluidos los fármacos [Caballero *et al.*, 2016]. Las influencias estéricas incluyen la contribución intramolecular de sustituyentes, volumen molecular, tamaño, forma, disposición espacial y atributos conformacionales específicos [Sonnet y Virga, 2008].

### ***1.3.2. Propiedades electrónicas***

La interacción farmacológica implica varios atributos electrónicos para establecer la unión con el sitio de interacción, ya que los receptores biológicos pueden comprender aminoácidos que contienen grupos funcionales cargados y polares [Andrews *et al.*, 1984]. Varios tipos de fuerzas de dispersión (formación de complejos de transferencia de carga, interacción iónica, efecto inductivo, enlace de hidrógeno, efecto de polarización, propiedad catalítica ácido-base, etc.) representan las características electrónicas [Shashikala *et al.*, 2019].

### ***1.3.3. Potencial electrostático de superficie molecular.***

Dada su importancia, la superficie electrostática se ha utilizado para estudiar la similitud en proteínas [Náray G.,1993; Dong y Zhou, 2006; Długosz y Trylska, 2008]. Utilizando la correlación de potenciales electrostáticos como medida cuantitativa, se ha demostrado la complementariedad electrostática entre las interfaces proteína/proteína y proteína/ligando [McCoy *et al.*, 1997; Chau y Dean, 1994]. En general, se acepta que existe un alto grado de complementariedad en forma y electrostática entre un ligando y su receptor [Muchmore *et al.*, 2006]. Esto implica que las moléculas con forma y propiedades electrostáticas similares pueden unirse al mismo receptor [Armstrong *et al.*, 2010; Voet *et al.*, 2013].

### ***1.3.4. Área polar y no polar del receptor***

La naturaleza química de los residuos que forman una interfaz de proteínas (composición de residuos de aminoácidos) determina el efecto hidrofóbico de una interfaz

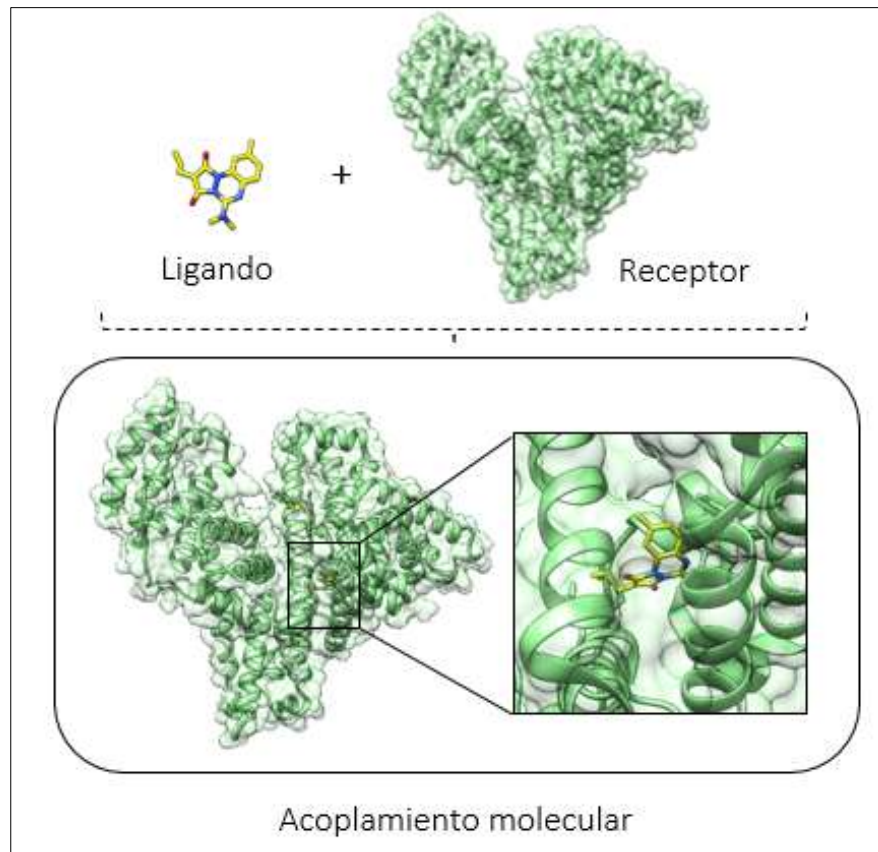
[Young *et al.*, 1994]. Se observa que los residuos no polares (o hidrófobos) se producen predominantemente en la interfaz de la proteína, desempeñando un papel importante en la contribución a la fuerza impulsora para la unión [Ma *et al.*, 2003]. Sin embargo, en un número considerable de complejos, también se observa que las interacciones polares contribuyen en gran medida a la formación de una interfaz estable [Wong *et al.*, 2013]. Por lo tanto, a menudo es esencial estudiar la diferencia relativa en la polaridad de la superficie y la interfaz de cada complejo receptor/ligando, para determinar las principales fuerzas de unión en la interfaz y determinar sus características discriminatorias [Sowmya *et al.*, 2011].

Hoy en día, los estudios *in silico* son una herramienta indispensable para el estudio de las IRL en otros complejos biológicos, mediante el uso de técnicas computacionales de dinámica molecular, acoplamiento molecular (conocido como “*docking*”), modelado *in silico*, entre otras [Chahal *et al.*, 2019]. En esta investigación, nos adentraremos en el AM automatizado.

#### **1.4. Acoplamiento molecular**

Un método ampliamente utilizado en el estudio y la predicción del reconocimiento molecular es el AM, el cual es fundamental en la predicción y la racionalización de la base estructural de las IM biológicas y químicas entre las moléculas [Shoichet, 2004; Morris y Lim-Wilby, 2008].

El AM es un método computacional que determina la posición y conformación de una ó más moléculas para predecir las IRLs a escala atómica, c. f. *Docking* [Yuriev y Ramsland, 2013; Vipin *et al.*, 2006], siendo una herramienta que permite el estudio de procesos biológicos fundamentales [McConkey *et al.*, 2002]. Es decir, predice parámetros relevantes en la interacción: (i) la conformación y orientación del ligando en el sitio de unión del receptor; así como (ii) la estimación de la energía libre de unión, que representa la potencialidad de unión [Alberg y Schreiber, 1993; Diller y Merz, 2001]. En la Figura 5, se representa el modo de unión de la IRL.



**Figura 5.** Representación del modo de unión del complejo ligando/receptor. Albúmina de suero humano en complejo con azapropazona (PDB: 2BX8). Tomada y modificada de Torres et al., 2019.

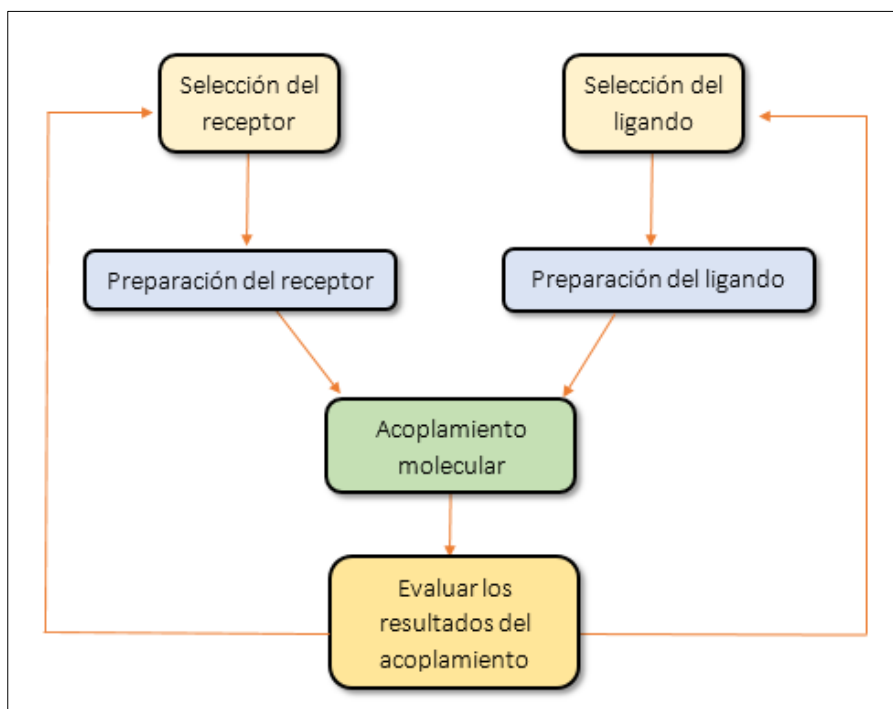
Según los tipos de ligando, el acoplamiento se puede clasificar como [Morris y Lim-Wilby, 2008]:

- Acoplamiento proteína/molécula pequeña (ligando)
- Acoplamiento proteína/ácido nucleico
- Acoplamiento proteína/proteína

Hasta la fecha, la herramienta de acoplamiento molecular más utilizada es el acoplamiento ligando-proteína debido a sus diversas aplicaciones en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Además, representa un sistema más simple en comparación con los otros problemas de acoplamiento [Muegge y Rarey, 2001; Böhm y Klebe, 1996].

El proceso general del AM (Figura 6), se puede dividir en tres partes principales: 1) preparación del ligando y la macromolécula. Esto se hace basado en campos de fuerza que permiten la representación de superficies y cavidades como sitios potenciales de ligandos [Halperin et al., 2002]; 2) definir el tipo de ataque: rígido o flexible [Agarwal y

Mehrotra, 2016] y 3) establecer la estrategia de búsqueda de las conformaciones del ligando: sistemáticas o estocásticas [Dos Santos *et al.*, 2018].



**Figura 6.** Diagrama general del acoplamiento molecular IRL convencional. Se muestran los pasos clave en los AMs. Tomada y modificada de Morris *et al.*, 2008.

El acoplamiento molecular tiene una amplia variedad de aplicaciones: generación de moléculas de importancia industrial, descubrimiento de nuevos fármacos, estudios de relación estructura-actividad, optimización de ligandos, determinación de residuos clave en funciones biológicas específicas “hot spots” en proteínas para facilitar estudios en mutagénesis, desarrollo de métodos auxiliares en estudios y elucidación en CRX, estudios de mecanismos moleculares y diseño de bases de datos, entre otros [Morris y Lim-Wilby, 2008; Yuriev y Ramsland, 2013; McConkey *et al.*, 2002; Tripathi *et al.*, 2007].

En la actualidad, existe una variedad de programas que realizan acoplamiento molecular y su número ha ido incrementando debido a la alta demanda de estudios *in silico* que requieren predicciones IRL [Prieto-Martínez *et al.*, 2018; Diller y Verlinde, 1999; Pagadala *et al.*, 2017]. Cada herramienta utiliza diferentes campos de fuerza y algoritmos para la generación de posiciones y conformaciones, el refinamiento y el cálculo de las

interacciones receptor/ligando [Ewing *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2011; Salmaso y Moro, 2018]. La Tabla 2 presenta una breve lista de los principales programas de acoplamiento, incluidos sus algoritmos e información general [Prieto-Martínez *et al.*, 2018].

**Tabla 2.** Softwares de AM proteína-ligando y su algoritmo de búsqueda.

Nombre	Algoritmo de búsqueda	Licencia	Referencias
Autodock4	AGL	Académico	1
Dock	CF	Académico	2
Oedocking	CF	Académico	3
Fleksy	BC	Comercial	4
Swissdock	OE	Académico	5
Gold	AG	Comercial	6
Glide	H	Comercial	7
Vina	OL	Académico	8
Rdock	H	Académico	9
Ledock	RS	Académico	10
Plants	OCH	Académico	11
Haddock	H	Académico	12
Surflex-dock	CF	Comercial	13
Moe	H	Comercial	14
Flexx	CF	Comercial	15
Fitted	H	Comercial	16
Ligandfit	CF	Comercial	17
ICM	H	Comercial	18
Igemdock	AE	Académico	19

Algoritmos: AGL (Algoritmo genético lamarckiano), CF (Coincidencia de formas); BC (Basado en conjuntos); OE (Optimización evolutiva); AG (Algoritmo genético); H (Híbrido); OL (Optimización local); RS (Reconocido simulado); OCH (Optimización por colonia de hormigas); AE (Algoritmo evolutivo); Referencias: 1: Morris *et al.*, 2009; 2: Allen *et al.*, 2015; 3: Kelley *et al.*, 2015 y Mcgann, 2011; 4: Nabuurs *et al.*, 2007 y Wagener *et al.*, 2012; 5: Grosdidier *et al.*, 2011; 6: Jones *et al.*, 1997; 7: Friesner *et al.*, 2004; 8: Trott & Olson, 2009; 9: Ruiz-Carmona *et al.*, 2014; 10: Unzue *et al.*, 2016; 11: Korb *et al.*, 2009; 12: Dominguez *et al.*, 2003; 13: Spitzer & Jain, 2012; 14: Vilar *et al.*, 2008; 15: Kramer *et al.*, 1999; 16: Corbeil & Moitessier, 2009; 17: Venkatachalam *et al.*, 2003; 18: Neves *et al.*, 2012; 19: Yang & Chen, 2004.

Los mejores programas utilizados para obtener las mejores puntuaciones en el AM son: AutoDock4, AutoDock Vina, MOE-Dock, FLeX y GOLD, respectivamente [Singh *et al.*, 2017].

AutoDock4 es un programa de AM no comercial utilizado ampliamente en el ámbito científico [Forli *et al.*, 2016; Rizvi *et al.*, 2013]. El cual consta de dos programas principales: i) AutoDock4 que realiza el acoplamiento de un ligando a un conjunto de cuadrículas que describen la proteína objetivo y ii) AutoGrid que calcula previamente las cuadrículas en las que el ligando intentará encajar [Bitencourt-Ferreira *et al.*, 2019; Morris *et al.*, 2009].

Los receptores empleados en esta investigación para los estudios de acoplamiento fueron la albúmina de suero humano y la proteasa principal del SARS-CoV-2. A continuación, se detallan las principales características de cada una de ellas.

### **1.5. Albúmina de suero humano**

Una de las proteínas más estudiadas en interfaces con ligandos es la albúmina sérica humano (ASH), siendo una proteína abundante en el plasma sanguíneo [Fanali *et al.*, 2012; Taguchi *et al.*, 2012]. La ASH es conocida como un receptor silencioso con alta afinidad a muchos fármacos y sustancias tóxicas [Müller y Wollert, 1979; Al-Shabib *et al.*, 2017; Rub *et al.*, 2017]. Los efectos de la ASH en una amplia variedad de IM a ligandos, son puntos críticos en el estudio e investigación en farmacología y toxicología ambiental [Rabbani, 2017; Rodríguez *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2013].

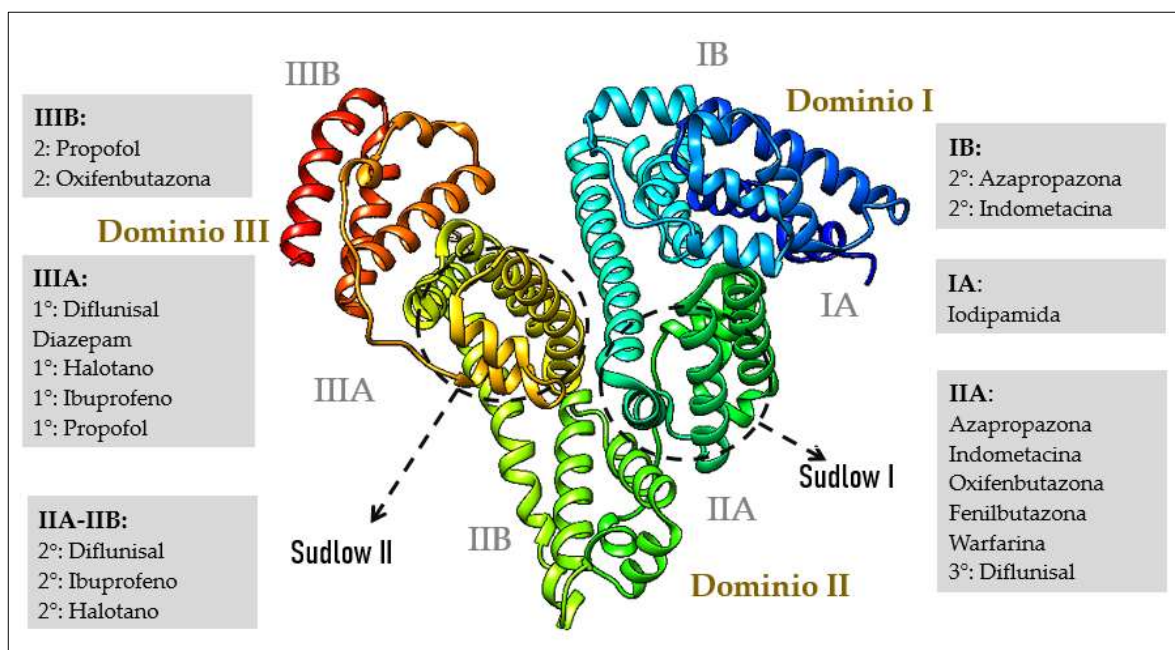
#### **1.5.1 Estructura de la ASH**

La ASH es una proteína globular de  $\approx 66.5$  kDa, compuesta de 585 aminoácidos, en su mayoría  $\alpha$ -helicoidal que consta de tres dominios estructuralmente similares, generalmente indicados como: I (aminoácidos 1–195), II (aminoácidos 196–383) y III (aminoácidos 384–585) [Lee y Wu, 2015]. Los tres dominios de ASH se ensamblan asimétricamente y se asemejan a una forma de corazón. Cada dominio incluye 10 hélices  $\alpha$  que se empaquetan en dos subdominios separados (denominados A y B) que comprenden seis hélices  $\alpha$  (h1–h6) y cuatro (h7–h10), respectivamente; los subdominios están conectados por un bucle extendido largo [Carter y Ho, 1994]. La ASH contiene 35 residuos

de cisteína, y todos ellos, excepto uno, Cys34 (en el dominio I), están involucrados en enlaces disulfuro que estabilizan la estructura [Sudlow *et al.*, 1975].

Dos sitios de unión importantes en la ASH son los sitios Sudlow I y II. El sitio Sudlow I está ubicado en el subdominio IIA y el sitio Sudlow II está ubicado en el subdominio IIIA [Otagiri, 2005].

En la Figura 7, se muestra la estructura de la ASH con sus sitios de unión a diferentes fármacos de acuerdo a evidencia por CRX.



**Figura 7.** Estructura resuelta por CRX de la ASH con sitios de unión a fármacos. Se muestra un resumen de los sitios de unión con sus respectivos fármacos. PDB: 1AO6. Dominios, en café; Subdominios, en gris; Sitios de unión I y II de Sudlow, en Negritas. Estructura en forma de cintas y tiras, en arcoíris; Tomada y modificada de Liu, *et al.*, 2015.

### 1.5.2. Función

La albúmina tiene una variedad de funciones importantes y es responsable del 80% de la presión osmótica coloidal de la sangre [Dockal *et al.*, 1999]. Significativamente, la albúmina puede unirse a diversas moléculas endógenas, incluidos los ácidos grasos de cadena larga, los esteroides, el L-triptófano, etc [Kragh-Hansen, 1981]. También participa en el transporte de iones en la circulación, incluidos el cobre, el zinc, el calcio, etc [Evans, 2002]. Además, puede unirse a compuestos y fármacos exógenos, como warfarina,

ibuprofeno, clorpromazina, naproxeno, entre otros. La afinidad de unión de la ASH afecta significativamente su actividad y vida media [Yang *et al.*, 2014].

## **1.6. SARS-CoV-2**

El virus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2), el cual es el agente etiológico responsable del brote de neumonía viral de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), dio lugar a una pandemia con una tasa de mortalidad estimada del 5% al 6% [Zhu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020]. Actualmente, es uno de los agentes biológicos de importancia de estudio e investigación en las áreas del sector salud, inmunología, biología estructural, farmacología, biología molecular, entre otras [Zhou *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Baud *et al.*, 2020]. En consecuencia, a raíz de la emergencia sanitaria del año 2019, se decidió expandir el trabajo a investigar las IRL de la proteasa principal del SARS-CoV-2 (PPS) que provoca la enfermedad denominada COVID-19. Actualmente, existe evidencia por CRX, RMN y MCE de proteínas virales de dicho agente biológico en interacción con diversos ligandos [Flower *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2020; Liu *et al.*; 2021]. En este estudio, la evidencia estructural de la PPS, nos permitió identificar los “hot spots” clave para una comprensión más clara de su mecanismo de acción que pueda llevar al desarrollo de un fármaco antiviral [Morrow y Zhang, 2012; Grosdidier y Fernández-Recio, 2008; Rosell y Fernández-Recio, 2018].

### **1.6.1. Estructura y función de la proteasa principal del SARS-CoV-2**

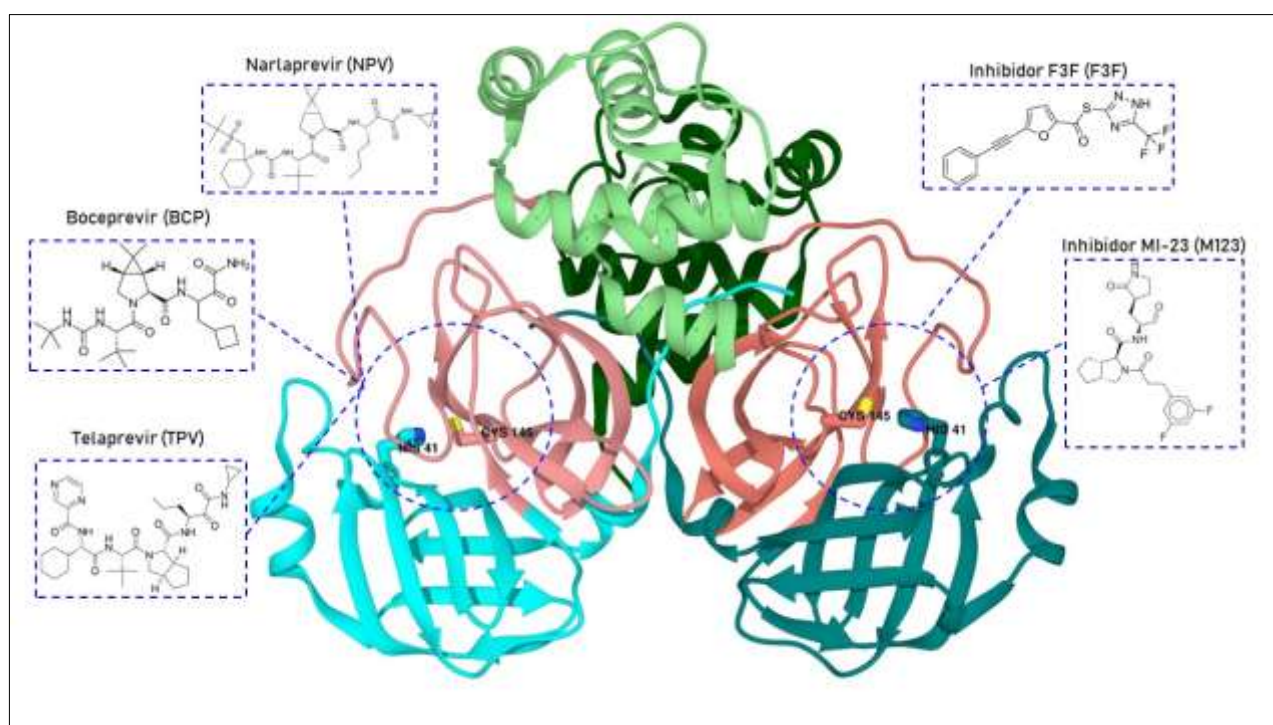
Uno de los objetivos farmacológicos mejor caracterizados entre los coronavirus es la proteasa principal M<sub>pro</sub>, también conocida como 3CL pro [Ullrich y Nitsche, 2020]. Esta enzima juega un papel fundamental en la mediación de la replicación, transcripción y empaquetamiento viral dentro de las células huésped [Naqvi *et al.*; 2020].

La PPS corta exclusivamente secuencias polipeptídicas después de un residuo de glutamina, hasta el momento, no se conocen proteasas de células huésped humanas con esta especificidad de sustrato. Por lo cual, la inhibición de la actividad de esta enzima bloquearía la replicación del virus sin que se produzcan efectos tóxicos [Rut *et al.*, 2020].

La enzima tiene un peso molecular de  $\approx 33,79$  kDa determinado por espectroscopia de masas [Tachoua *et al.*, 2020]. Estructuralmente, la PPS comprende 306 residuos de

aminoácidos que forman un dímero, donde cada protómero (determinados por CRX) se compone de tres dominios: dominio I (residuos 8–101), dominio II (residuos 102–184) y dominio III (residuos 201–303) [Zhang *et al.*, 2020].

Los dominios I y II tienen una estructura de barril  $\beta$  antiparalela; mientras que el dominio III se caracteriza por un grupo de cinco hélices  $\alpha$  y está conectado con el dominio II por medio de una región de bucle largo (residuos 185–200) [Jin *et al.*, 2020]. En la Figura 8, se presenta la estructura resuelta con evidencia estructural por CRX y MCE de sitios de unión a antivirales.



**Figura 8.** Estructura resuelta por CRX de la PPS con sitios de unión a inhibidores experimentales. Se muestra un resumen de los sitios de unión de la PPS con ejemplos de moléculas antivirales, PDB: 6WQF [Du *et al.*, 2020]; Los dominios I–III se muestran en cian, salmón y verde, respectivamente en donde los colores claros y oscuros representan a las cadenas A y B, respectivamente; Los círculos con bordes intermitentes azules muestran los sitios de unión con ejemplos de residuos de unión a H41 y C145.

## II. ANTECEDENTES GENERALES

Diversos estudios se han enfocado en el AM que realizan varios programas en IRL, para acercarse a una comprensión más detallada para satisfacer el entendimiento de si en realidad el acoplamiento es efectivo a escala atómica en diversos complejos estructurales.

En el año 2002 McConkey, *et al.* estudiaron funciones de puntuación en complejos proteína/ligando en donde determinaron que la pose del ligando más cercana a la estructura resuelta experimentalmente no siempre se identifica como la mejor solución. Además, se han descrito y clasificado los enfoques de acoplamiento y puntuación más populares con respecto a su base metodológica [Coupez y Lewis, 2006].

Por otra parte, Kolb y Irwin, 2009, llevaron a cabo una amplia recopilación de datos extraídos de la literatura de AM, en donde validaron la confiabilidad de posiciones predichas de ligandos en receptores. Además, Castro-Álvarez *et al.*, 2017, evaluaron el rendimiento de algunos programas populares de acoplamiento en la reproducción de IM ligando/receptor en estructuras determinadas por CRX, en donde la mayoría de los programas determinaron posturas óptimas a pesar de la complejidad estructural de los cristales. En adición, Ferreira De Freitas y Schapira en el año 2017, realizaron una recopilación de estructuras de la base de datos de PDB. Además, Berman en el año 2008, generó un estadístico de la frecuencia de las IM a escala atómica entre receptores y ligandos.

Una amplia variedad de proteínas de importancia en diversas áreas de la ciencia han sido el objeto de estudio *in silico* con enfoque en AM.

En 2010, Deeb *et al.* estudiaron las características conformacionales y afinidades de sitios de unión de 94 fármacos a la ASH mediante dinámicas moleculares y AM. Logrando identificar en la ASH, el proceso de reconocimiento y la capacidad para unirse a una gran variedad de ligandos en diferentes sitios.

En adición, Parsekar *et al.*, 2020, reportaron mediante técnicas *in silico* la unión de ligandos con actividad anticancerígena a la ASH y su actividad citotóxica hacia las células

cancerosas HeLa, en donde utilizaron complejos Cu(II)/Zn(II) con una base de Schiff de carbohidrazona como ligando principal. Los resultados mostraron la unión de los complejos a la ASH principalmente en el subdominio IIA (sitio I de Sudlow), exhibiendo una interacción débil en el subdominio IB.

Por otra parte, Peele *et al.*, 2020, evaluaron con dinámicas moleculares y AM, los efectos de 62 compuestos hacia la proteína del SARS-CoV-2 (PDB: 6LU7). Estos hallazgos muestran que las mejores puntuaciones de acoplamiento fueron para lopinavir, amodiaquina y teaflavina digallato. Además, Marinho *et al.*, 2020 realizaron cribado virtual y AM para identificar posibles inhibidores del SARS-CoV-2. En donde los resultados demuestran que todos los inhibidores tienen afinidad al mismo sitio de unión enzimático, específicamente en el dominio III de la PPS del SARS-CoV-2

En el laboratorio de Simulaciones Moleculares Computacionales, nuestro grupo de investigación dirigido por el Dr. Thomas R. F. Scior, se han desarrollado y aplicado métodos computacionales para el estudio de patrones estructurales en sistemas biológicos.

En un estudio *in silico* de proteínas de membrana de canales iónicos, se determinó la participación de interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking a escala atómica para la unión del tolueno al canal Nav1.4, logrando así una mayor comprensión de su mecanismo de acción teórico [Scior T. *et al.*, 2009]. Posteriormente, en una investigación continua a Nav1.4, se extendió el alcance de esta metodología mediante AM para examinar los posibles sitios de unión de primaquina al canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.4, y su participación en la modulación [Scior T. *et al.*, 2011]. En sistemas biológicos de mayor complejidad, Scior *et al.*, 2015, realizó AM de la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa con derivados sintéticos de nitazoxanida con el fin de diseñar derivados con mayor potencia [Scior T. *et al.*, 2015].

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente estudio tiene como enfoque determinar hacia que interacciones electrónicas y estéricas tiende a resolver la posición y conformación del ligando el programa de AM considerando el área SAS en la interfaz, el cual es un parámetro que no está incluido en los programas de AM y es fundamental en interfaces de biomoléculas, lo que nos lleva a la siguiente pregunta:

¿Qué parámetros electrónicos y estéricos indirectos de acuerdo al área enterrada SAS están implicados en el reconocimiento molecular realizado por el programa? (ii) ¿Hacia qué tipo de enlaces y superficies el programa resuelve el AM indirectamente considerando que no está integrada la función del reconocimiento de la superficie molecular SAS?

Determinar las interacciones electrónicas y estéricas que el programa de AM resuelve yuxtaponiendo la posición y conformación del ligando en la cavidad del receptor hacia superficies SAS, implicaría determinaciones moleculares que ocurren entre dos estructuras en contacto con un disolvente formando una superficie SAS. Dicho parámetro, es importante, fundamental y necesario para explicar una interfaz entre biomoléculas, que podría brindar a nuevos usuarios una nueva perspectiva del AM y hacia que interacciones electrónicas y estéricas SAS tiende a yuxtaponer la posición y conformación del ligando, la cual podría contribuir en la toma de decisiones del usuario en la fase experimental del AM y podría considerarse como un parámetro fundamental incluido en diferentes programas que emulan interfaces entre biomoléculas.

## IV. JUSTIFICACIÓN

En esta era posgenómica, la investigación se centra cada vez más en la proteómica. Los esfuerzos experimentales y computacionales se dedican a la generación y análisis a gran escala de información derivada de estructuras 3D y dinámica de proteínas, con el objetivo de lograr un avance científico y comercial en el descubrimiento de fármacos [Maggio y Ramnarayan, 2001; Abagyan y Totrov, 2001]. Durante los últimos años, dos líneas principales de investigación condujeron a una transición en el paradigma de nuestra comprensión de estos fenómenos importantes: (i) en el campo de la cristalografía de rayos X se determinaron estructuras de muchos complejos ligando/receptor; (ii) la evolución del software trascendió en una amplia variedad de técnicas computacionales *in silico* para la predicción de IM que permitieron realizar estudios estructurales a nivel molecular [Bongrand, 1999; Sousa, 2013]. En biología, las moléculas se acoplan e interactúan para permitir la perpetuación de la logística primordial de los organismos vivos. Pueden usarse metodologías de AM e identificar la interacción entre un ligando pequeño y una molécula diana para determinar si podrían realizar una función biológica en combinación en el sitio de unión. La comparación de moléculas similares a fármacos o incluso fragmentos de las moléculas originales en el AM en proteínas, permiten calcular un conjunto de candidatos destacados con los valores enumerados. Interesantemente, se puede explorar un amplio espectro de IM de unión molecular con esta técnica, que incluyen lípido/proteína, lípido/lípido, enzima/sustrato, fármaco/enzima, fármaco/ácido nucleico, proteína/ácido nucleico, ácido nucleico/ácido nucleico, fármaco/proteína y proteína/proteína, con funciones clave en cada etapa biológica o bioquímica molecular, así como en el acoplamiento estructural [Hedger y Sansom, 2016; Hernández-Santoyo, 2013].

El análisis de las puntuaciones de unión en el reconocimiento entre moléculas se considera un aspecto fundamental para la explicación de los procesos biológicos. El enfoque del AM *in silico* en el reconocimiento molecular busca la optimización de este proceso, no solo en términos de técnicas sino también en términos de tiempo y recursos económicos. Por ejemplo, no existe un microscopio con un poder de resolución suficiente para capturar una

imagen dinámica a nivel molecular (en tiempo real). Por lo tanto, se pueden utilizar enfoques teóricos y computacionales para predecir la mejor unión y las trayectorias más probables, las cuales son técnicas más rápidas y eficientes a diferencia de los enfoques *in vitro*, en los que el examen de cada proteína sintetizada y purificada puede tener un mayor costo de tiempo y material. En promedio, la investigación *in vitro* tradicional puede tardar aproximadamente una década en completarse y puede costar millones de dólares, en donde los métodos *in silico* reducen considerablemente estos valores [Lavecchia y Di Giovanni, 2013].

Desde 1975, el desarrollo de la CRX de purificación de proteínas de alta resolución y la RMN ha continuado avanzando, contribuyendo predominantemente a una mejor comprensión de los detalles estructurales de las macromoléculas y complejos con ligandos [Wishner *et al.*, 1975].

El AM, tiene la ventaja de trabajar con moléculas que están ausentes de las bases de datos, ya que se pueden modelar utilizando una o varias estructuras similares para construir una nueva salida quimérica que pueda imitar la molécula original [Alberg y Schreiber, 1993]. Mientras que el AM ha surgido como la forma más práctica de usar las estructuras 3D de proteínas para el descubrimiento de ligandos, un historial inconsistente plantea preguntas sobre qué tan bien funciona realmente el acoplamiento. Un número creciente de publicaciones informan del descubrimiento exitoso de nuevos ligandos, a menudo respaldados por datos de afinidad experimentales y validaciones por varios programas. Sin embargo, pocos informes prueban realmente las hipótesis estructurales subyacentes que plantea el acoplamiento. Para tener éxito y no solo suerte, el acoplamiento prospectivo no solo debe clasificar un ligando verdadero entre los compuestos con mayor puntuación, sino que también se debe orientar correctamente al ligando para que la puntuación que reciba sea biofísicamente sólida. Si no se predice la pose de unión correcta, un analista bien podría inferir que el descubrimiento de la pose del ligando en el AM fue exitoso. La escasez de pruebas experimentales de poses teóricamente predichas socava la confianza en una técnica que se ha vuelto ampliamente aceptada. Por supuesto, resolver una estructura cristalina no siempre es posible, e incluso cuando lo es, puede suponer mucho trabajo y no es fácilmente accesible para todos los grupos. Incluso, los investigadores optan por centrarse mejor en el

descubrimiento de una determinación estructural (e. g. ERX, RMN, MCE) que una predicción estructural por AM errónea.

*Autock 4* es un programa gratuito y uno de los más utilizados para estudios de AM [Morris *et al.*, 2009; Bitencourt-Ferreira *et al.*, 2019]. A pesar de la fiabilidad del programa, la importancia de la precisión del software y el entendimiento de como el programa elige la IRL es fundamental para el investigador en la toma de decisiones que puedan cambiar drásticamente la dirección del enfoque de estudio.

El AM sigue siendo un desafío incluso para los expertos y al no comprenderlo a profundidad se pierde la oportunidad de mejorarlo. En otras palabras, no se establece con claridad como realmente el AM funciona por razones correctas determinadas por algoritmos. Lo que conduce a la siguiente pregunta: *¿Cómo el AM computarizado predice correctamente la unión de ligandos a receptores?*

Para obtener datos confiables, el AM automatizado debe ser capaz de predecir la unión real del ligando dentro del sitio activo del receptor mediante el reconocimiento de las IM físico-químicas a nivel atómico, i. e. la herramienta *in silico* debe predecir la conformación y posición del ligando que se presentan en la IRL de la misma forma que en las estructuras determinadas experimentalmente.

Una posibilidad en el AM, es que el programa determine otros parámetros que subyacen en la puntuación lo que da origen a un fenómeno dentro del AM, tales como son los efectos estéricos en la IRL, los cuales hacen referencia a la forma y al volumen que podrían estar influyendo en la detección de la IRL. Es por ello, que se asume que los parámetros de puntuación del AM determinen de manera indirecta las características quimiométricas de la posición y acomodo espacial del ligando al sitio de unión del receptor de tal manera que el ligando se oriente hacia los siguientes parámetros electrónicos y/o estéricos:

(i) Electrónicos: el ligando se orienta hacia ciertos tipos de enlaces (e. g. enlaces  $\pi$ - $\pi$  stacking), superficies más electropositivas y electronegativas del PES, así como una tendencia a ciertas cargas parciales de los átomos de los residuos en el sitio de unión del receptor.

**(ii)** Estéricos: el ligando se ajusta hacia ciertas magnitudes de superficie de interfaz de contacto, volumen que ocupa el ligando en la cavidad, así como el volumen que forma el ligando con su configuración espacial.

Cabe resaltar que el enfoque de este trabajo no se encuentra dirigido hacia el desempeño de ningún programa computacional (benchmarking), en términos simples: el fenómeno investigado son los criterios indirectos de reconocimiento del programa, ya que los algoritmos que utiliza se enfocan en la detección por parámetros de puntuación tales como la energía de unión (valor negativo de  $\Delta G$  de U totales en kcal/mol).

En esta investigación se consideraron los siguientes objetos de estudio:

**(i)** ASH: La ASH es una proteína acarreadora de fármacos ampliamente estudiada, debido a que tiene un número limitado de sitios de unión de alta afinidad, la información molecular detallada sobre estos sitios es muy útil en la evaluación de los efectos cooperativos de la unión de ligandos. Sabemos, que la información estructural de los sitios de unión de alta y baja afinidad es útil al diseñar nuevos fármacos. Por lo que dicha proteína ha sido ampliamente estudiada en IRLs, por ello es un excelente candidato para llevar acabo la experimentación *in silico*, debido al amplio rango de interacciones que ocurren en dicho receptor. Además, existe una amplia gama de estructuras de cristal en interfaz con ligandos en la base de datos de PDB.

**(ii)** PPS: El SARS-CoV-2, es el agente etiológico responsable del brote de neumonía viral de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), en donde actualmente sus proteínas virales presentan alta demanda en investigación para desarrollar nuevas vacunas. Existe suficiente evidencia cristalográfica para realizar AM con nuevos antivirales en dichas proteínas y posiblemente definir nuevos sitios de unión con moléculas previamente estudiadas.

**(iii)** AD4: AD4, es el programa de acoplamiento con mayor uso en el ámbito científico. Además, su disponibilidad es gratuita para los usuarios académicos, por lo que este programa se ha convertido en una primera opción que, en consecuencia, ha contribuido a su uso generalizado.

Finalmente, a través de este estudio se busca contribuir con información que permita comprender y mejorar las técnicas de acoplamiento molecular *in silico*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. *Objetivo general*

- Identificar los efectos electrónicos y estéricos de las IRLs en el AM *in silico* y experimental para comprobar el fenómeno del acoplamiento molecular.

### 5.2. *Objetivos específicos*

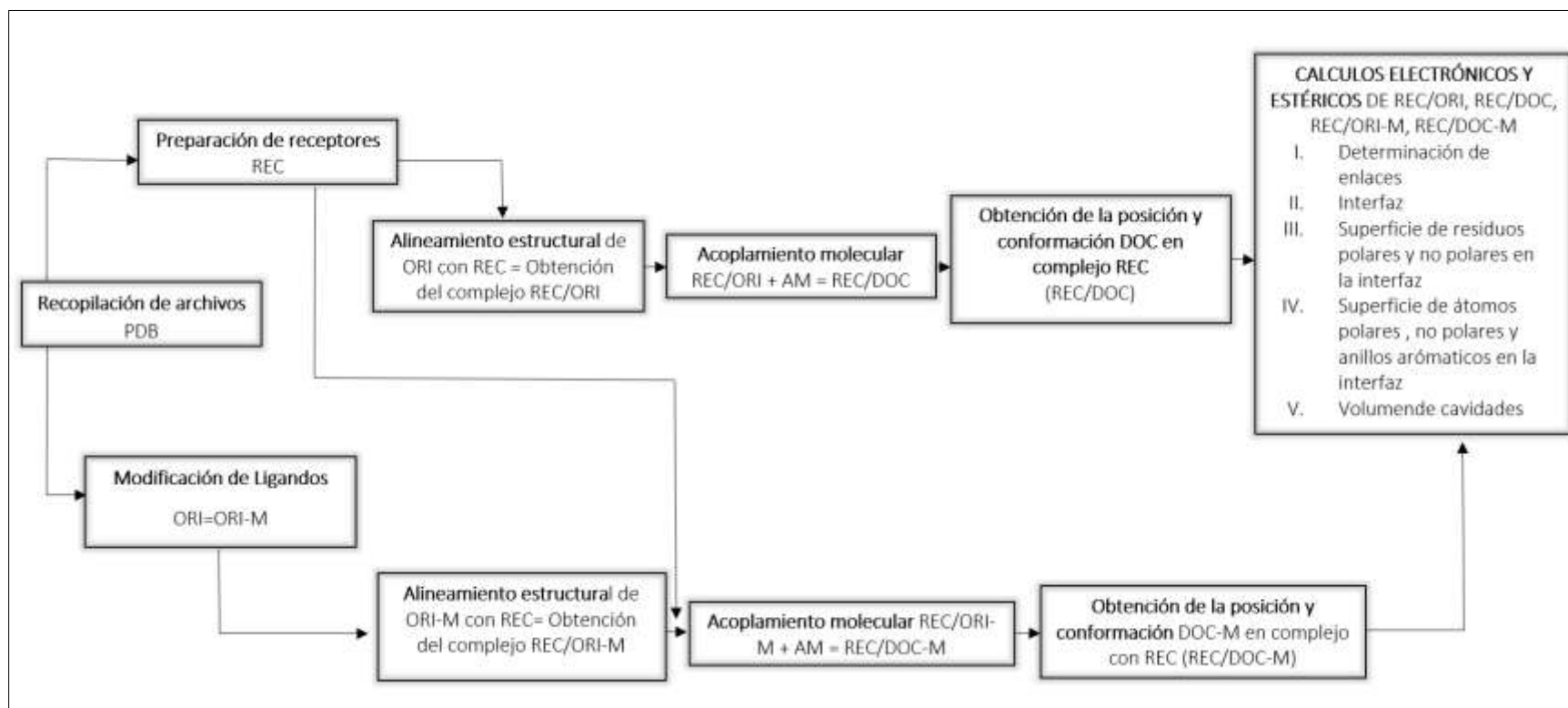
- Identificar las IM de las IRL simuladas *in silico* y determinadas experimentalmente para comprobar el fenómeno del acoplamiento molecular electrónico.
- Calcular el área enterrada SAS y el área de superficie que forman la interfaz de los componentes moleculares en la cavidad de los receptores (residuos polares y no polares, átomos polares (N, O, S), carbonos, átomos de anillos de residuos aromáticos) y volúmenes en la IRL en el AM *in silico* y estructuras determinadas experimental para comprobar el fenómeno del acoplamiento molecular estérico.
- Efectuar la fragmentación de ligandos para realizar simulaciones de AM para corroborar los fenómenos de acoplamiento molecular electrónico y estérico.
- Determinar residuos clave que forman patrones de interacción de acuerdo al área de interfaz enterrada SAS en las IRL.

## **VI. HIPÓTESIS**

La determinación de las contribuciones electrónicas y estéricas en las IRL del AM *in silico* y experimental elucidada el fenómeno del AM.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 9 presenta el diagrama de la metodología que resume los pasos detallados que se presentan en los siguientes apartados.



*Figura 9. Diagrama de la metodología utilizada para realizar el AM, cálculos electrónicos y estéricos.*

## 7.1 Recopilación de estructuras en formato PDB

Se realizó una exploración de ligandos unidos a ASH y a PPS, las cuales se descargaron del banco de datos de proteínas RSCB PDB (<http://www.rcsb.org/>). Las estructuras cristalográficas fueron recopiladas y almacenadas considerando estructuras de resolución menor a 3.5 Å, Tabla 3 (c. f. Tabla S1 y S2).

**Tabla 3.** Estructuras determinadas por CRX de ASH y PPS en interfaz con sus respectivos ligandos

Código PDB	Resolución (Å)	Ligando	Sitios de unión
6A7P <sup>1</sup>	2.3	Aripiprazol	IIIA
4Z69 <sup>1</sup>	2.2	Diclofenaco	IB,IIA
4L9K <sup>1</sup>	2.4	Camptotecina	IB
4L9Q <sup>1</sup>	2.7	Tenipósido	IB
4LA0 <sup>1</sup>	2.4	Bicatulamida	IB
4LB2 <sup>1</sup>	2.8	Idarubicina	IB
4LB9 <sup>1</sup>	2.7	Etopósido	IB/IIA
3JQZ <sup>1</sup>	3.3	Lidocaína	IC entre IB y IIIA
2BX8 <sup>1</sup>	2.7	Azapropazona	IB,IIA
2BXB <sup>1</sup>	3.2	Oxifenbutazona	IIA,IIIB
2BXC <sup>1</sup>	3.1	Fenilbutazona	IIA
2BXD <sup>1</sup>	3.0	Warfarina	IIA
2BXE <sup>1</sup>	3.0	Diflunisal	IIIA>IIA-IIIB>IIA
2BXF <sup>1</sup>	3.0	Diazepam	IIIA
2BXG <sup>1</sup>	2.7	Ibuprofeno	IIIA>IIIB
2BXX <sup>1</sup>	2.4	Indometacina	II A
1E7A <sup>1</sup>	2.2	Propofol	IIIA>IIIB
1E7B <sup>1</sup>	2.4	Halotano	IIIA>IIIB
6WNP <sup>2</sup>	1.5	Boceprevir	SCEPPS
7D1O <sup>2</sup>	1.8	Narlaprevir	SCEPPS
7C7P <sup>2</sup>	1.7	Telaprevir	SCEPPS
2GZ8 <sup>2</sup>	2.0	Inhibidor	SCEPPS
7D3I <sup>2</sup>	2.0	Inhibidor M-123	SCEPPS

<sup>1y2</sup>: Códigos PDB de ASH y PPS, respectivamente; IC: Interdominio central; >: Mayor afinidad a; SCEPPS: Sitio catalítico enzimático de la PPS.

## 7.2 Preparación y optimización de estructuras

### 7.2.1. Receptores

Los archivos PDB obtenidos se prepararon eliminando los residuos como solvente, ligandos y otros componentes de la cristalización, se corrigieron los errores moleculares como ausencia de átomos con el conjunto de potencial sp4 de todos los átomos presentes en la estructura [Stewart, 2013]. Los parámetros de generación de carga se tomaron de

[Stewart, 2013]. Los nuevos átomos se construyeron utilizando el algoritmo *Kohonen* [Zampighi *et al.*, 2004] y las características de construcción de las estructuras analíticas, se prepararon y minimizaron con gradientes conjugados. El algoritmo multipolar rápido de amortiguación se utilizó para los términos de largo alcance en los potenciales no enlazados y electrostáticos, de modo que no se empleó ningún radio de corte de acuerdo a [Robert C., 2004] y se modificaron tipos de enlaces [Ho *et al.*, 2008]. A los archivos preparados, se les añadió hidrógenos con un algoritmo modificado exclusivo para proteínas con correcciones para histidinas a pH 7 [Pedretti *et al.*, 2016]. Se asignó el campo de fuerza con el algoritmo CHARMM y Gasteiger para cargas parciales los cuales se modificaron y editaron en un script para proteínas, se añadieron energías de minimización con dinámicas moleculares aplicando restricciones a regiones específicas por el algoritmo modificado de acuerdo a [Talarico *et al.*, 2020].

### **7.2.2. Ligandos**

Los ligandos se guardaron en archivos individuales a partir de los PDB obtenidos del apartado 7.1, se les aplicó la corrección de su estructura molecular de acuerdo al apartado 7.2.1 descrito para proteínas, sin modificar su posición y conformación nativa de la estructura cristalográfica, los cuales se nombraron como ligandos ORI. En detalle, algunos grupos de los ligandos como grupos de hidroxilo, tiol, amidas secundarias y anillos aromáticos, los cuales fueron reorganizados para optimizar la simetría correcta [Shivakumar *et al.*, 2010].

### **7.3. Determinación del sitio de unión**

Se definió el sitio de acoplamiento para cada receptor en interfaz con su respectivo ligando ORI, utilizando un algoritmo escrito en Phyton [Van Rossum & Drake, 1995] en interfaz con Chimera Alpha 1.14 [Pettersen *et al.*, 2004] (véase Material suplementario, sección 11.3), el cual calcula el centro de la masa de átomos del ligando y el volumen molecular total del ligando. A partir de dichos parámetros se obtuvieron las dimensiones (x, y, z) definidas con la selección del ligando y los residuos que participan en la interfaz del área enterrada SAS y se centra en coordenadas (x, y, z) en el centro de la masa de átomos de la selección mencionada.

## **7.4. Simulación del acoplamiento molecular REC/ORI**

### **7.4.1. Minimización de Ligandos ORI**

A los ligandos ORI previamente preparados se les aplicó el algoritmo de campo de fuerza CHARMM, el cual se modificó para halógenos y otros átomos en ligandos con simetrías irregulares y estructuras conocidas de acuerdo a [Sastry *et al.*, 2013]. Se utilizó el algoritmo de boltzman-jump para generar nuevas posiciones atómicas mediante un generador de coordenadas analíticas para todos los ligandos elegidos en las estructuras analizadas [Zhou y Berne, 1997] véase Tabla 3, seguido de la minimización de gradientes conjugados.

### **7.4.2. Acoplamiento molecular REC/ORI**

Las simulaciones del AM, se realizaron utilizando el programa AutoDock 4.0. [Morris *et al.*, 2009] agregando el campo de fuerza PARSE, se tomaron los archivos previamente preparados (apartado 7.2), a los cuales se les removieron los hidrógenos no polares. A los archivos de los ligandos, se les asignaron enlaces rotables. Para la emulación de la posición y conformación de los ligandos, se utilizó el algoritmo *Genetic Algorithm Lamarckian* [Morris *et al.*, 1998]. Se generaron los mapas de interacción en el sitio de unión de los receptores y se obtuvo la mejor posición y conformación del ligando de acuerdo a criterios del investigador considerando el mejor clúster por menor energía de interacción en kcal/mol, mayor número de interacciones por grupo y mayor similitud a la posición ORI en la CRX, en donde a las posiciones y conformaciones del ligando predichas por el programa de AM se les agregó la nomenclatura de ligandos DOC. Por lo tanto, las interfaces entre los receptores (REC) y los ligandos se definen como REC/ORI (complejo estructural R/L determinado por CRX) y REC/DOC (proteína determinada por CRX en interfaz con la posición y conformación predicha por el programa de AM y elegida por el usuario DOC).

## **7.5. Determinación de propiedades fisicoquímicas de interfaz en las C-R/Ls**

### **7.5.1. Emulación e identificación de enlaces en la interfaz de REC/ORI y REC/DOC**

Los enlaces se emularon, identificaron, clasificaron y analizaron de acuerdo a [Ekins et al., 2009](#) y [Zakaria et al., 2020](#).

En este estudio, se empleó el paquete de emulación BIOVIA V21.1.0.20298, el cual se utilizó para determinar las interacciones moleculares en las IRL (BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Workbook, Release 2020; BIOVIA Pipeline Pilot, Release 2020, San Diego: Dassault Systèmes, 2021).

### **7.5.2. *Calculo de superficies y volúmenes en la interfaz de REC/ORI y REC/DOC***

#### **7.5.2.1. *Superficies de interfaz de las C-R/Ls***

Las superficies de interfaz de los complejos REC/ORI y REC/DOC se emularon y calcularon mediante scripts (véase apartado 11.3) de acuerdo a [Villa-Diaz et al., 2020](#), que consisten en área enterrada SAS, área polar y no polar de residuos, área de átomos polares, no polares y anillos aromáticos.

#### **7.5.2.2. *Volúmenes que se forman en la interfaz de las C-R/Ls***

El volumen total de interfaz que se forma entre la SES de los ligandos ORI y las superficies SES de las cavidades se emuló y calculó mediante el programa SurfNet [[Laskowski R. A., 1995](#)] y el volumen de interfaz del solvente con un radio de sonda de 1.4 Å equivalente a una molécula de agua se emuló y calculó mediante el software Cavern 2.0 [[Petrek et al., 2006](#)].

### **7.5.3. *Identificación de residuos en la interfaz de REC/ORI y REC/DOC***

A los complejos REC/ORI y REC/DOC se les emularon e identificaron los residuos que forman el área enterrada SAS en las interfaces de los ligandos en las cavidades mediante el script (c. f. apartado 11.3), los cuales se clasificaron como polares, no polares, cisteínas, cargados positivos y cargados negativos. Además, se analizaron patrones de interacción entre los complejos estructurales, en donde se identificaron residuos específicos que interaccionan con los ligandos analizados.

## **7.6. *Modificación de ligandos ORI***

Utilizando el software CCP4 molecular graphics project [Potterton *et al.*, 2002], se llevó a cabo la modificación de ligandos ORI para las simulaciones por AM y determinaciones de interfaz en donde cada ligando se modificó de acuerdo a los resultados del acoplamiento molecular a criterio del investigador, nombrándolos como ORI-M (posición y conformación del ligando ORI en el complejo resuelto por CRX (REC/ORI) con modificaciones en los átomos del ligando). Todas las estructuras ORI-M se prepararon de acuerdo al apartado 7.2.2. Posteriormente, se posicionaron en las mismas coordenadas espaciales de acuerdo a los complejos REC/ORI.

### **7.7. Acoplamiento molecular REC/ORI-M**

Los ligandos ORI-M previamente preparados se minimizaron por gradientes conjugados de acuerdo al apartado 7.4.1 y se realizó la simulación del acoplamiento molecular mediante el programa AutoDock4 v4.2.6 [Morris *et al.*, 2009] de acuerdo al apartado 7.4.2. La mejor posición y conformación predicha del ligando ORI-M por la simulación del AM elegida a criterio del investigador de acuerdo al apartado 7.4.2, se le asignó la nomenclatura de DOC-M.

### **7.8. Determinación de propiedades fisicoquímicas de interfaz en las C-R/L-Ms**

A los complejos REC/ORI-M y REC/DOC-M se les realizó la determinación de enlaces, cálculos de superficie de interfaz, cavidades y residuos que forman la interfaz de acuerdo al apartado 7.5.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

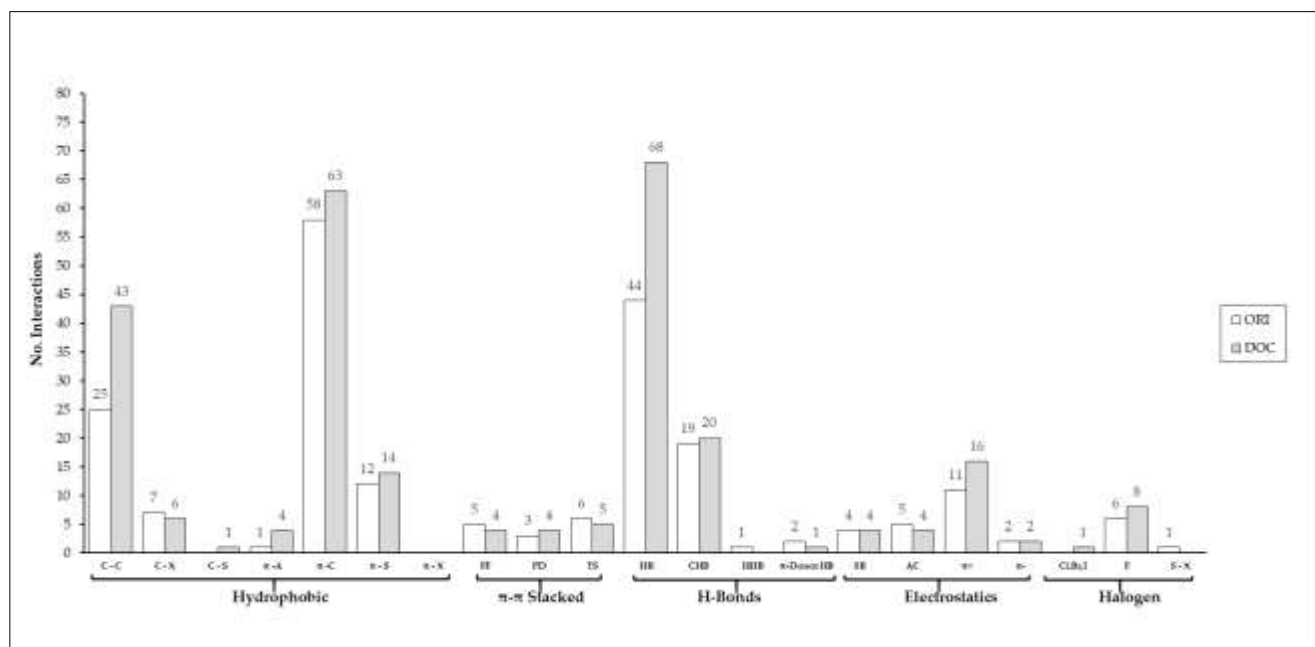
### 8.1. Análisis estructural de enlaces en las C-R/Ls

Actualmente, los biólogos computacionales (*in silico*) enfrentan el desafío de diseñar nuevos fármacos utilizando estructuras determinadas experimentalmente, e. g. CRX, RMN y MCE, mejorando la actividad biológica de los fármacos. Para iniciar un nuevo enfoque en el diseño y desarrollo de fármacos, se necesita la estructura resuelta atómicamente en la interfaz ligando/proteína, específicamente un sitio determinante “hot spot”.

Sin embargo, para analizar los parámetros físicos y químicos que subyacen en la interfaz, tales como volumen, área de interfaz, peso molecular, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, fuerzas de vdW, puentes salinos, entre otros. Se emplean herramientas computacionales las cuales son de menor costo y mayor rapidez que los métodos experimentales, brindando una mayor ventaja en cuanto al número ilimitado de compuestos a analizar [Patil *et al.*, 2010].

Las funciones de puntuación en la mayoría de los programas se utilizan para evaluar los contactos entre los átomos de la proteína y el ligando para cada pose de unión y clasificarlos según sus interacciones no covalentes como enlaces, fuerzas de repulsión y parámetros de solvatación [Koebel *et al.*, 2016].

Las interacciones totales de las estructuras analizadas se muestran en la Figura 10, las cuales se determinaron de acuerdo a un análisis estructural de clasificación de enlaces en todos los complejos analizados, en donde coinciden los patrones de enlaces determinados por Ferreira de Freitas *et al.*, 2017.



**Figura 10.** Interacciones moleculares totales de las C-R/Ls. Enlaces hidrofóbicos: C-C (carbono-carbono), C-X (carbono-halógeno), C-S (carbono-sulfuro),  $\pi$ -A ( $\pi$ -amida),  $\pi$ -C ( $\pi$ -carbono),  $\pi$ -S ( $\pi$ -sulfuro),  $\pi$ -X ( $\pi$ -halógeno); Enlaces  $\pi$ - $\pi$  Stacked: FF (face to face), PD (paralel displace), TS (T-shaped ó edge to face); Puentes de hidrógeno: HB (convencional), CHB (Carbono-hidrógeno), HHB (Halógeno-hidrógeno),  $\pi$ DHB (donador  $\pi$ -hidrógeno); Electrostáticos: SB (puente de sal), AC (carga atractiva),  $\pi$ + ( $\pi$ -Cación),  $\pi$ - ( $\pi$ -Anión); Halógeno: Cl, Br, I, (convencional), F (flúor), S-X (halógeno-sulfuro).

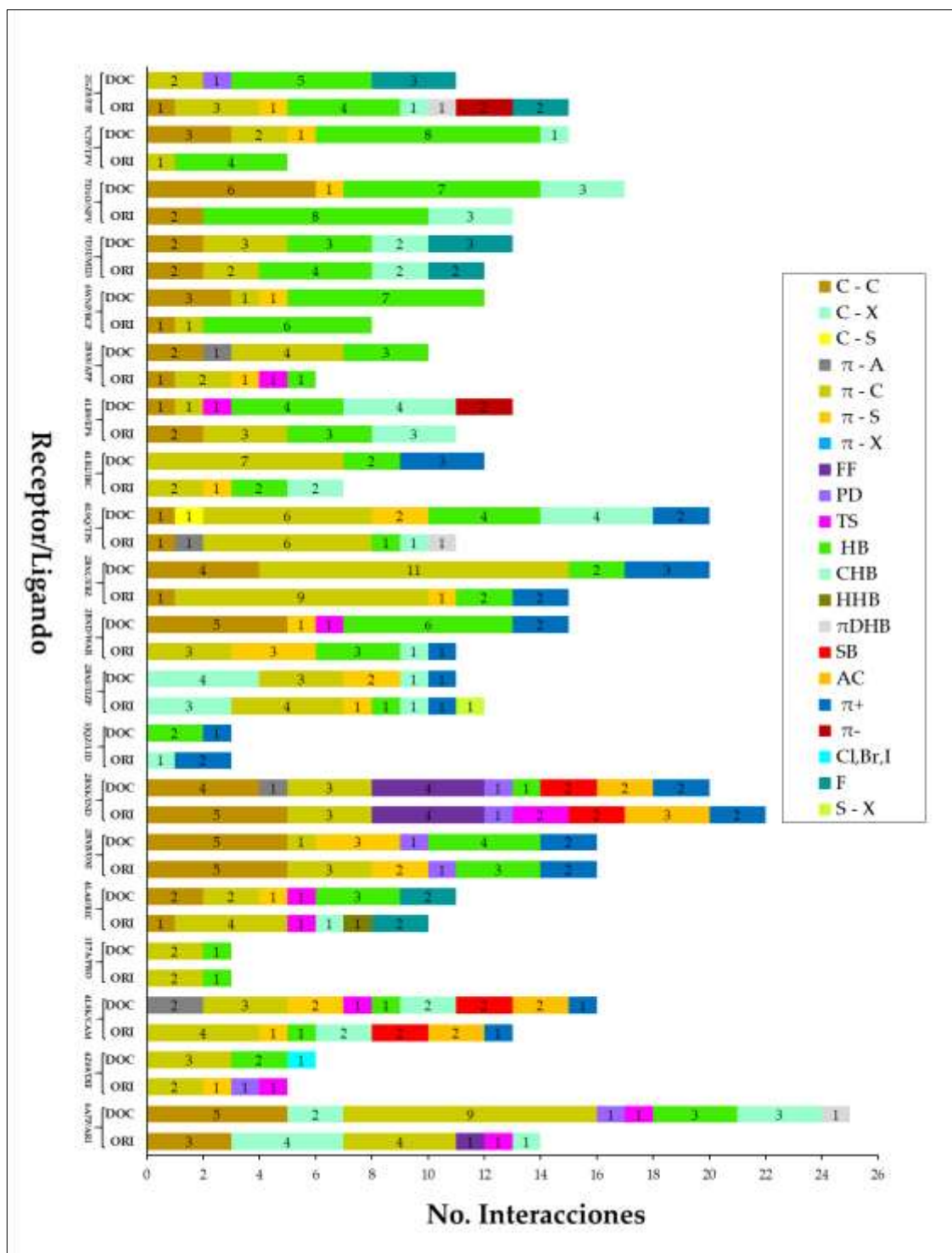
En las IRL, las posiciones y conformaciones de los ligandos ORI y DOC, muestran una predominancia de interacciones hidrofóbicas con un total de 103 interacciones en ORI y 131 interacciones en DOC. El incremento de interacciones hidrofóbicas en DOC se puede atribuir al mayor número de contactos C-C de la SAS del ligando con la SAS de la cavidad de los receptores, en donde DOC presenta mayor área de interfaz que ORI con el receptor (c. f. sección 8.2).

En proteínas, los veinte aminoácidos naturales (abreviados como AA), que se caracterizan por sus cadenas laterales únicas, son los componentes básicos de proteínas y péptidos. En consecuencia, las interacciones entre las cadenas laterales de los AA son los factores dominantes en las interfaces proteicas, reconocimiento del sitio de unión, interacciones: proteína/proteína, proteína/ADN ó ARN, proteína/péptido, proteína/ligando, entre otras. Debido a la diversidad estructural de las cadenas laterales de los 20 AA, las interacciones exhiben contribuciones energéticas y propiedades físicas muy diferentes, que no pueden explicarse simplemente por los tipos de interacciones comunes, como los enlaces

de hidrógeno, interacciones vdW, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. En química de proteínas, los enlaces de hidrógeno tienen energías en el rango de 8 a 30 kJ/mol, las cuales se consideran interacciones fuertes [Xie *et al.*, 2015].

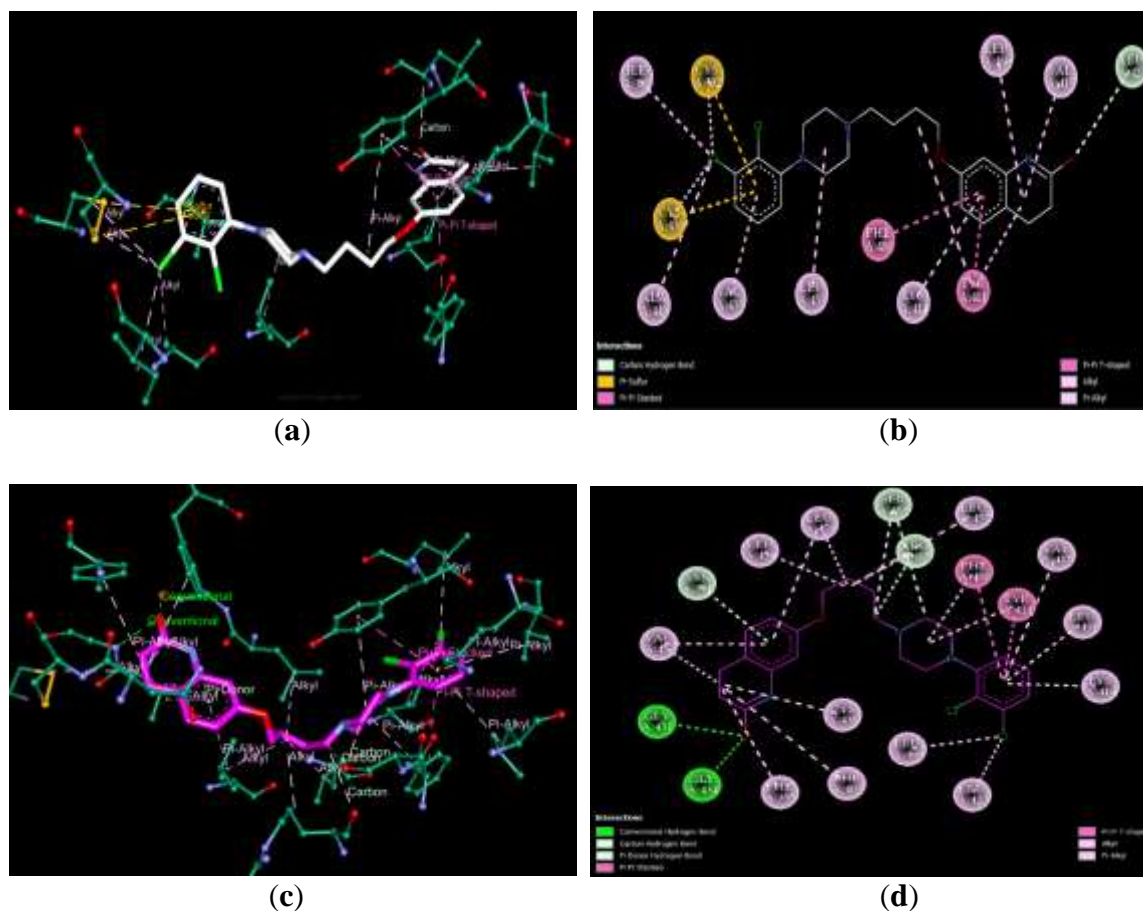
El enlace de hidrógeno juega un papel importante en muchos procesos químicos y biológicos, incluida la unión de ligandos y la catálisis enzimática. La importancia del enlace de hidrógeno en el diseño de fármacos es debido a su fuerte influencia en la especificidad de las propiedades de unión, transporte, adsorción, distribución, metabolización y excreción de moléculas pequeñas. Su ubicuidad y flexibilidad hacen que los enlaces de hidrógeno sean la interacción física más importante en sistemas de biomoléculas en solución acuosa. En consecuencia, tanto desde una perspectiva evolutiva como de diseño, la modificación del potencial de enlace de hidrógeno local es el principal mecanismo disponible para mejorar favorablemente las interacciones entre pares de moléculas [Itoh *et al.*, 2019].

El análisis de interacciones en los complejos estructurales se presenta en la Figura 11, se determinaron un total de 66 y 89 interacciones por puentes de hidrógeno para las interfaces REC/ORI y REC/DOC, respectivamente.



**Figura 11.** Análisis de interacciones moleculares de las C-L/Rs. Enlaces hidrofóbicos: C-C (carbono-carbono), C-X (carbono-halógeno), C-S (carbono-sulfuro),  $\pi$ -A ( $\pi$  - amida),  $\pi$ -C ( $\pi$ -carbono),  $\pi$ -S ( $\pi$ -sulfuro),  $\pi$ -X ( $\pi$ -halógeno); Enlaces hidrofóbicos de apilamientos  $\pi$ - $\pi$ : FF (cara-cara), PD (cara-cara desplazados), TS (en forma de T); Puentes de hidrógeno: HB (convencional), CHB (Carbono-hidrógeno), HHB (Halógeno-hidrógeno),  $\pi$ DHB (puente de hidrógeno-donador  $\pi$ ); Electrostáticos: SB (puente de sal), AC (carga atractiva),  $\pi$ + ( $\pi$ -Cación),  $\pi$ - ( $\pi$ -Anión); Halógenos: Cl, Br, I, (convencional), F (flúor), S-X (halógeno-sulfuro).

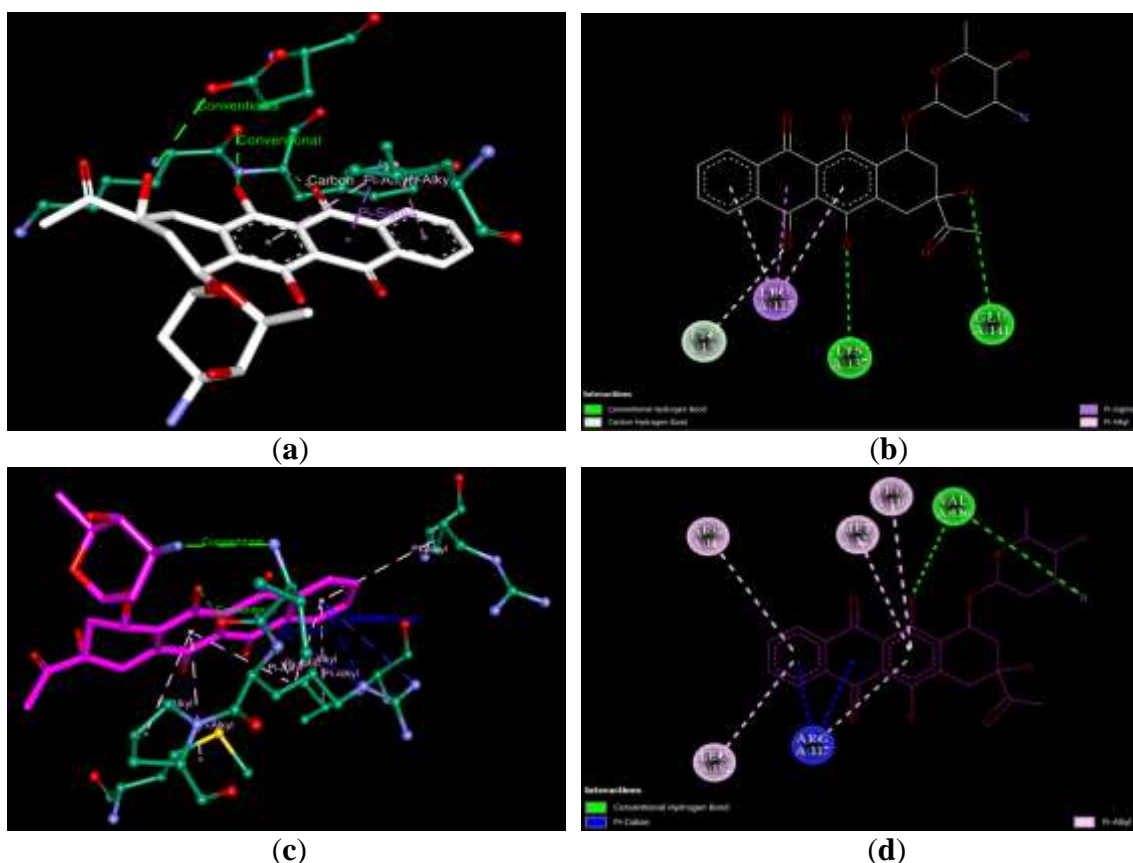
El incremento de puentes de hidrógeno en las interfaces DOC sobre la posición determinada experimentalmente ORI, es debido al algoritmo de la función de puntuación de AD4 [Morris *et al.*, 1998], en donde resuelve la contribución energética donador-aceptor para orientar al ligando principalmente hacia los campos electrostáticos formados por los grupos polares de los AA y en consecuencia a la formación de puentes de hidrógeno [Huey *et al.*, 2007], tal como se muestra en la Figura 12, la cual describe en el complejo ASH/DOC un incremento de puentes de hidrógeno sobre ASH/ORI.



**Figura 12.** Análisis estructural de interacciones de ASH/ARI. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/ARI ORI (PDB: 6A7P); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/ARI DOC; ARI ORI, en blanco; ARI DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.

En la determinación de puentes de sal, no hubo un cambio entre ORI y AD4 en los 20 complejos analizados, Sin embargo, hubo un incremento de enlaces en ASH/DOC para WAR, FBZ, TPS y IBC de interacciones  $\pi$ -catión como se muestra en la Figura 13, en

donde el fármaco IBC en el AM se inclina hacia un grupo guanidinio cargado positivo, en donde dos nitrógenos contribuyen a la formación de enlaces  $\pi$ -catión.



**Figura 13.** Análisis estructural de interacciones de ASH/IBC. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IBC ORI (PDB: 4LB2); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IBC DOC; IBC ORI, en blanco; IBC DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.

La función de puntuación de AD4, calcula las energías electrostáticas que se distribuyen en los átomos polares de la proteína y el ligando. En este sentido, utiliza la ley de Coulomb para realizar los cálculos electrostáticos para orientar el ligando con una energía mínima favorable hacia los componentes electrostáticos polares de la cavidad del receptor. Sin embargo, la función de puntuación del software no está programada para orientar la composición estructural tridimensional del ligando hacia otras interacciones donador-aceptor de importancia relevante en las IRL, tales como puentes de sal, atracciones electrostáticas, interacciones  $\pi$ -anión y  $\pi$ -catión, en donde estos últimos se forman en condiciones a pH 7 con un grupo polar cargado positivo y un anillo aromático hidrófobo (c.

f. sección 1.2.5), las cuales pueden ocurrir con mucha frecuencia en complejos ligando-receptor, debido a que los 8 AA (Arg, Lys, Asp, Glu, Phe, Tyr, Trp, His) de los 20 AA naturales en un medio fisiológico ( $\text{pH} \approx 7.4$ ) pueden participar en interacciones con ligandos que contengan grupos, e. g. carboxilato, sulfonato, fosfito, fosfato, aminas primarias y otros grupos aromáticos (los cuales se presentan más a menudo que los grupos cargados mencionados). Las altas energías de interacción de los puentes de sal y  $\pi$ -catión hacen que sean notablemente más fuertes que otros tipos de interacciones moleculares, como los enlaces de hidrógeno y las interacciones vdW, lo que no descarta la importancia de dichas interacciones electrostáticas. En consecuencia, el programa yuxtapone la orientación espacial de la estructura del ligando flexible en la cavidad rígida del receptor hacia otro tipo de interacciones como interacciones  $\pi$ -catión, i. e. realiza indirectamente un efecto electrónico no predicho por el programa. Esta solución del programa por yuxtaposición del ligando en el receptor hacia otro tipo de interacciones es al que, en esta investigación, nosotros llamamos “fenómeno del acoplamiento molecular electrónico”.

## 8.2. *Análisis de áreas SAS de interfaz en las C-R/Ls*

La superficie molecular es una representación que modela las características estructurales, geométricas y químicas de una proteína [Rodríguez *et al.*, 2016].

Debido a las funciones fundamentales que desempeñan las interacciones moleculares en casi todos los procesos biológicos, las estructuras de las interfaces se han estudiado ampliamente utilizando métodos tanto experimentales como computacionales [Wang, 2018].

Predecir estas interacciones estructuralmente sigue siendo uno de los desafíos más relevantes en biología estructural [Zhang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2020].

Las superficies de interfaz de las proteínas forman “huellas digitales” con características inherentes que se conservan y ejercen una función específica en las interacciones con otras moléculas [Zhou *et al.*, 2020].

En bioinformática estructural, el área SAS de las proteínas siempre se ha considerado una característica principal para determinar el plegamiento y la estabilidad de las proteínas. Los primeros estudios computacionales [Lee y Richards, 1971; Chothia, 1976; Miller *et al.*, 1987], enfatizaron el papel de los residuos de aminoácidos expuestos al

disolvente frente a los no expuestos en la determinación estructural de proteínas. Típicamente, la SAS se define como el área accesible al solvente polar de una proteína, y se calcula por medio de una esfera de solvente, que sondea la superficie de la proteína más allá del radio de vdW con un radio de sonda de 1.4 Å. [Shrake y Rupley, 1973]

Evidentemente, la SAS es la función estructural tridimensional de las proteínas y, con base en los valores de SAS, los residuos de aminoácidos de una proteína se pueden clasificar como enterrados o expuestos [Kabsch y Sander, 1983], en donde dicha propiedad, se conserva a través de la evolución en diversas familias de proteínas [Rost y Sander, 1994].

La SAS se calcula normalmente como un valor absoluto o como accesibilidad relativa al disolvente, cuando el valor de la SAS se divide por la máxima superficie del residuo accesible al disolvente [Tien *et al.*, 2013].

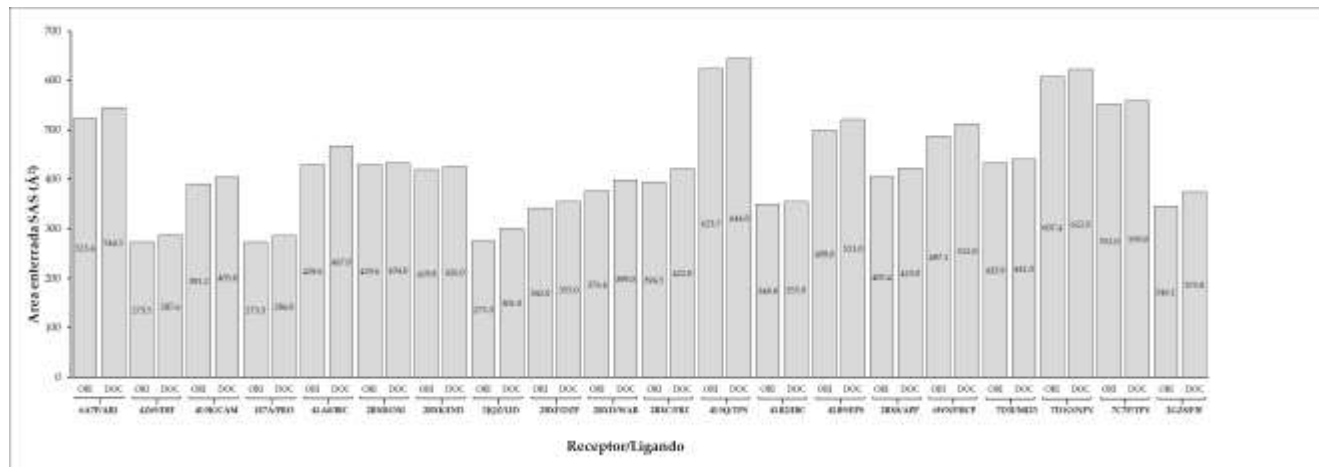
La SAS también ha ido ganando un papel fundamental en la detección de interfaces proteína/proteína y proteína/ligando de complejos moleculares en la base de datos de PDB [Savojardo *et al.*, 2020].

El área SAS de los residuos y los átomos que los componen identifican la funcionalidad en sitios de interfaz de variantes de proteínas, en donde este parámetro físico ha sido adoptado para describir las variaciones de los patrones de interacción [Wang, 2018].

En esta investigación se modificaron los scripts para el cálculo de la SAS que se forma en la interfaz del área enterrada de todos los residuos para sumar las contribuciones de la SAS, en donde se utilizó la clasificación de superficie SAS de átomos de la siguiente manera:

- i. Área enterrada SAS
- ii. Suma del área SAS de los átomos que componen a los residuos de aminoácidos polares y no polares que forman el área enterrada SAS
- iii. Suma del área SAS de los átomos polares totales (N, O, S) que forman el área enterrada SAS
- iv. Suma del área SAS de los átomos no polares totales (Carbonos) que forman el área enterrada SAS
- v. Suma del área SAS de los carbonos que pertenecen a los anillos aromáticos que forman el área enterrada SAS

Los análisis de interfaz de área enterrada SAS de los complejos estructurales se presentan en la Figura 14, en donde se muestra una mayor interfaz en las interacciones determinadas por DOC en comparación a ORI.

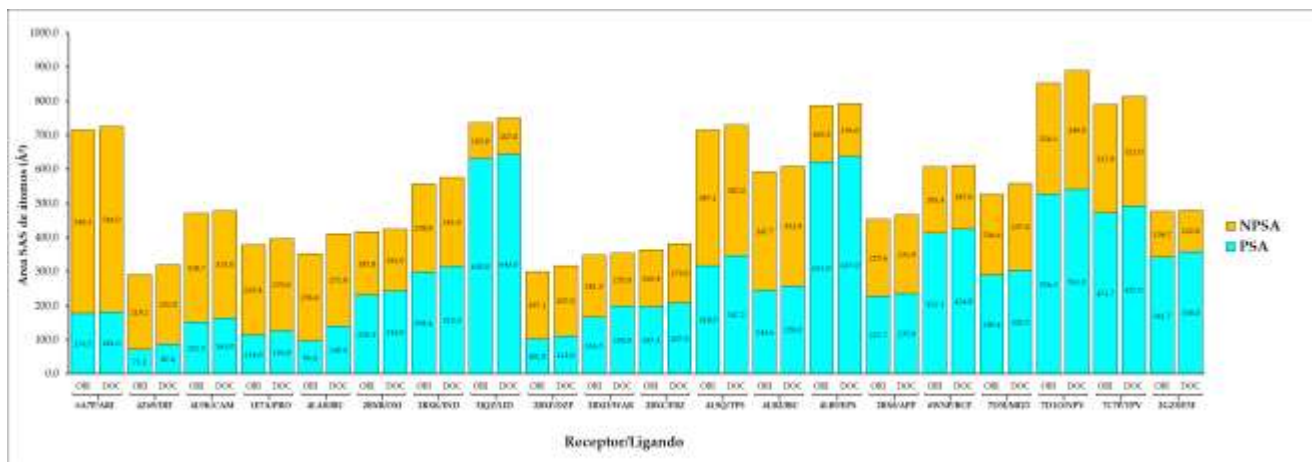


**Figura 14.** Área de interfaz enterrada SAS de las C-R/Ls.

La función de puntuación del programa por interacciones vdW, c. f. [Hill y Reilly, 2015]; determina la pose del ligando en el sitio de unión para evitar interacciones desfavorables de esferas de vdW. Sin embargo, el programa no detecta la SAS en los átomos. Cabe mencionar que en un medio acuoso existe una interacción de la SAS entre el ligando y el receptor (desconocida por el programa) y, por lo tanto, desconoce interacciones de superficie que se encuentren en un rango de separación SAS (considerando que el radio de una esfera de sonda es igual a 1.4 Å y suponiendo que dos átomos tienen un contacto con una distancia de corte igual a 0, es decir: se tocan con sus áreas SAS ( $\leq 2.8$  Å). Consecuentemente, el incremento de enlaces hidrófobos (c. f. secciones 1.2.3 y 1.2.4) indica que el programa tiende a posicionar de manera indirecta los ligandos hacia interacciones C-C y C- $\pi$  en la interfaz por el área enterrada SAS. Es decir, yuxtapone la posición y conformación del ligando en la cavidad del receptor. Dicha solución indirecta del programa es a la que nosotros llamamos “fenómeno del acoplamiento molecular estérico”.

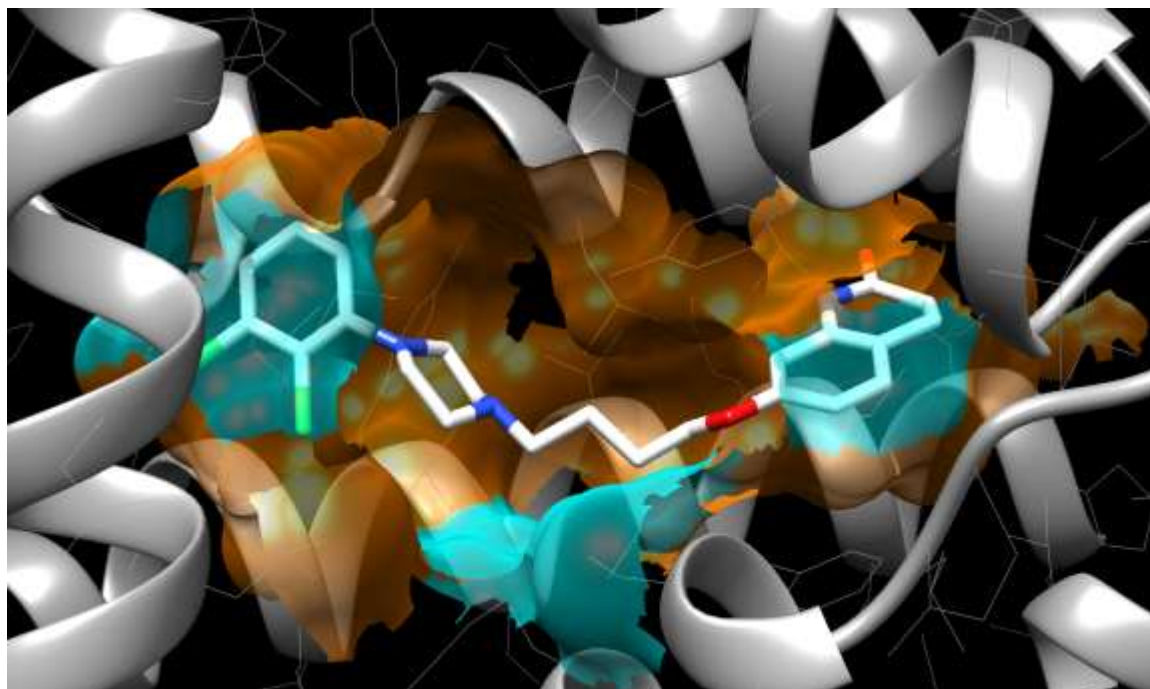
La mayor área enterrada de interfaz en DOC comprueba el fenómeno del acoplamiento estérico en la cavidad. Sin embargo, es importante considerar la superficie de los átomos que componen a los residuos de aminoácidos polares y no polares, en donde la SAS enterrada de interfaz no explica hacia que superficies de residuos son orientados los

ligandos en el AM. En la Figura 15, se presenta la suma del área SAS de los átomos que componen a los residuos de aminoácidos polares y no polares que forman el área enterrada SAS.

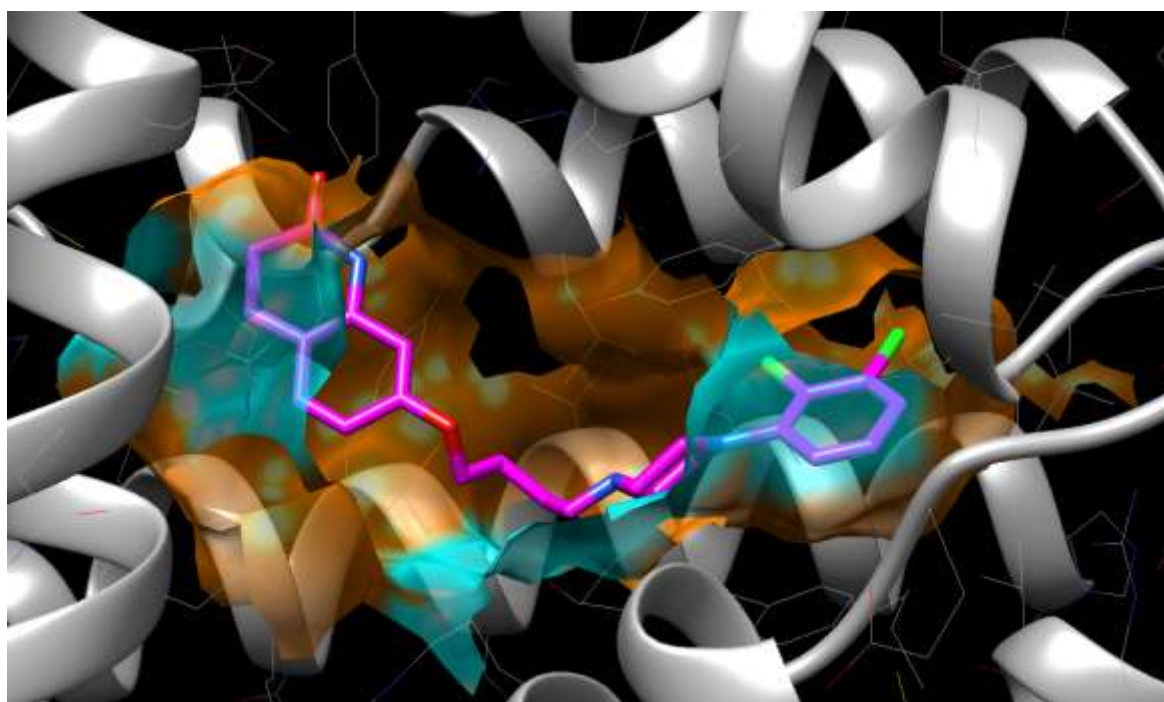


**Figura 15.** Área de interfaz SAS de los átomos que componen a los residuos polares y no polares de las C-R/Ls. PSA: Área polar (cian); NPSA: Área no polar (naranja).

El script para identificar la SAS en la interfaz atómica (véase sección 8.1), se calculó sumando las contribuciones de la SAS de los residuos polares y no polares, esta característica de superficie en cavidades es la huella digital del sitio de unión en la proteína [Leaver-Fay *et al.*, 2007], lo que caracteriza a cada sitio de unión con su respectivo ligando. En la Figura 16, se muestra el área SAS de los átomos que componen a los residuos polares y no polares de los complejos ASH/ARI ORI y ASH/ARI DOC.



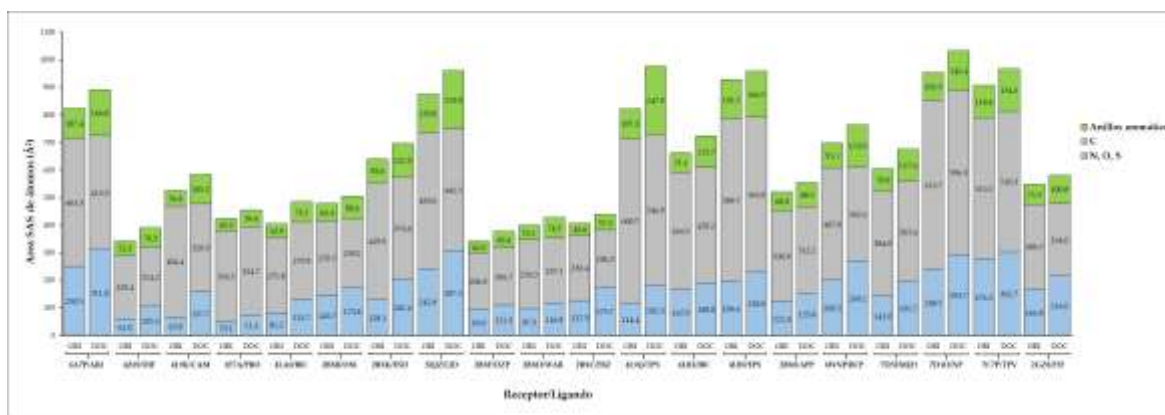
(a)



(b)

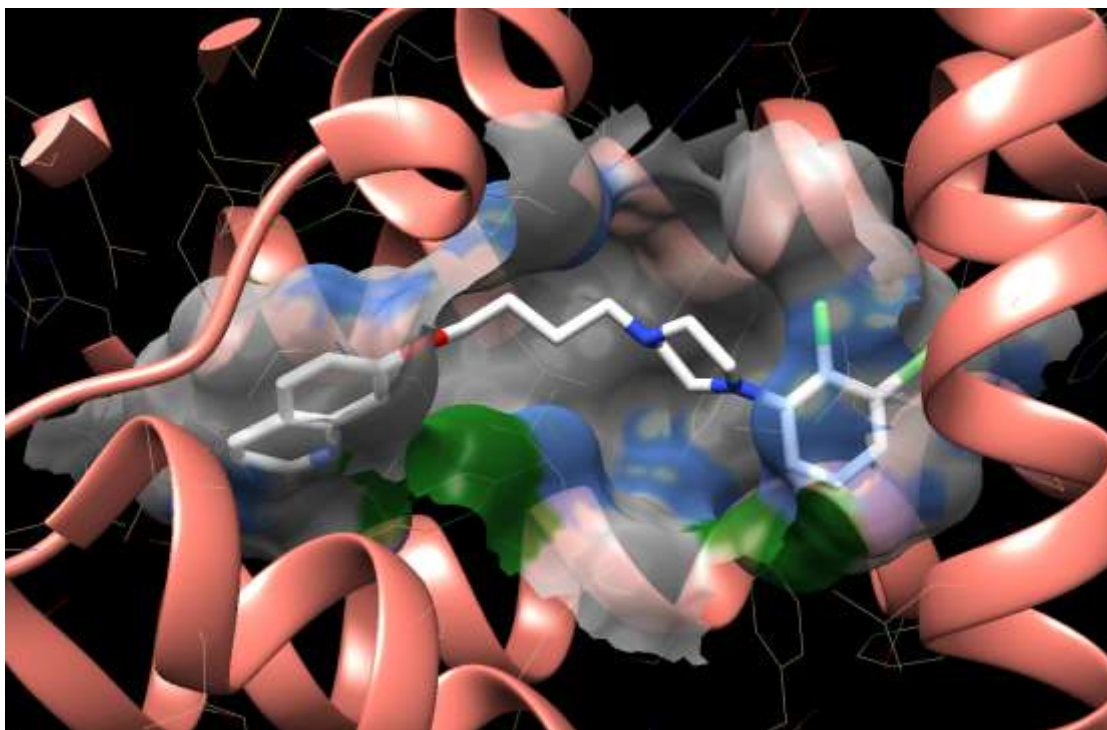
**Figura 16.** Superficie de interfaz SAS de los átomos que componen a los residuos polares y no polares en la C-R/L de ASH/ARI. (a) ASH/ARI ORI (PDB: 6A7P); (b) ASH/ARI DOC. ARI ORI: blanco; ARI DOC: magenta; ASH: gris; SAS de átomos de residuos polares: cyan; SAS de átomos de residuos no polares: naranja.

Los cálculos de superficie de átomos clasificados por residuo muestran que las cavidades de la proteína para los complejos DOC tienen mayor superficie de interfaz hacia los átomos que componen a los residuos polares. Este patrón se repite en todos los complejos analizados para DOC, en donde el fenómeno de acoplamiento tiende a inclinarse hacia residuos polares. Sin embargo, para precisar el cálculo hacia que superficie de átomos en la cavidad del receptor el software de AM predice la posición y conformación de la molécula, se desarrolló un script que calcula la suma del área SAS de los átomos polares (N, O, S), no polares (carbonos de los residuos, incluyendo anillos aromáticos) y carbonos de residuos aromáticos, los cuales, se presentan en la Figura 17.

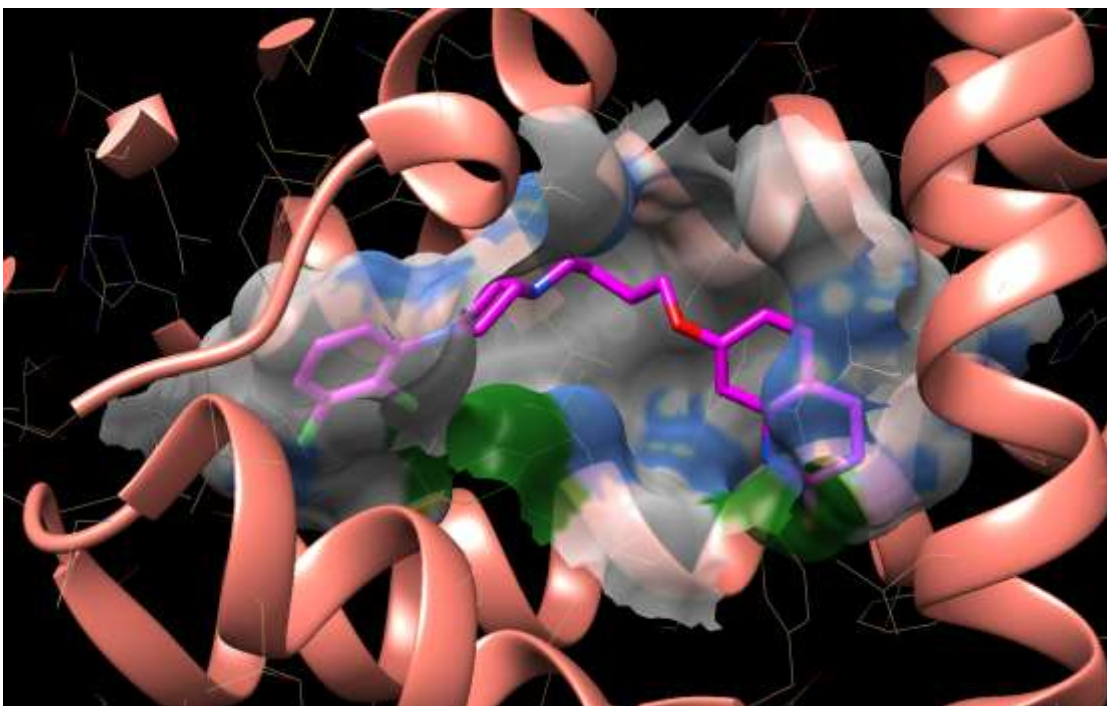


**Figura 17.** Área de interfaz SAS de los átomos polares, carbonos y anillos aromáticos de las C-R/Ls. SAS de átomos polares (N, O, S): azul cielo; SAS de carbonos totales: gris; SAS de carbonos de anillos aromáticos: verde.

El aumento de SAS de los átomos polares en los complejos DOC, se atribuye al fenómeno del acoplamiento molecular electrónico. Además, se presentó un decremento de SAS en los átomos no polares en DOC, en donde se esperaba un aumento de SAS de los carbonos. Sin embargo, el fenómeno del acoplamiento molecular en los anillos aromáticos presenta un aumento en DOC en todos los complejos analizados. En la Figura 18, se muestra el área SAS de los átomos polares, carbonos totales y carbonos de anillos aromáticos que participan en la interfaz SAS de los complejos ASH/ARI ORI y ASH/ARI DOC.



(a)



(b)

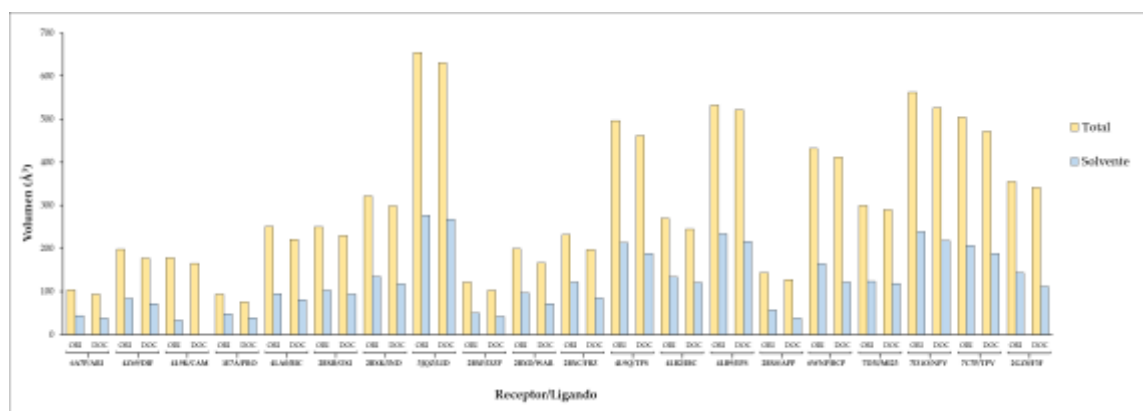
**Figura 18.** Superficie de interfaz SAS de los átomos polares, carbonos y anillos aromáticos de la C-R/L de ASH/ARI. (a) ASH/ARI ORI (PDB: 6A7P); (b) ASH/ARI DOC. ARI ORI: blanco; ARI DOC: magenta; ASH: salmón; Superficie transparente SAS de átomos polares (N, O, S): azul cielo; Superficie transparente SAS de carbonos totales: gris; Superficie transparente SAS de carbonos de anillos aromáticos: verde.

Cabe resaltar que el fenómeno del acoplamiento molecular electrónico tiende a detectar enlaces  $\pi$ -cación (véase sección 8.1), en donde el volumen espacial de los anillos aromáticos podría contribuir a la orientación espacial del ligando en la cavidad del receptor, el cual no está integrado como un parámetro en el algoritmo del acoplamiento molecular. Los anillos aromáticos presentan un mayor volumen molecular en comparación a los demás grupos funcionales de los residuos. A pesar de que el programa no detecta la superficie electrostática electronegativa de los anillos aromáticos, la característica física de volumen molecular contribuye de manera notoria hacia el acomodo espacial del ligando.

### 8.3. *Análisis de volúmenes de interfaz en las C-R/Ls*

Muchos procesos biológicos, como la señalización celular y las reacciones enzimáticas, están regulados por interacciones entre proteínas y pequeñas moléculas orgánicas (ligandos). Es fundamental y esencial elucidar estas interacciones de interés biológico para el descubrimiento racional de fármacos. En la mayoría de los casos, la unión de un ligando a una proteína se produce en una superficie accesible al disolvente formada como una cavidad dentro de la proteína [Andersson *et al.*, 2010].

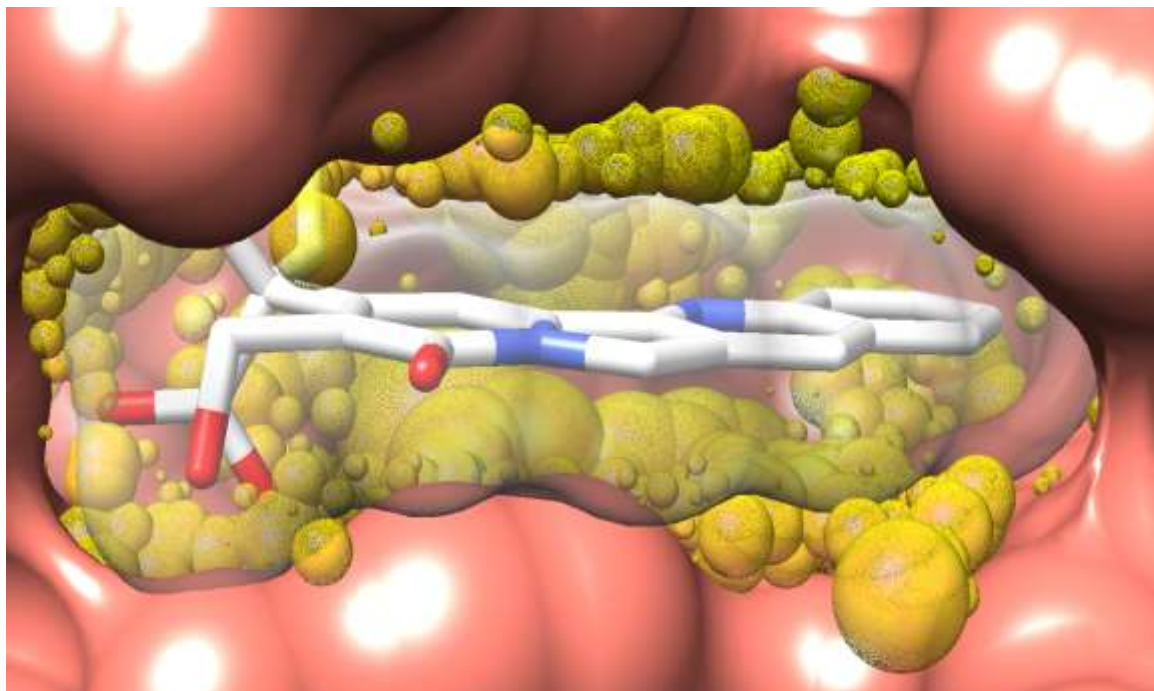
La afinidad de unión depende de las propiedades fisicoquímicas tanto de la proteína (especialmente de la cavidad en la que se produce la interacción) como del ligando. En este estudio se presenta un enfoque en donde se modificaron dos scripts para el cálculo del volumen total y volumen con un radio mínimo de 1.4 Å en la interfaz del ligando y la cavidad de los receptores, Figura 19.



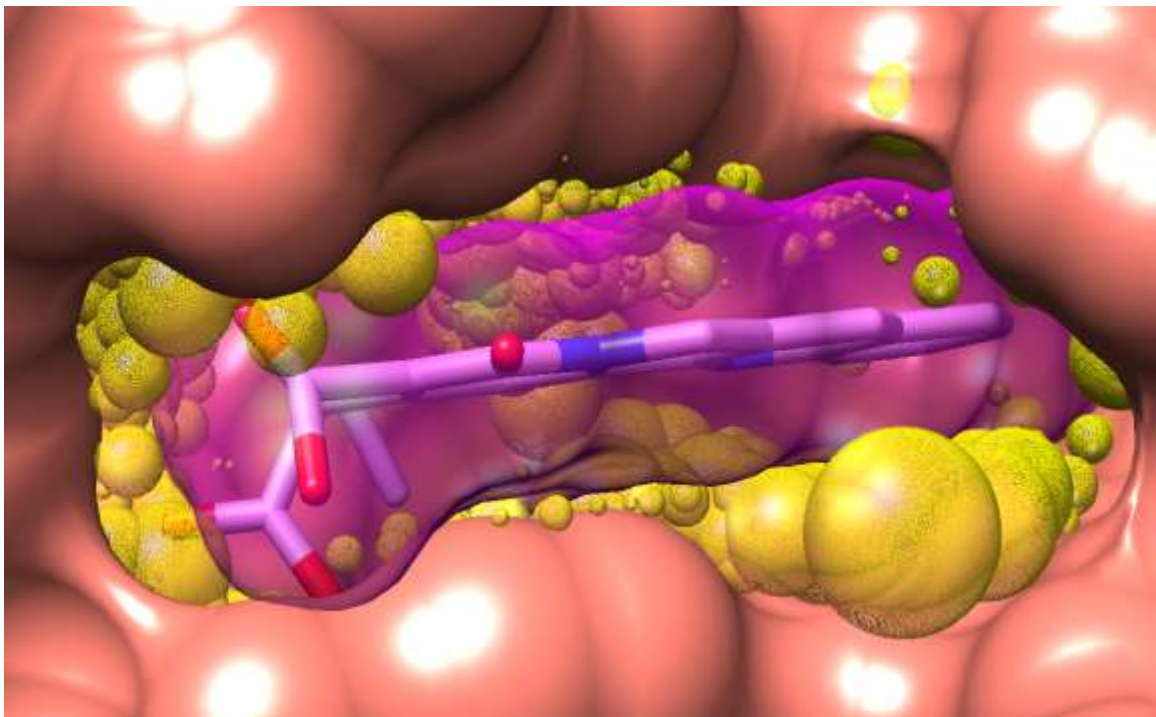
**Figura 19.** Volúmenes de interfaz de las C-R/Ls. Total: Volumen total en la interfaz de la C-R/L. (Amarillo); Solvente: Volumen predicho del solvente en la interfaz de la C-R/L con un radio  $d=1.4$  Å de formación de esferas que equivalen a moléculas de agua. (Azul).

Aunque el volumen de cavidades utilizado por el programa SurfNet [Laskowski R. A.,1995], involucra volúmenes moleculares totales respecto a la SES de ambas moléculas (IRL), no determina el volumen molecular de solvente que ocupa el espacio entre el ligando y el receptor, el cual es un parámetro físico fundamental estérico en cavidades, que se calculó con el algoritmo de restricción de volúmenes mayores a una molécula de agua en interfaz con la superficie SES, i. e. la capacidad del volumen molecular de esferas que simulan moléculas de agua con radio de 1.4 Å que ocupan el espacio en la cavidad entre las superficies SES del ligando y el receptor.

El volumen de las cavidades de los receptores en interfaz con los ligandos de los complejos estructurales analizados presenta en DOC un menor volumen que en los complejos REC/ORI, el cual comprueba una mayor interfaz en los complejos DOC. La Figura 20, presenta el volumen que se forma entre la superficie SES de la cavidad y el ligando de camptotecina en complejo con ASH de los complejos ASH/CAM ORI y ASH/CAM DOC.



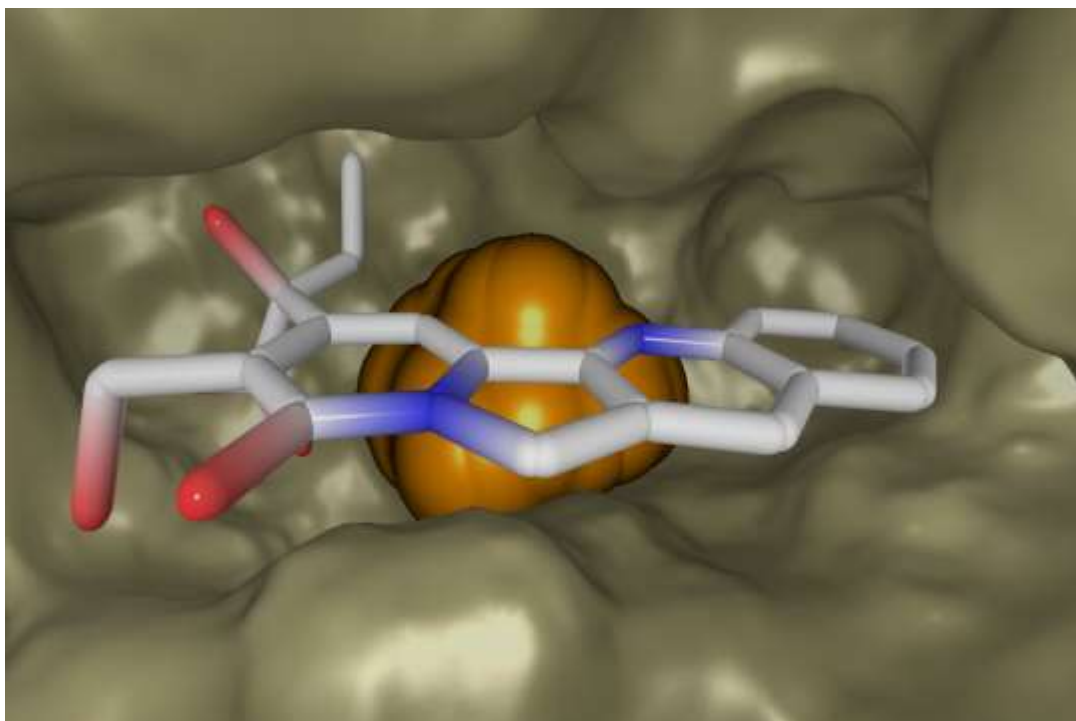
(a)



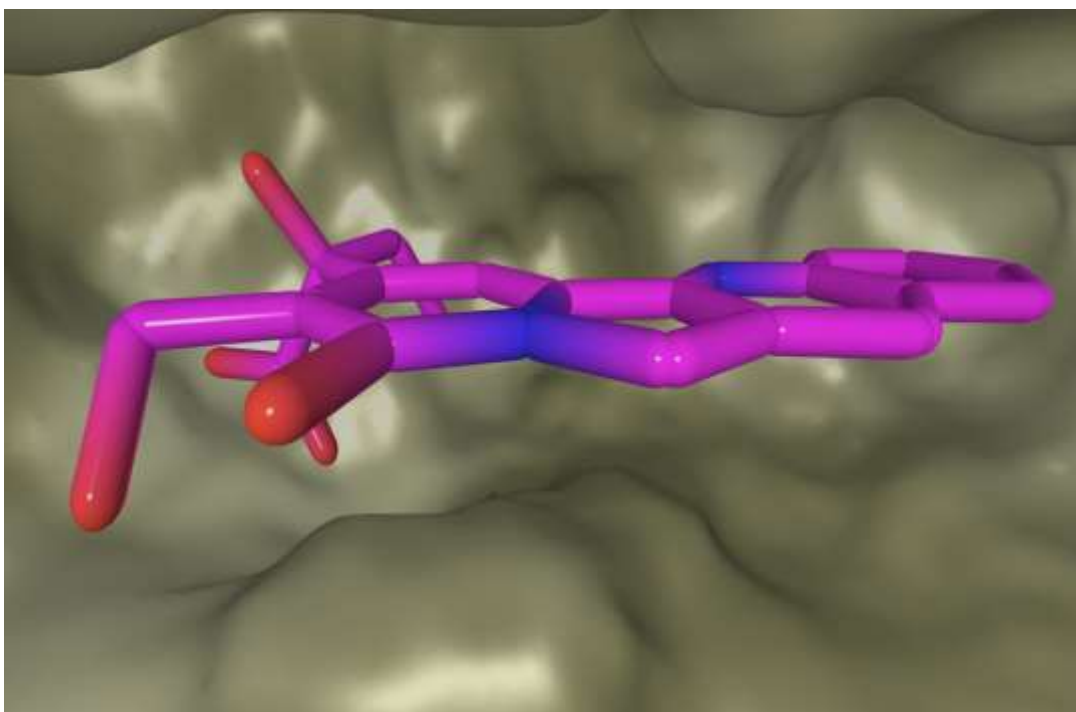
(b)

**Figura 20.** Volumen total en la interfaz de las superficies SES de la C-R/L de ASH/CAM. **a:** ASH/CAM ORI (PDB: 4L9K) y **b:** ASH/CAM DOC. Estructura y superficie transparente de ORI: blanco; Estructura y superficie transparente de DOC: magenta; Superficie sólida de ASH: salmón; Volumen de la cavidad en la interfaz de las superficies SES en forma de red: amarillo.

El volumen de solvente es un factor clave estérico en el acomodo espacial del ligando en las cavidades. Este parámetro cuantitativo de volumen en los complejos analizados indica la cantidad de solvente encerrado en la interfaz de la cavidad entre el ligando y el receptor, en donde este método es clave en la detección del volumen molecular de solvente y comprueba que los complejos REC/DOC tiene un mayor acomodo estérico que impide que una mayor cantidad de volumen de solvente quede atrapada a diferencia de las interfaces REC/ORI. En la Figura 21, se visualiza la emulación del volumen de solvente que se forma entre la superficie SES de la cavidad del receptor y el ligando de camptotecina en complejo con la cavidad de la ASH.



(a)



(b)

**Figura 21.** Volumen del solvente en la interfaz de las superficies SES de la C-R/L de ASH/CAM. **a:** ASH/CAM ORI (PDB: 4L9K) y **b:** ASH/CAM DOC. Estructura de ORI: blanco; Estructura de DOC: magenta; Superficie sólida de ASH: kaki; Volumen del solvente en la C-R/L de las superficies SES: naranja.

#### 8.4. *Análisis e identificación estructural de residuos en las C-R/Ls*

Los sitios de unión de proteínas a diversos ligandos desempeñan un papel clave en muchos procesos biológicos. Los métodos computacionales existentes se pueden clasificar aproximadamente como métodos basados en secuencias o en estructuras 3D. Todos estos métodos consisten en el aprendizaje automático tradicional. En una serie de tareas de predicción de residuos de enlace, los métodos basados en estructuras 3D son ampliamente superiores a los métodos basados en secuencias. Sin embargo, debido al gran número de proteínas con secuencias conocidas de aminoácidos [Magliery y Regan, 2005], los sitios críticos para la función de las proteínas pueden identificarse mediante métodos de secuenciación, alineación estructural, entre otros métodos *in silico* [Lee *et al.*, 2007; Pazos y Sternberg, 2004].

Según la teoría neutra de la evolución molecular, los residuos más relevantes para una función biológica varían más lentamente que los menos relevantes [Saldaño *et al.*, 2016].

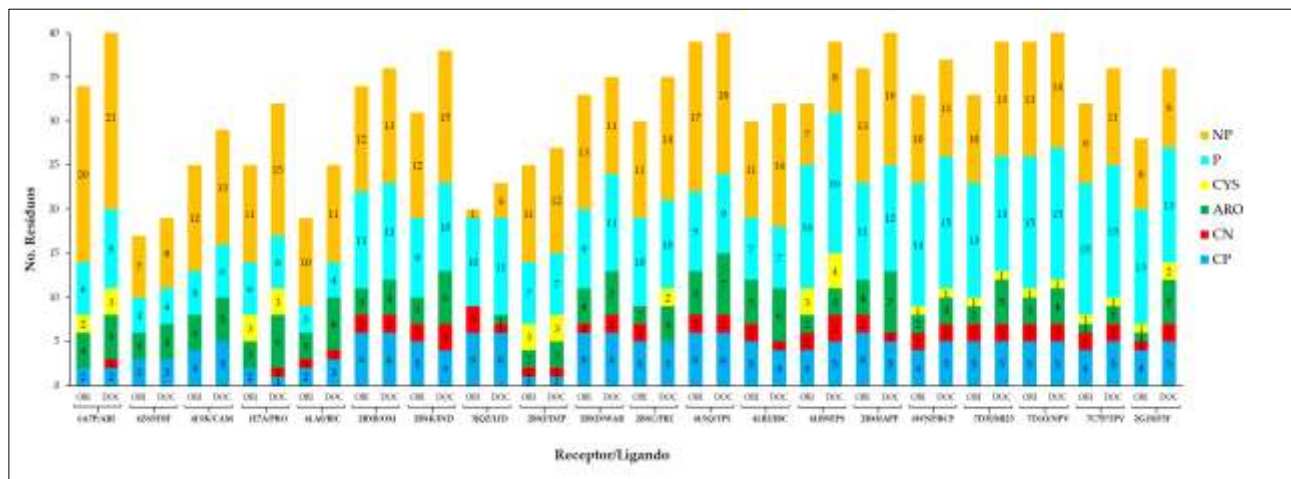
La diversidad conformacional de proteínas se ha asociado a diferentes aspectos relacionados con la función biológica. La catálisis enzimática, la transducción de señales, la especificidad del reconocimiento de proteínas, el alosterismo, el origen de la adaptación funcional de nuevas proteínas, la evolución, entre otros. En particular, la unión del ligando se puede analizar en términos de cambios estructurales entre las denominadas sitios de interacción del receptor [Gunasekaran y Nussinov, 2007; Gutteridge y Thornton, 2005].

Estos conformeros se caracterizan por sus afinidades relativas a ligandos y su existencia está ampliamente respaldada por una gran variedad de pruebas experimentales obtenidas de imágenes de CRX y MCE, estudios cinéticos, fluorescencia de una sola molécula y RMN [Lange *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Weikl y von Deuster, 2009; Tzeng y Kalodimos, 2011].

Los sitios de interacción que explican la función biológica se generaliza a la mayoría de las proteínas en unión a diversos ligandos. Las herramientas computacionales para el acoplamiento molecular, predicción de la interacción proteína/proteína, evaluación de modelos estructurales de proteínas, predicción de patrones de sustitución observados de divergencia de secuencias durante la evolución y mediciones co-evolutivas entre residuos,

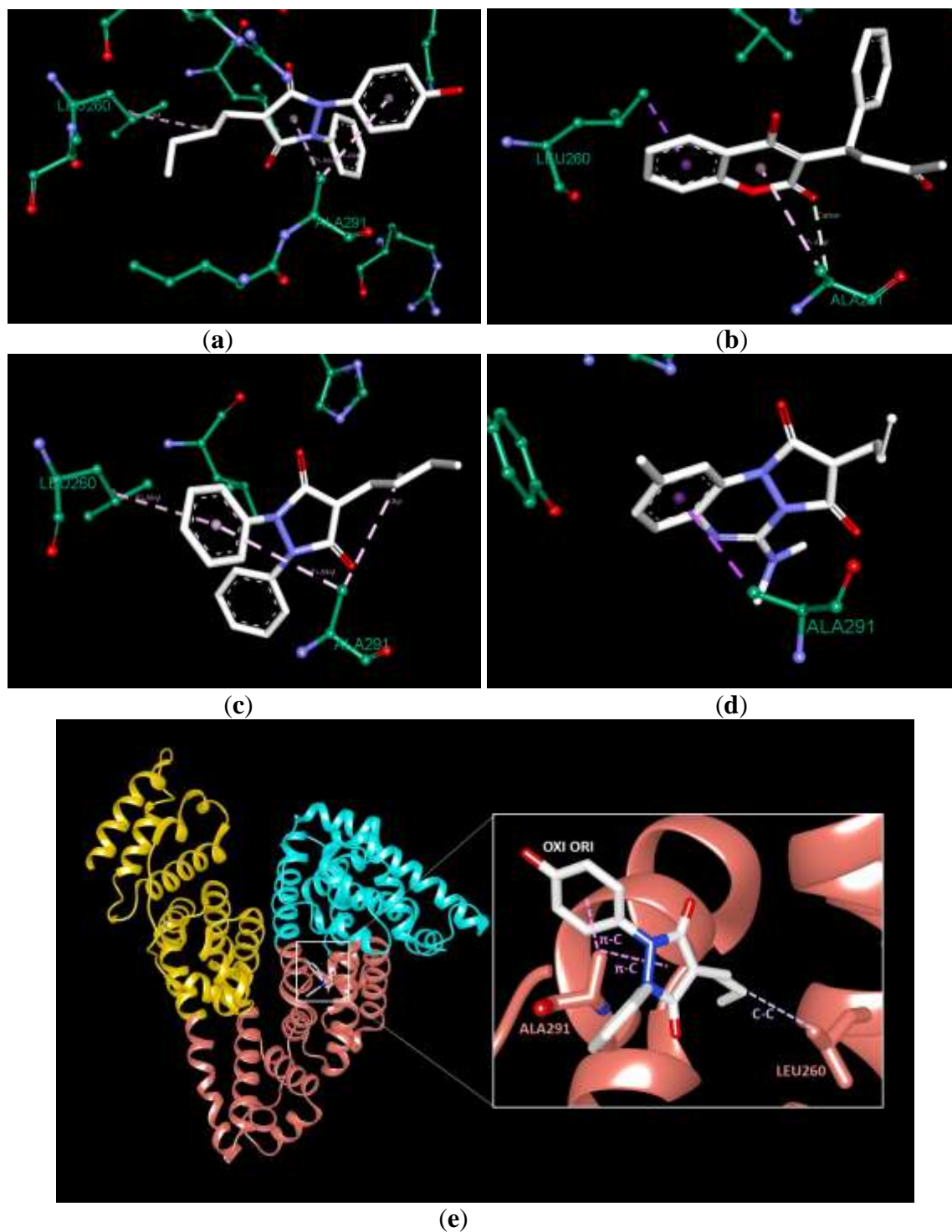
se encuentran entre las aplicaciones bioinformáticas que abordan la diversidad conformacional para la resolución de la búsqueda de sitios de interacción específicos [Osguthorpe *et al.*, 2012].

En la Figura 22, se presentan los resultados de los residuos que participan en las interfaces del área enterrada SAS de las C-R/Ls, resueltos por el script descrito en el apartado 11.3.



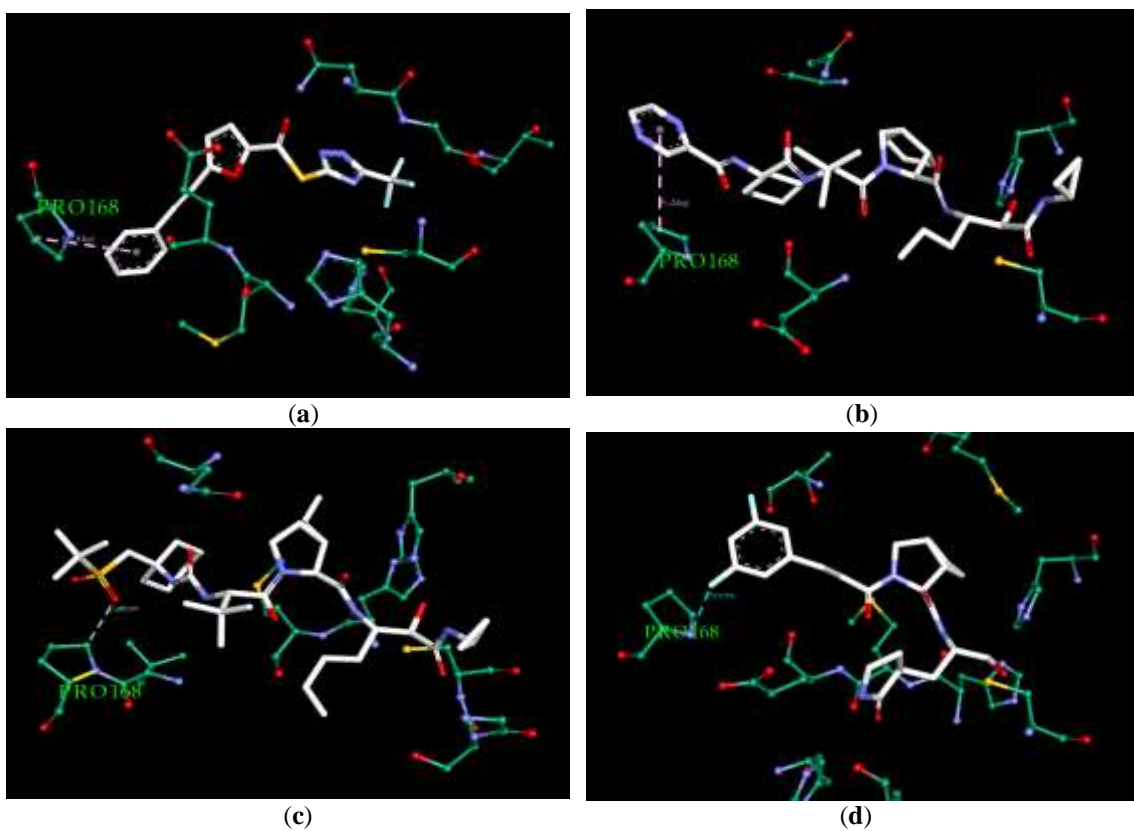
**Figura 22.** Residuos de las C-R/Ls que forman la interfaz del área enterrada SAS. NP: no polares; P: polares; CYS: cisteínas; ARO: aromáticos (Phe, His, Tyr, Trp); CN: cargados negativos; CP: cargados positivos.

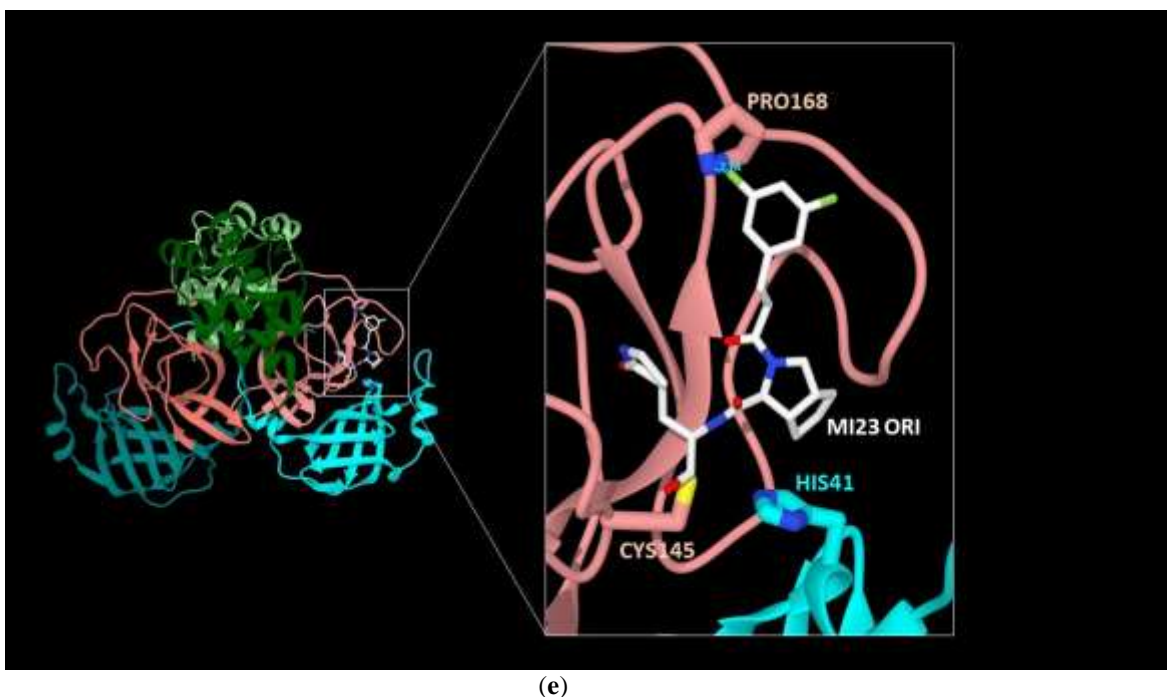
El incremento de residuos en la mayoría de los complejos estructurales analizados, se debe al fenómeno de acoplamiento molecular estérico, en donde el área enterrada de interfaz que forma la superficie SAS de los residuos en interfaz con los ligandos DOC, participa una mayor cantidad de residuos hidrófobos aromáticos y residuos polares. En un sentido estricto de análisis individuales de residuos, se identificaron dos patrones de interacción no reportados hasta la fecha, en donde ALA291 y LEU260 realizan tanto interacciones hidrofóbicas como polares en los ligandos analizados en el sitio de interacción sludow I, en la región IIA de la estructura de las albúminas (Figura 23), por lo que podría considerarse un sitio importante de unión como acarreador de moléculas que podría tener una función biológica tanto electrónica como estérica. Sin embargo, la función específica de ALA291 y LEU260 aún no es clara.



**Figura 23.** Interacciones con ALA291 y LEU260 en el sitio sludow I de ASH con diferentes ligandos. (a) Enlaces de ASH/OXI ORI (PDB: 2BXB):  $\pi$ -C y C-C con los residuos ALA291 y LEU260, respectivamente; (b) Enlaces de ASH/WAR ORI (PDB: 2BXD): ( $\pi$ -C y CHB) y  $\pi$ -A con los residuos ALA291 y LEU260, respectivamente; (c) Enlaces de ASH/FBZ ORI (PDB: 2BXC):  $\pi$ -C con los residuos ALA291 y LEU260; (d) Enlace de ASH/APP ORI (PDB: 2BX8):  $\pi$ -A con el residuo ALA291; (e) Localización del sitio de interacción Sludow I y los residuos ALA291 y LEU260 en interacción con OXI ORI; En las figuras (a–d), los ligandos ORI y ASH se muestran en blanco y verde bosque, respectivamente; En la figura (e), los dominios I–III y OXI ORI se muestran en cian, salmón, amarillo canario y blanco, respectivamente.

Por otra parte, en la estructura de la PPS viral, se calculó el área de superficie SAS enterrada de los residuos en interfaz con los ligandos, en el cual se realizó el estudio de patrones de interacción de residuos, en donde se identificó que PRO168 forma al menos un enlace con los ligandos analizados. Hasta la fecha no se ha reportado que PRO168 esté definido como un sitio de interacción de importancia inhibitoria en el sitio catalítico de la PPS. Sin embargo, en este estudio se determinó que PRO168 forma interacciones hidrofóbicas y polares en los ligandos analizados en el sitio de interacción catalítico, Figura 24.





**Figura 24.** Interacciones de PRO168 en el sitio de interacción catalítico de la PPS/M123. (a) Enlace  $\pi$ -C de PRO168 con F3F ORI (PDB: 2GZ8); (b) Enlace  $\pi$ -C de PRO168 con TPV ORI (PDB: 7C7P); (c) CHB de PRO168 con NPV ORI (PDB: 7D10); (d) Enlace halógeno de PRO168 con M123 ORI (PDB: 7D3I); (e) Localización del sitio de interacción catalítico con el ligando M123 ORI en interacción con PRO168 (enlace halógeno en verde) y los residuos conocidos HIS41 Y CYS145; En las figuras (a–d), los ligandos ORI y PPS se muestran en blanco y verde bosque, respectivamente; En la figura (e), los dominios I–III y M123 ORI se muestran en cian, salmón, verde bosque y blanco, respectivamente, en donde los colores claros y oscuros representan a las cadenas A y B, respectivamente de la PPS.

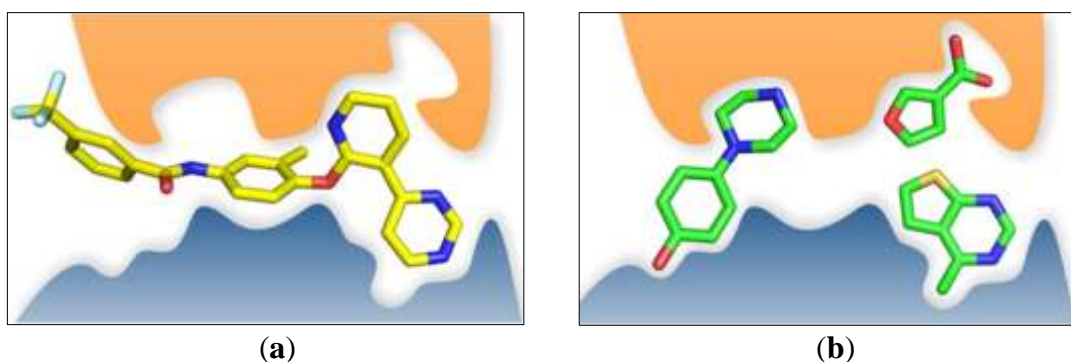
### 8.5. Análisis estructural de enlaces en las C-R/L-Ms

Los métodos del acoplamiento molecular basados en ligandos modificados-fragmentados han surgido como alternativas que abren nuevas vías para el diseño de fármacos en la industria y el mundo académico, así como las ciencias farmacéuticas, la química, la biología, la física y la informática. Los enfoques computacionales ocupan un lugar especial, ya que han sido pioneros en el mapeo de sitios por modificaciones de ligandos. Los métodos desarrollados para predecir la unión de un ligando a una proteína diana constituyen una forma rentable de examinar diversos sitios de unión físicos y químicos. Además, no se limitan a las moléculas sintetizadas previamente, presentando la ventaja de analizar los sitios de unión con nuevos quimiotipos [Jacquemard *et al.*, 2019].

En comparación con el docking de moléculas similares a fármacos, el docking de ligandos modificados-fragmentados ha dado con frecuencia altas tasas de aciertos en diferentes sitios específicos de unión. Los ligandos modificados ofrecen muchas ventajas

en comparación con la mayoría de los compuestos similares a fármacos [Chen y Shoichet, 2009].

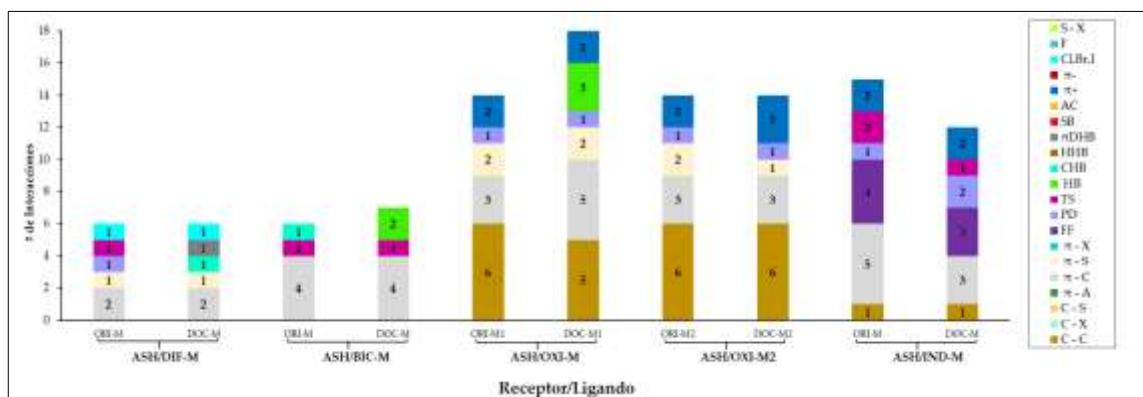
Debido a la modificación del tamaño y composición atómica, los ligandos modificados son más susceptibles a realizar interacciones específicas en comparación con moléculas más grandes (Figura 25), simplemente debido a una mayor probabilidad de que todas sus (pocas) características químicas se complementen ó se cambien grupos funcionales en los ligandos con características químicas específicas para orientar y forzar el acoplamiento molecular con el fin de llevar a cabo una experimentación electrónica específica de enlaces ó estérica [Budin *et al.*, 2001].



**Figura 25.** Modo de unión típico de fragmentos frente a impactos en una cavidad proteica. Nótese que un ligando similar a fármaco (a) tiene menor unión estérica que los ligandos fragmentados (b). Imagen tomada y editada de Scott *et al.*, 2012.

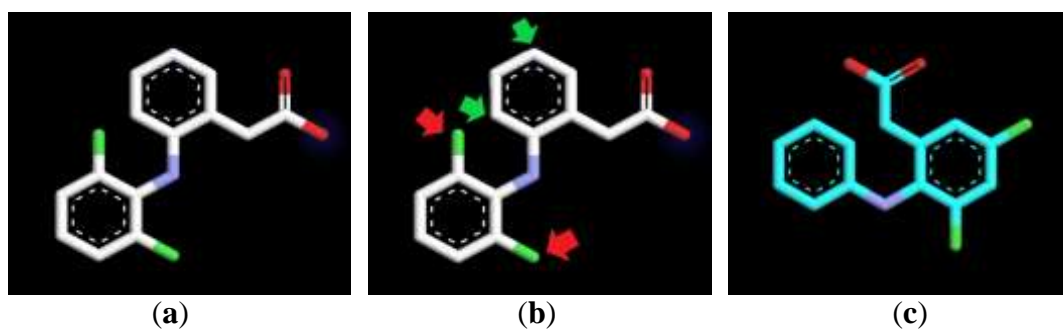
Para realizar un análisis electrónico ó estérico de interacciones, el método de acoplamiento molecular de ligandos modificados es mucho más preciso para orientar el ligando a sitios específicos de unión para un análisis estructural de sondeo, debido a que el programa de acoplamiento molecular puede explorar otros grupos funcionales en el receptor y propiedades de superficie, en contraste con las moléculas similares a fármacos no modificadas no pueden penetrar en sitios específicos de superficie molecular en la cavidad. Además, al cambiar átomos y grupos funcionales específicos (e. g. grupos cargados positivos y negativos, halógenos, donadores, aceptores, anillos aromáticos, entre otros) en los ligandos modificados, se puede realizar un acoplamiento molecular para realizar una orientación forzada experimentalmente hacia efectos electrónicos y estéricos.

En el presente trabajo, se realizaron modificaciones de ligandos para estudiar el efecto electrónico de enlaces del AM, como se muestra en la Figura 26.



**Figura 26.** Análisis de interacciones moleculares de las C-R/L-Ms. Enlaces hidrofóbicos: C-C (carbono-carbono), C-X (carbono-halógeno), C-S (carbono-sulfuro),  $\pi$ -A ( $\pi$ -amida),  $\pi$ -C ( $\pi$ -carbono),  $\pi$ -S ( $\pi$ -sulfuro),  $\pi$ -X ( $\pi$ -halógeno); Enlaces hidrofóbicos de apilamientos  $\pi$ - $\pi$ : FF (cara-cara), PD (cara-cara desplazados), TS (en forma de T); Puentes de hidrógeno: HB (convencional), CHB (Carbono-hidrógeno), HHB (Halógeno-hidrógeno),  $\pi$ DHB (puente de hidrógeno-donador  $\pi$ ); Electrostáticos: SB (puente de sal), AC (carga atractiva),  $\pi^+$ ( $\pi$ -Catión),  $\pi$ -( $\pi$ -Anión); Halógenos: Cl, Br, I, (convencional), F (flúor), S-X (halógeno-sulfuro).

En el análisis de acoplamiento del ligando modificado DIF ORI-M, se estudió la influencia electrostática del cloro, en donde se realizó un cambio de posición de cloros en los anillos aromáticos en DIF (véase Tabla S1), en el cual se forma un enlace halógeno en ASH/DIF ORI-M, Figura 27.

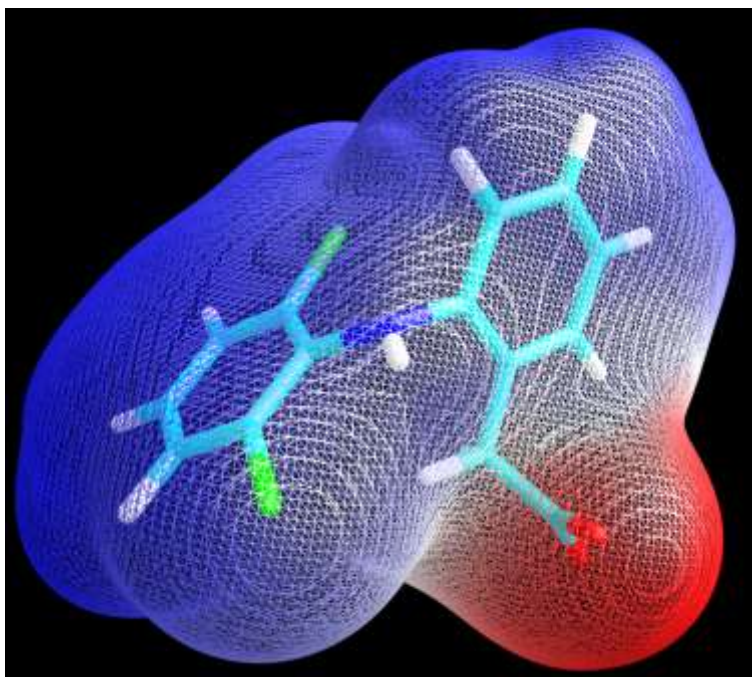


**Figura 27.** Modificación de DIF. (a) DIF en blanco; (b) Localización de las modificaciones en DIF; (c) DIF modificado en cian; Flechas rojas: Señalan los átomos que se eliminan de la estructura; Flechas verdes: Posición de la inserción de cloros en la estructura.

Cabe mencionar que el software está programado para resolver la posición y conformación del ligando mediante energías mínimas por Coulomb en kcal/mol entre

donadores y aceptores que contengan átomos de (N, O) e hidrógenos polares. En adición, el programa no resuelve acoplamientos moleculares por densidades electrónicas por Coulomb, el cual es un parámetro crucial que identifica sitios de interacción positivos y negativos en las superficies moleculares como una “huella digital” conservada en muchas moléculas [Gainza *et al.*, 2020]. Específicamente, el programa no detecta nubes de densidad electrónica de PES, en un sentido estricto electrónico, es una limitante importante en la resolución del acoplamiento molecular en diversos grupos funcionales y átomos, i. e. en anillos aromáticos la nube de densidad electrónica  $\pi$  no es detectable, en los átomos halógenos comunes en ligandos (Cl, Br, I, F), no se forma la nube de densidad electrónica electropositiva en el agujero  $\sigma$ .

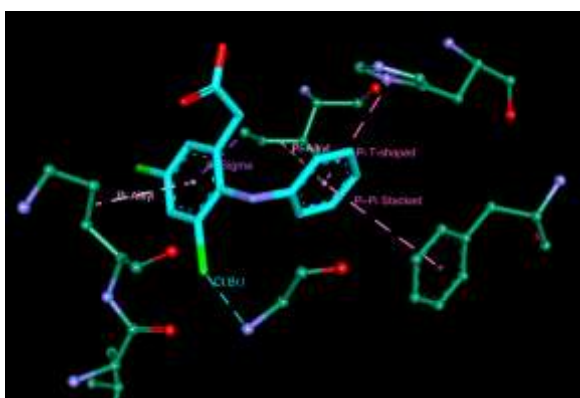
La Figura 28 muestra la nube de densidad electrónica del PES de diclofenaco (DIF-ORI, Figura S2 a), en donde no se presentan densidades electrónicas negativas en cloros ni en anillos aromáticos.



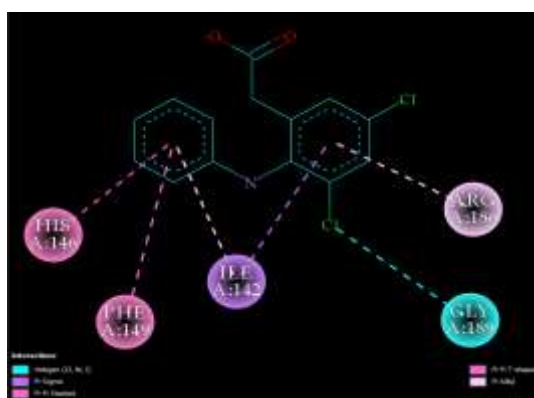
**Figura 28.** PES de DIF ORI. Los cálculos del PES se realizaron por Coulomb con valores de -10 a 10 kcal/mol en densidad de puntos de 0.01 Å en una superficie en forma de malla. Nótese que la nube de densidad electrónica  $\pi$  de los anillos aromáticos no presenta electronegatividad, los cloros presentan una nube de densidad electrónica únicamente electropositiva. Los cálculos se realizaron con el paquete CCP4 [Potterton *et al.*, 2002] con un campo de fuerza CHARMM con modificaciones en el script para halógenos y anillos aromáticos de acuerdo a [Brooks *et al.*, 2009], se asignaron cargas Gasteiger y se determinó la mejor conformación molecular con el algoritmo Boltzmann jump.

Los cálculos electrostáticos de superficie para la formación de densidades electrónicas de mayor precisión en halógenos y anillos aromáticos pueden ser calculados con programas que requieren mayor tiempo y costo de computo que resuelvan ecuaciones de mecánica cuántica de Poisson-Boltzmann [Fogolari *et al.*, 2002], dichos algoritmos no están integrados en el programa Autodock4 [Morris *et al.*, 2009].

Sin embargo, el programa de acoplamiento molecular resuelve la predicción de la posición y conformación del ligando DIF ORI-M en la interfaz ASH/DIF DOC-M, en donde yuxtapone la posición y conformación del ligando a una región en la cavidad del receptor donde el agujero  $\sigma$  electropositivo del cloro forma un enlace halógeno con un nitrógeno aceptor de una histidina y en la zona del cloro electronegativa del PES y un enlace hidrógeno-carbono en una serina (Figura 29).



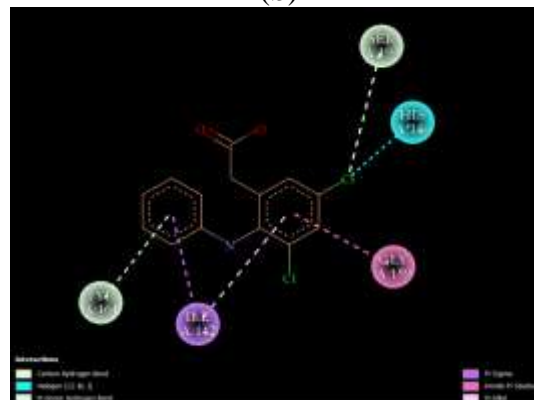
(a)



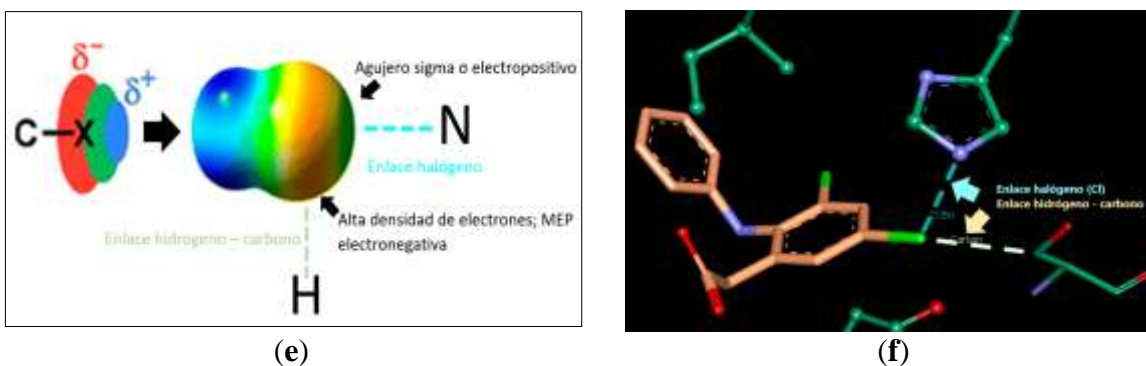
(b)



(c)

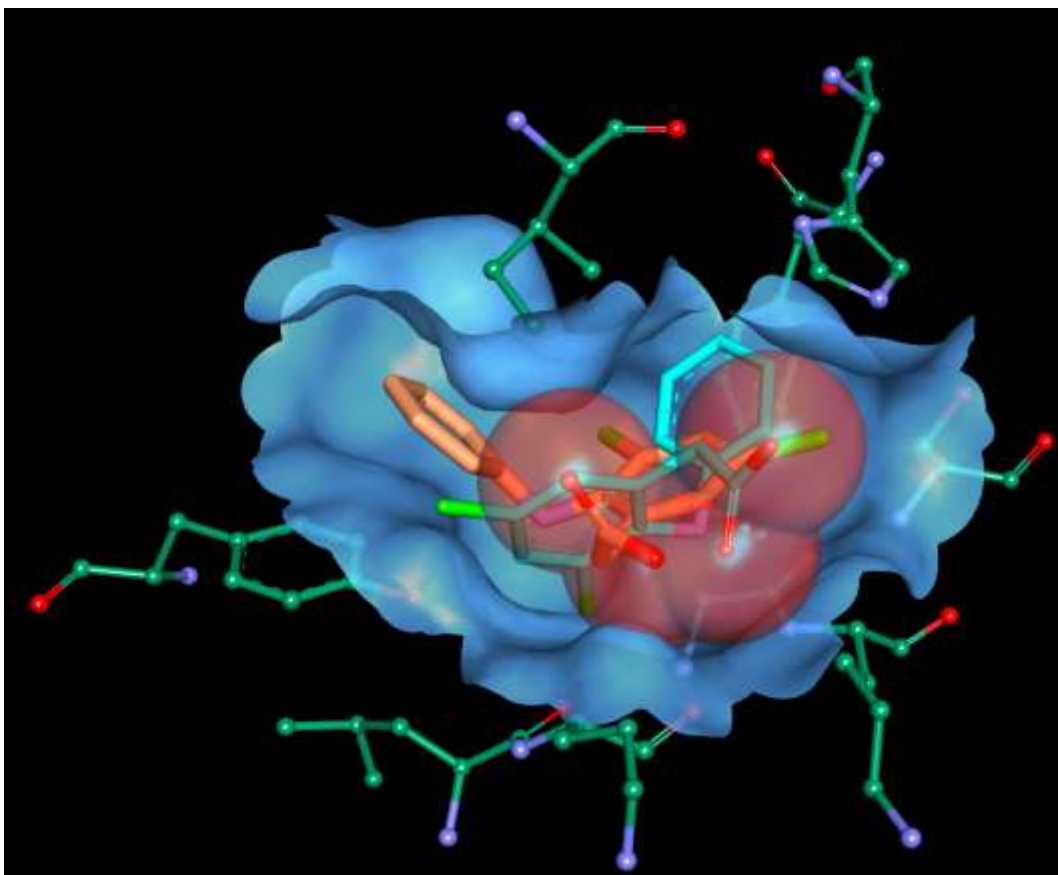


(d)



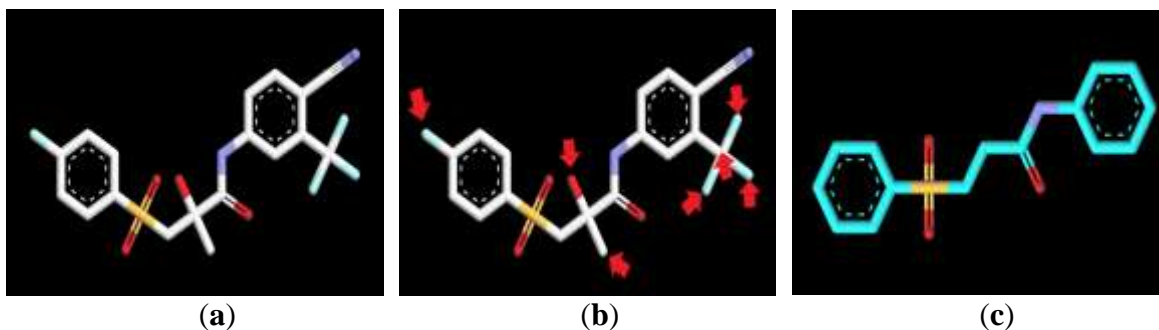
**Figura 29.** Análisis estructural de enlaces de ASH/DIF ORI-M y ASH/DIF DOC-M. (a y b) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/DIF ORI-M; (c y d) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/DIF DOC-M; e: Descripción del enlace halógeno en el fenómeno del acoplamiento molecular en la interfaz ASH/DIF DOC-M; f: Formación de enlace halógeno e hidrógeno-carbono en el complejo ASH/DIF DOC-M; En las figuras 3D (a–d y f) DIF ORI-M en cian; DIF DOC-M en salmón; ASH en verde bosque, el código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D; En la figura 2D (e) PES electronegativo en rojo, PES electropositivo en azul, PES electropositivo con valores cercanos a 0 en verde, PES electronegativo con valores cercanos a 0 en amarillo; C: carbono, H: Hidrógeno, N: Nitrógeno, X: átomo halógeno.

Por otra parte, en un enfoque estérico, el grupo carboxilato está cargado negativamente y puede hacer interacción con grupos donadores en la cavidad del receptor. Sin embargo, al realizar un análisis visual, el grupo carboxilato no presenta enlaces; al calcular el volumen atómico de los oxígenos cargados, se determinó que tiene un volumen suficiente que impide que el ligando penetre en su totalidad en la cavidad e interfiere con el acomodo espacial del ligando en la cavidad. En consecuencia, el programa no detecta enlaces del grupo carboxilato en la cavidad, Figura 30.



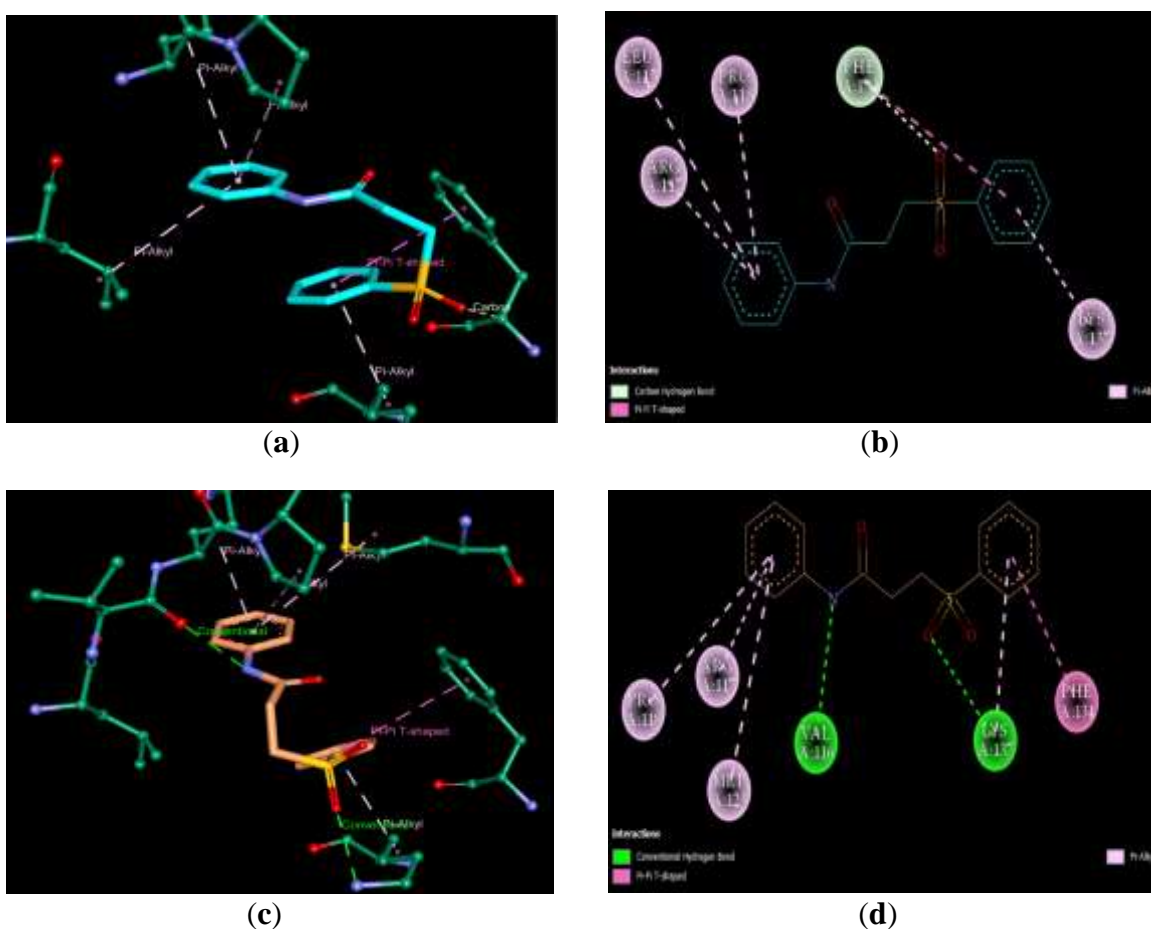
**Figura 1.** Análisis estructural estérico de ASH/DIF ORI-M y ASH/DIF DOC-M. DIF ORI-M: cian; DIF DOC-M: salmón; ASH: verde bosque; Superficie de interfaz SES de la cavidad de ASH: azul cielo; radios de vdW de los grupos carboxilatos: guinda.

En adición, se estudió la influencia electrostática de donadores y aceptores en el ligando modificado bicatulamida BIC ORI-M (Figura 31), en donde se eliminaron los átomos de flúor para evitar errores en el análisis, así como puentes de hidrógeno que se forman en aceptores y donadores específicos en BIC ORI (Figura S5 a).



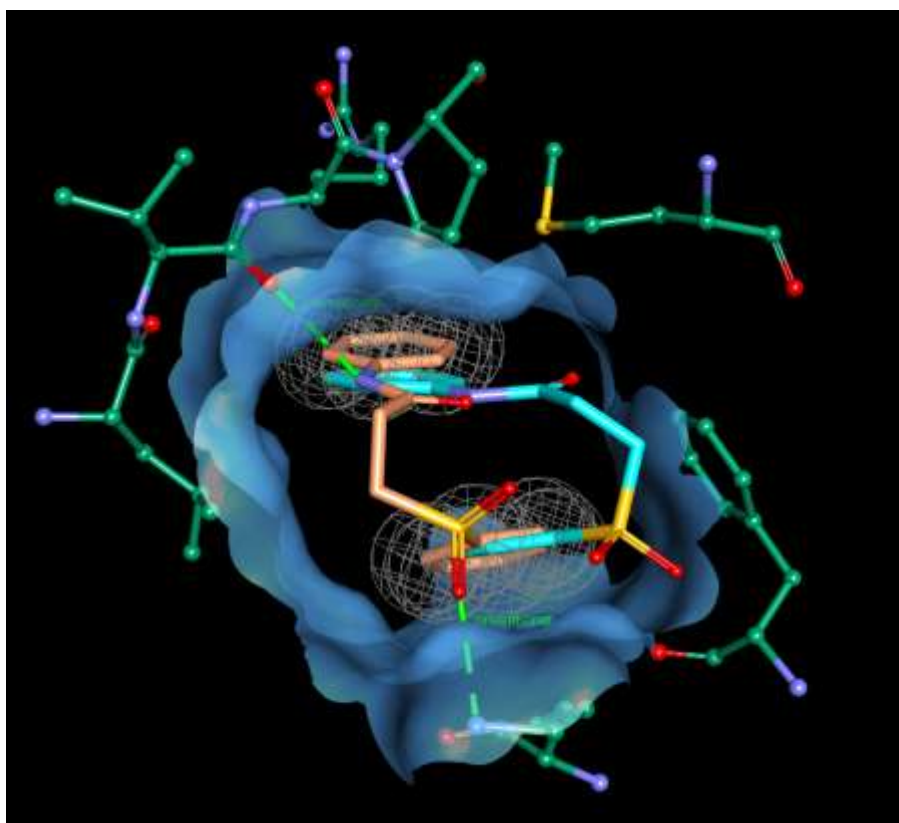
**Figura 30.** Modificación de BIC. (a) Estructura de BIC en blanco; (b) Localización de las modificaciones en BIC; (c) BIC modificada en cian; Flechas rojas: señalan los átomos que se eliminan de la estructura.

En el complejo ASH/BIC ORI-M, se detectó un enlace carbono hidrógeno (Figura 32 a y b). Sin embargo, en la predicción del acoplamiento, la conformación del ligando BIC DOC-M es orientada hacia dos puentes de hidrógeno convencionales en la interfaz del complejo ASH/BIC DOC-M (Figura 32 c y d). Los resultados señalan que a pesar de la remoción de átomos que forman puentes de hidrógeno, la función de puntuación del programa predice la posición y conformación del ligando hacia interacciones electrostáticas por puentes de hidrógeno (véase sección 8.1).



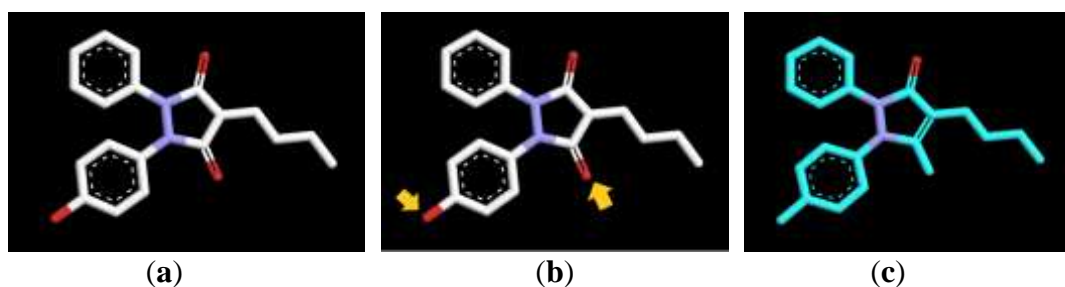
**Figura 31.** Análisis estructural de enlaces de ASH/BIC ORI-M y ASH/BIC DOC-M. (a y b) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/BIC ORI-M; (c y d) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/BIC DOC-M; BIC ORI-M en cian; BIC DOC-M en salmón; ASH en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.

Desde un enfoque estérico, cabe resaltar que la función de puntuación del programa de acoplamiento AD4, no detecta el área SAS y en consecuencia las ecuaciones del algoritmo no resuelven contactos de área enterrada SAS (c. f. sección 8.2). Sin embargo, la conformación y orientación de los ligandos BIC ORI-M y BIC DOC-M en la cavidad de ASH, presenta una superficie de interfaz enterrada SAS en ASH/BIC ORI-M y ASH/BIC DOC-M de 344.9 y 387.4 Å<sup>2</sup>, respectivamente. El programa no solo tiende a posicionar el ligando hacia puentes de hidrógeno, si no que yuxtapone estéricamente el ligando en la cavidad con mayor área enterrada SAS, en donde el programa forma un acomodo espacial del ligando BIC ORI-M, en el que interviene el volumen molecular que presentan los anillos aromáticos. A pesar de que las superficies vdW de los anillos aromáticos son menores que su área SAS, forman un pivote para posicionar el ligando hacia puentes de hidrógeno y a su vez hacia una mayor interfaz en la cavidad, Figura 33.



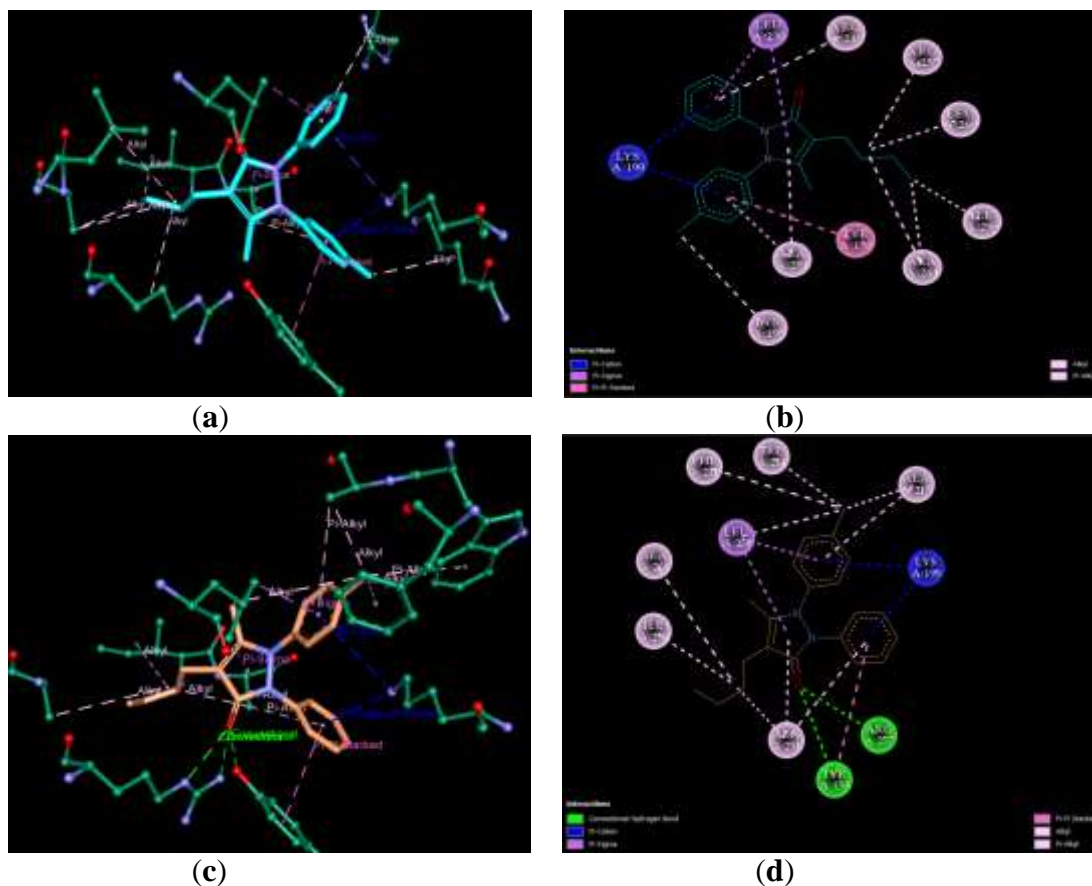
**Figura 32.** Análisis estructural estérico de los anillos aromáticos de BIC ORI-M y BIC DOC-M. BIC ORI-M, en cian; BIC DOC-M, en salmón; ASH, en verde bosque; Superficie de interfaz SES de la cavidad de ASH: azul cielo; Puentes de hidrógeno convencionales: verde limón; superficie molecular vdW de los anillos aromáticos del ligando BIC DOC-M, líneas grises en forma de malla.

Para elucidar el fenómeno de acoplamiento molecular electrónico de los enlaces  $\pi$ -catión, se realizó el estudio del análisis estructural en la influencia de la formación de puentes de hidrógeno, en donde se realizó la primer modificación del ligando oxifenbutazona OXI ORI (Figura S6 a), con el fin de determinar si los átomos aceptores de OXI ORI-M1 (Figura 34) en el acoplamiento se orientan hacia una zona específica de donadores cargados de arginina y un OH de una tirosina para la formación de puentes de hidrógeno, así como el efecto electrónico que influye en el área enterrada SAS.



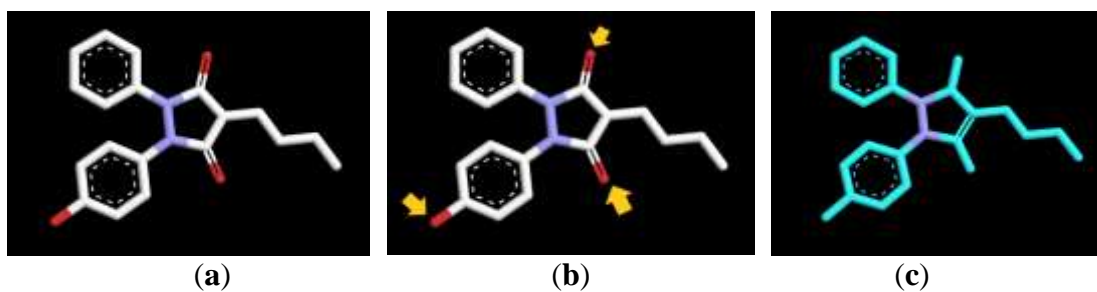
**Figura 33.** Modificación 1 de OXI. (a) Estructura de OXI en blanco; (b) Localización de las modificaciones en OXI; (c) OXI modificada 1 en cyan; Flechas naranjas: señalan los átomos que se sustituyen por carbonos en la estructura.

En el análisis de la mejor pose predicha por el AM de OXI DOC-M, muestra que en la interfaz de ASH/OXI DOC-M el oxígeno aceptor adyacente al átomo modificado cambia de posición  $\approx 180^\circ$  orientándose hacia los átomos donadores. De manera análoga, los anillos aromáticos cambian de posición  $\approx 180^\circ$  en una orientación similar a ASH/OXI ORI-M (Figura 35 c y d) para formar dos enlaces  $\pi$ -catión tal como se presenta en los complejos ASH/OXI ORI y ASH/OXI DOC (Figura S6). Los resultados demuestran que el fenómeno de acoplamiento molecular electrónico en los enlaces  $\pi$ -catión, es debido a que la función de puntuación del programa no detecta la superficie electrostática de los anillos aromáticos (véase sección 8.1 y Figura 29) y yuxtapone los anillos aromáticos hacia átomos cargados positivos por volumen molecular.



**Figura 34.** Análisis estructural de enlaces de ASH/OXI ORI-M1 y ASH/OXI DOC-M1. (a y b) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/OXI ORI-M1; (c y d) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/OXI DOC-M1; OXI ORI-M1 en cian; OXI DOC-M1 en salmón; ASH en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.

Para corroborar el fenómeno de acoplamiento molecular electrónico de los enlaces  $\pi$ -catión, se realizó una segunda modificación del ligando oxifenilbutazona OXI ORI, (Figura 36). En la interfaz ASH/OXI ORI-M2 se forman dos enlaces  $\pi$ -catión, en donde dos anillos aromáticos en el ligando se orientan hacia una lisina en el receptor tal como se presenta en el complejo ASH/OXI ORI-M1. (Figura S23 a).

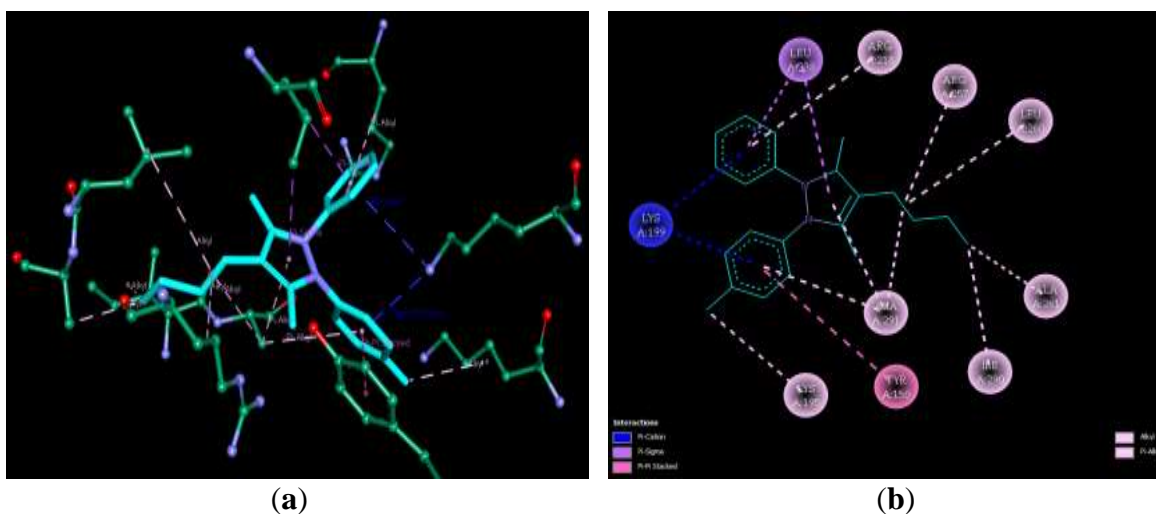


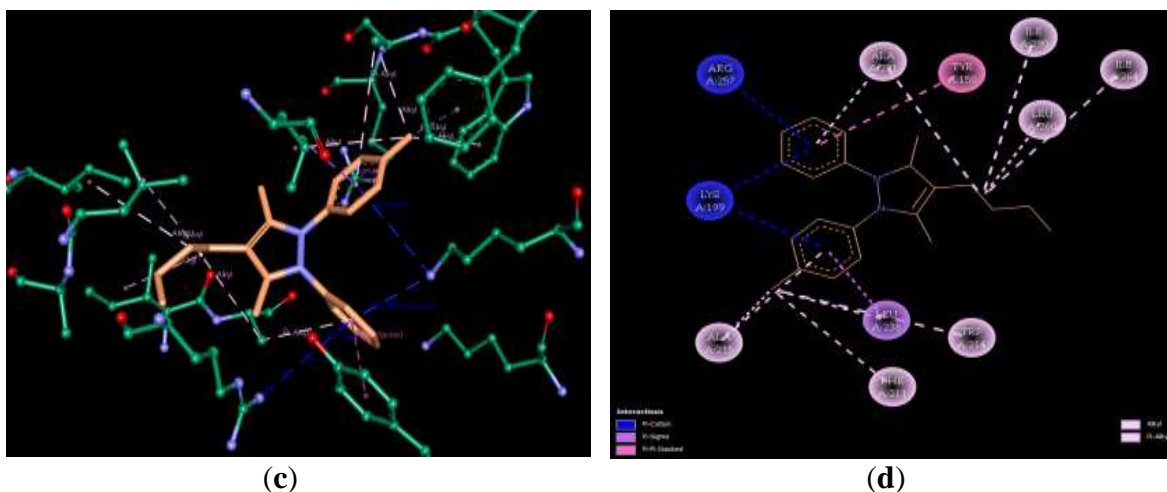
**Figura 35.** Modificación 2 de OXI. (a) Estructura de OXI en blanco; (b) Localización de las modificaciones en OXI; (c) Modificación 2 de OXI en cyan; Flechas naranjas: señalan los átomos que se sustituyen por carbonos en la estructura.

Con el fin de determinar si los anillos aromáticos de OXI ORI-M2 se orientan hacia otros donadores cargados, se removieron todos los oxígenos para descartar errores en el acoplamiento hacia la formación de puentes de hidrógeno.

El análisis de la mejor pose predicha por el docking, muestra que en la interfaz ASH/OXI DOC-M2 (Figura 37 c y d), los anillos aromáticos del ligando se orientan ligeramente hacia un grupo cargado  $\text{NH}_3^+$  de una arginina sin perder la posición para la formación de enlaces del grupo cargado  $\text{NH}_3^+$  de la lisina, de manera análoga a la interfaz ASH/OXI ORI-M2 (Figura 35 c y d).

La orientación espacial de la posición y conformación del ligando hacia la formación de enlaces  $\pi$ -catión se atribuye a los fenómenos de acoplamiento molecular estérico y electrónico, debido al considerable volumen molecular de los anillos aromáticos que se determinaron en el cálculo.

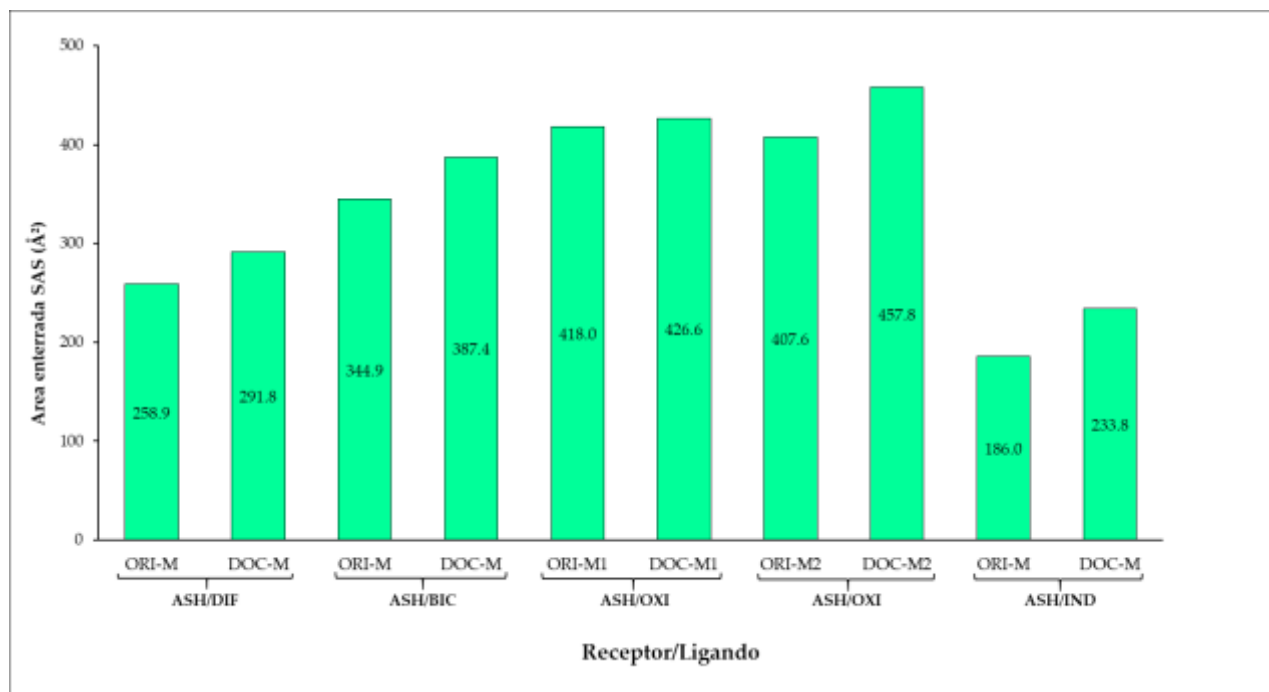




**Figura 36.** Análisis estructural de enlaces de ASH/OXI ORI-M2 y ASH/OXI DOC-M2. (a y b) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/OXI ORI-M2; (c y d) Imágenes 3D y 2D, respectivamente de IRL de ASH/OXI DOC-M2; OXI ORI-M2 en cian; OXI DOC-M2 en salmón; ASH en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.

### 8.6. Análisis de áreas SAS de interfaz en las C-R/L-Ms

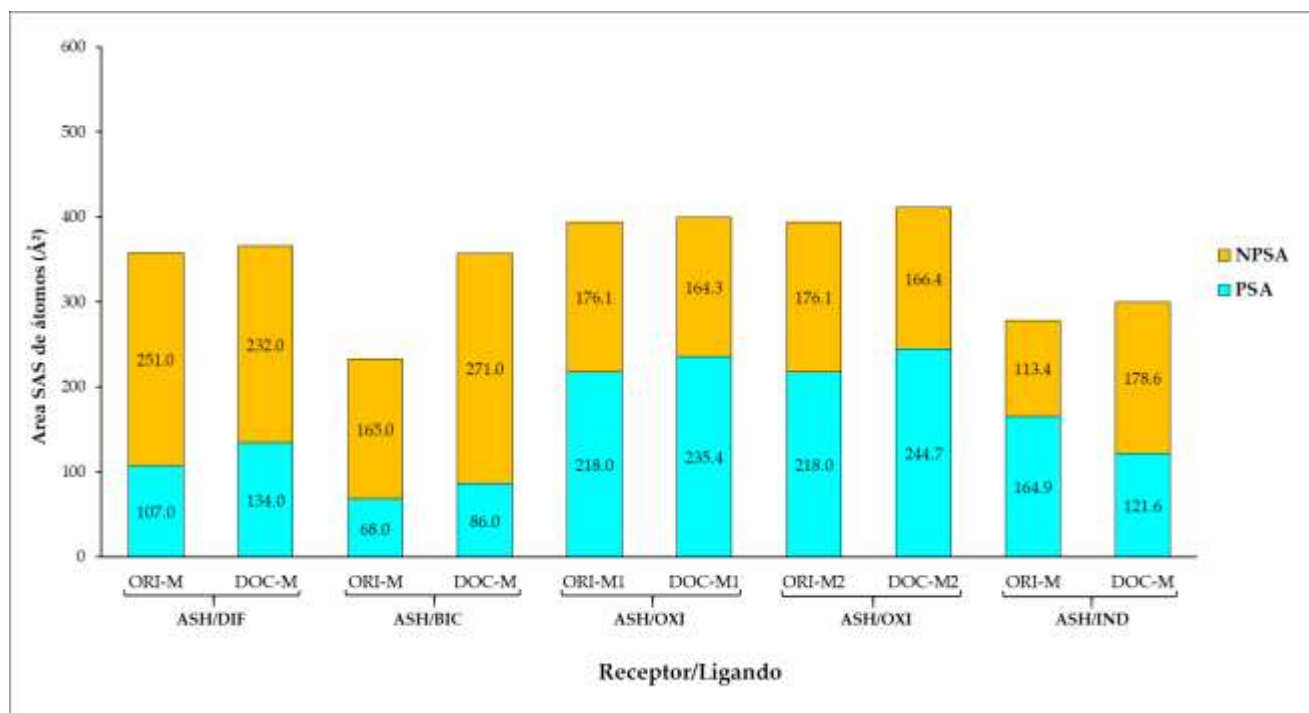
Los análisis de interfaz de área enterrada SAS de los complejos estructurales de ligandos modificados se presentan en la Figura 38, en donde se muestra una mayor interfaz en las interacciones determinadas por DOC-M en comparación a ORI-M.



**Figura 37.** Área de interfaz enterrada SAS de las C-R/L-Ms.

El área enterrada de interfaz SAS en los complejos estructurales de ligandos modificados muestra el mismo patrón que en ligandos no modificados (Véase sección 8.2). El área enterrada SAS, indica el acomodo espacial de la superficie molecular de la posición y conformación de los ligandos ORI-M y DOC-M. En la que el programa realiza una predicción en donde yuxtapone la interfaz ASH/DOC-M.

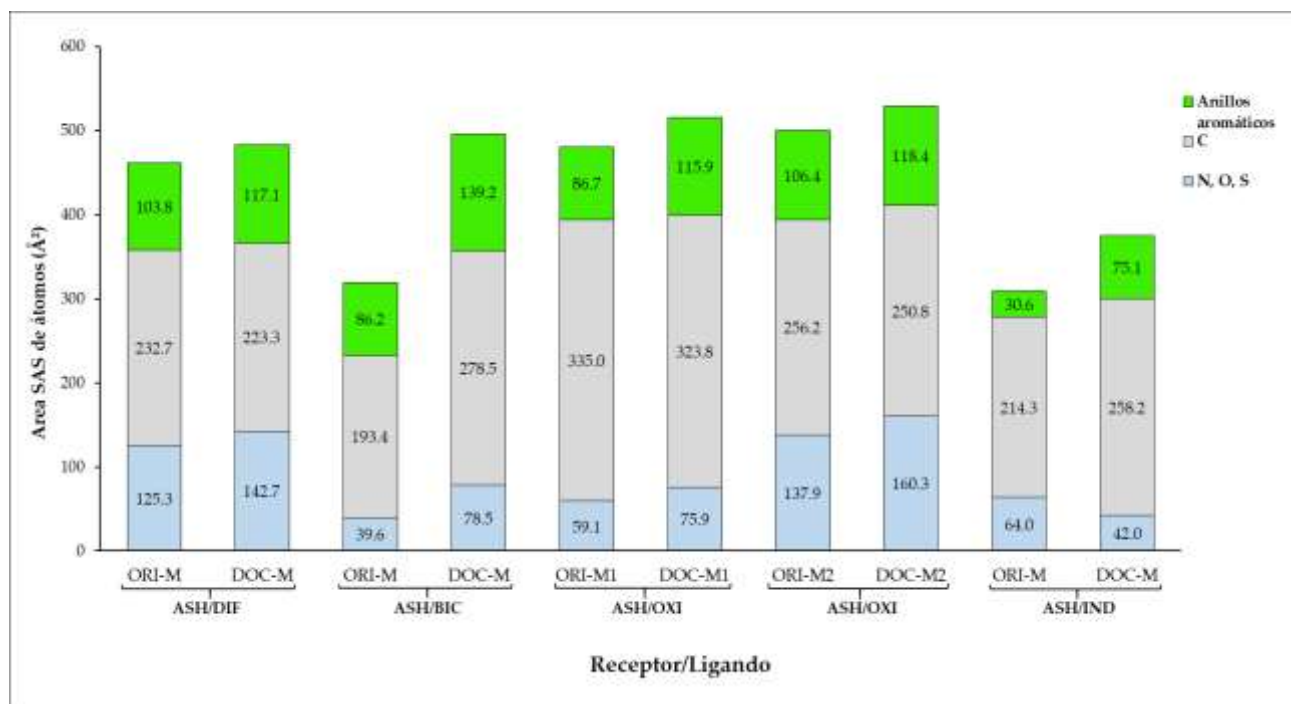
Sin embargo, el área enterrada SAS no brinda suficiente información hacia que superficies con características inherentes químicas de la cavidad tienen contacto los ligandos DOC-M. De acuerdo a la sección (véase sección 8.2), se calculó con el script descrito anteriormente el área SAS de los átomos que componen a los residuos de aminoácidos polares y no polares que forman el área enterrada SAS, Figura 39.



**Figura 38.** Área de interfaz SAS de los átomos que componen a los residuos polares y no polares de las C-R/L-Ms. PSA: Área polar (cian); NPSA: Área no polar (naranja).

De la misma manera que en las interfaces con ligandos no modificados, los cálculos de superficie de átomos clasificados por residuos polares y no polares muestran que las cavidades de la proteína ASH para los complejos DOC-M tienen mayor superficie de interfaz hacia los átomos que componen a los residuos polares, en donde estos patrones se

repiten en todos los complejos analizados con ligandos modificados para DOC, por ende, el fenómeno de acoplamiento tiende a inclinarse hacia residuos polares. Sin embargo, para determinar hacia que átomos tiende a acomodar el AM la posición y conformación de los ligandos modificados. Se realizó el cálculo con el script descrito anteriormente, la suma del área SAS de los átomos polares (N, O, P), no polares (carbonos de los residuos, incluyendo anillos aromáticos) y carbonos de residuos aromáticos, los cuales se presentan en la Figura 40.

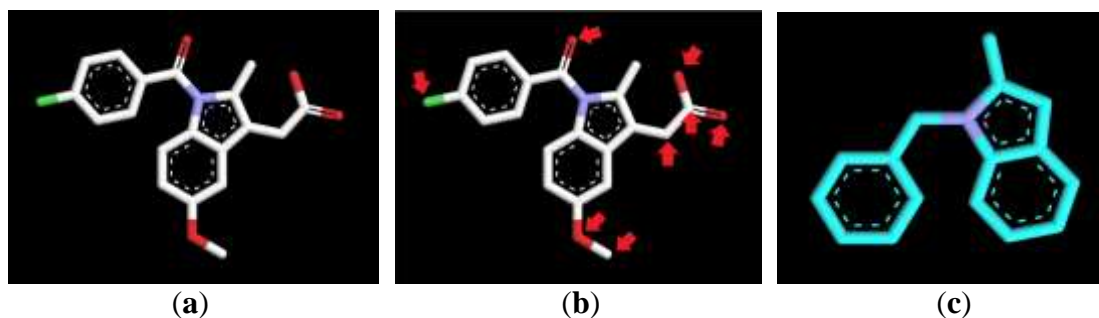


**Figura 39.** Área de interfaz SAS de los átomos polares, carbonos y anillos aromáticos de las C-R/L-Ms. SAS de átomos polares (N, O, S): azul cielo; SAS de carbonos totales: gris; SAS de carbonos de anillos aromáticos: verde.

De manera análoga a los complejos estructurales con ligandos sin modificar, se identificó el aumento de SAS de los átomos polares en los complejos con DOC-M, dicho aumento se atribuye al fenómeno del acoplamiento molecular electrónico (véase sección 8.1).

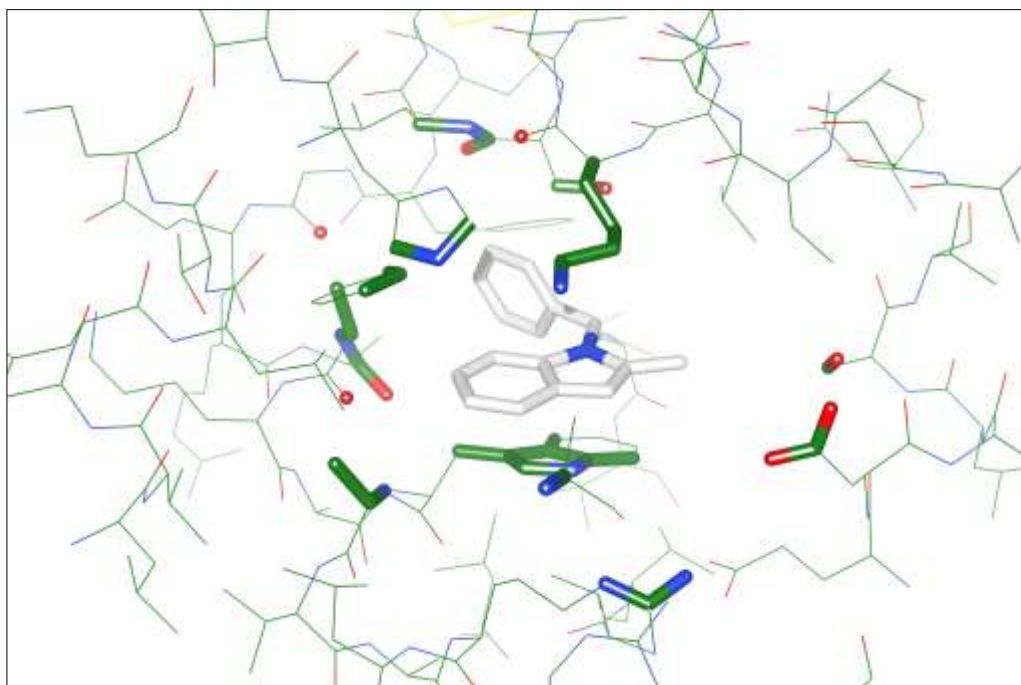
En el estudio del fenómeno del acoplamiento molecular en los anillos aromáticos presenta un aumento de SAS en DOC-M, tal como se presenta en la sección 8.2. En adición, se identificó un decremento de área SAS en los átomos no polares en DOC, a excepción de la interfaz ASH/IND DOC-M.

En un enfoque de interfaz de área enterrada SAS, se estudió el fenómeno de acoplamiento molecular estérico, del ligando modificado indometacina IND ORI-M. En donde se fragmento IND hasta reducirla en anillos aromáticos para el estudio de la influencia del volumen molecular de los carbonos aromáticos en la interfaz (Figura 41).

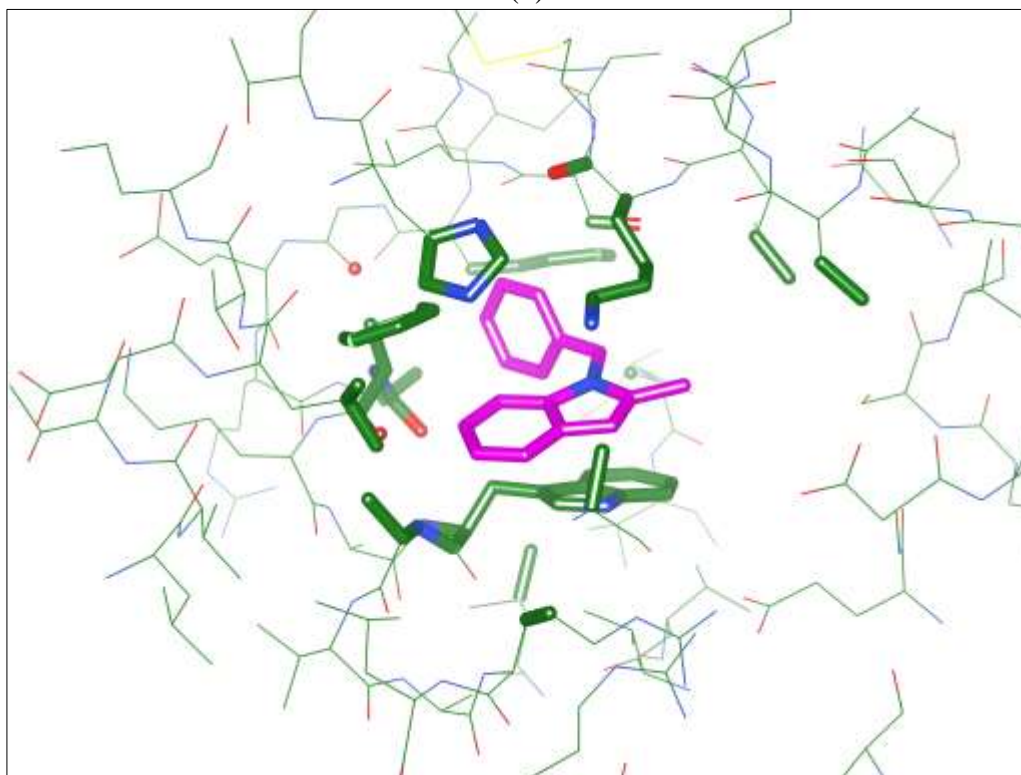


**Figura 40.** Modificación de IND. (a) Estructura de IND en blanco; (b) Localización de las modificaciones en IND; (c) IND modificada en cian; Flechas rojas: señalan los átomos que se eliminan de la estructura.

En el análisis de la mejor pose predicha por el AM de IND ORI-M, muestra que en la interfaz ASH/IND DOC-M se presenta un mayor número de contactos hacia átomos de carbono, átomos de carbono que componen anillos aromáticos y un menor número de contactos hacia átomos polares (Figura 42 b). Cabe señalar que el ligando modificado IND que carece de átomos polares, en la simulación del AM pierde afinidad hacia contactos con superficies de átomos polares, en donde el programa yuxtapone la posición y conformación de IND ORI-M hacia un mayor número de contactos de superficies de átomos de carbono, en donde se atenúa el efecto electrónico y se comprueba el fenómeno del acoplamiento molecular estérico, Figura 42.



(a)

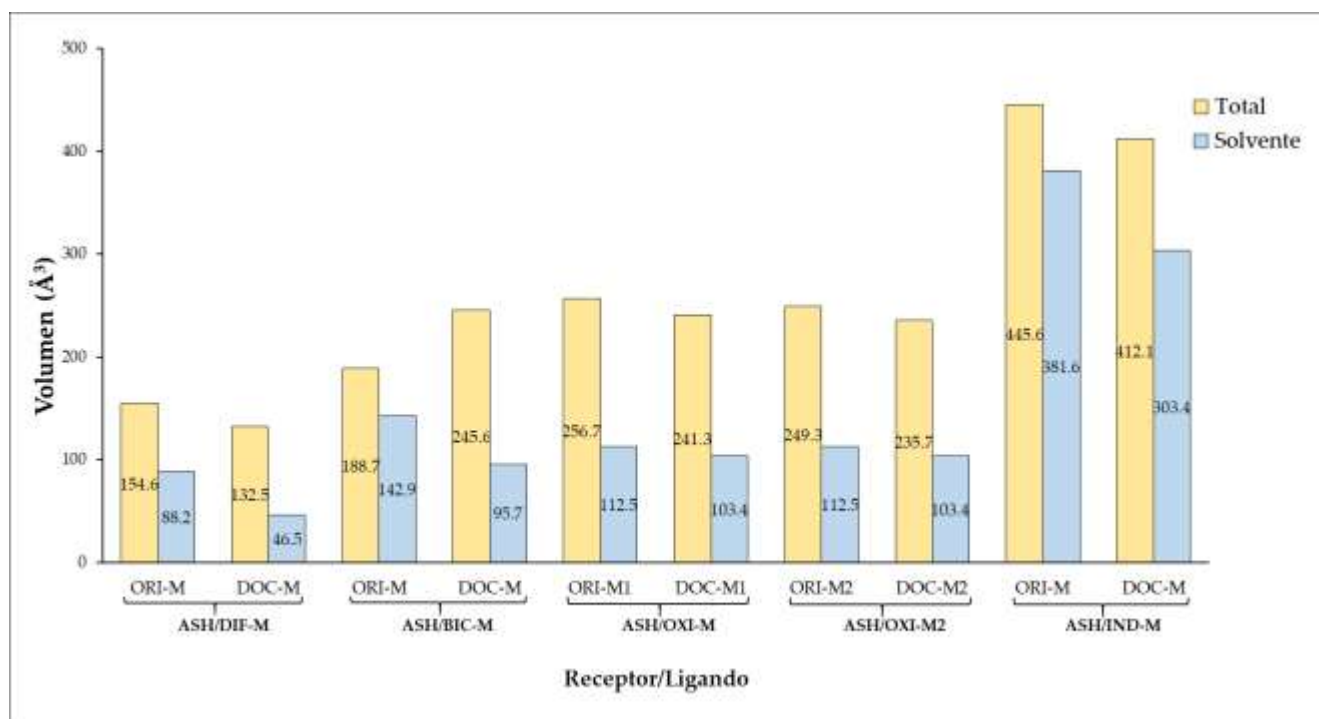


(b)

**Figura 41.** Contactos de las superficies atómicas que forman el área enterrada SAS de ASH/IND. (a) ASH/IND ORI-M y (b) ASH/IND DOC-M. Los contactos de las superficies atómicas que forman el área enterrada SAS de la cavidad de ASH con IND ORI-M y DOC se muestran en forma de bastones; Los átomos de los residuos que no forman interfaz se muestran en forma de cables; ASH en verde bosque; IND ORI-M en blanco; IND DOC-M en magenta.

### 8.7. Análisis de volúmenes de interfaz en las C-R/L-Ms

Los cálculos de volúmenes de las interfaces C-R/L-M se presentan en la Figura 43, en donde las cavidades de los receptores en interfaz con los ligandos modificados de los complejos estructurales analizados presentan en DOC-M un menor volumen total y de solvente que en los complejos ORI-M, el cual comprueba una mayor interfaz en los complejos DOC como se presenta en la Figura 19.

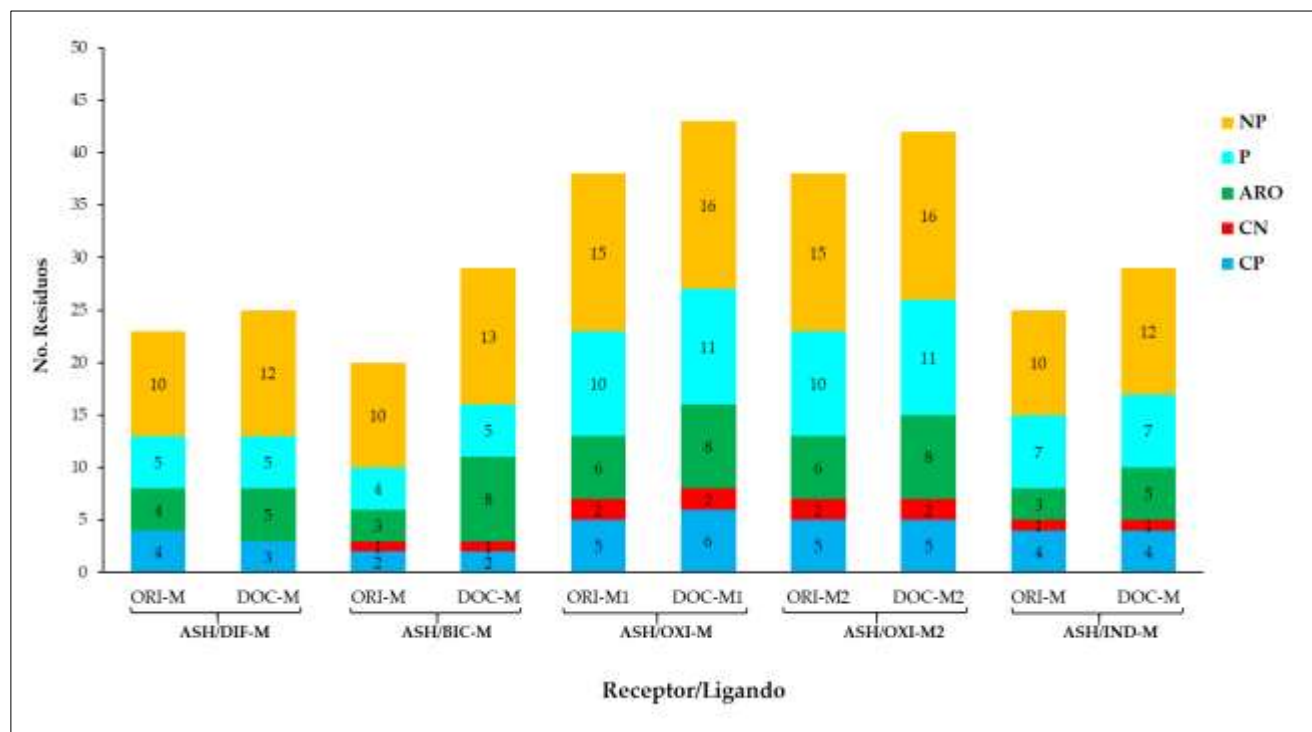


**Figura 42.** Volúmenes de interfaz de las C-R/L-Ms. Total: Volumen total en la interfaz de la C-R/L-M (Amarillo); Solvente: Volumen predicho del solvente en la interfaz de la C-R/L-M con un radio de  $=1.4 \text{ \AA}$  de formación de esferas que equivalen a moléculas de agua (Azul).

### 8.8. Análisis de residuos en las C-R/L-Ms

En la Figura 44, se presentan los residuos que participan en las interfaces del área enterrada SAS de las C-R/L-Ms, descritos y clasificados de acuerdo a la sección 8.3, en donde se descartaron las cisteínas ya que no presentaron patrones fijos de interacción, por lo que se consideró en el cálculo para los residuos que participan en las interfaces del área

enterrada SAS de las C-R/L-Ms los átomos polares (N, O, S), carbonos totales y carbonos que forman anillos aromáticos.



**Figura 43.** Residuos de las C-R/L-Ms que forman la interfaz del área enterrada SAS. NP: no polares; P: polares; ARO: aromáticos (Phe, His, Tyr, Trp); CN: cargados negativos; CP: cargados positivos.

En el mismo sentido que en el análisis de residuos que participan en las interfaces del área enterrada SAS de las C-R/Ls, se determinó un incremento de residuos polares en la mayoría de los complejos estructurales analizados, el cual se debe al fenómeno de acoplamiento molecular estérico, en donde en la interfaz se presenta una mayor cantidad de residuos hidrófobos aromáticos y residuos polares, tal como se presenta en la Figura 22. En el complejo ASH/IND ORI-M no se presenta un incremento de residuos polares debido a la remoción de átomos polares en el ligando IND. Los resultados demuestran que incluso en los ligandos modificados presentan patrones similares en donde el AM tiende a yuxtaponer la posición y conformación del ligando hacia átomos polares y carbonos que componen a los anillos aromáticos.

## IX. CONCLUSIONES

El amplio estudio desarrollado y enfocado a encontrar nuevas interacciones que el acoplamiento molecular resuelve indirectamente nos llevó a determinar interacciones de importancia biológica. Hasta la fecha permanecía poco claro para los usuarios hacia qué tipo de interacciones moleculares e interfaces el software tiende a yuxtaponer el arreglo espacial de los ligandos en las cavidades en términos átomo-átomo y superficie-superficie.

En el presente trabajo se ha desarrollado un método con cierto grado de complejidad que determina interfaces que subyacen en el acoplamiento molecular basados en scripts, modificación de scripts y algoritmos ya establecidos. Dichas interfaces se basan en el fenómeno del acoplamiento molecular electrónico que implica superficies de átomos de carga opuesta y halógenos, así como interfaces de superficies que se traslapan (área enterrada) en donde la variable SAS no es considerada por el programa.

La resolución de estos fenómenos nos llevó a determinar otro panorama del acoplamiento molecular desde un punto de vista quimiométrico a escala atómica.

Finalmente, los residuos identificados con el script diseñado podrían ser sitios de interacción de potencial de importancia para contribuir en el diseño de antivirales destinados a la inhibición del agente biológico SARS Cov-2 y, por otro lado, ser determinantes moleculares importantes en las ASH con funciones biológicas específicas. Por lo que podrían ser estudiados en diversas áreas como la proteómica, *in silico*, biología molecular, industria farmacéutica y simulaciones moleculares que demandan alto rendimiento como dinámicas moleculares.

## X. REFERENCIAS

- Mahadevi and G. N. Sastry. Cation- $\pi$  Interaction: Its Role and Relevance in Chemistry, Biology, and Material Science, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 2100—2138
- Abagyan, R., & Totrov, M. (2001). High-throughput docking for lead generation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 375–382. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00217-9](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00217-9)
- Agarwal S, Mehrotra R (2016) An overview of Molecular Docking. *JSM Chem* 4(2): 1024.
- Alberg, D. G., & Schreiber, S. L. (1993). Structure-based design of a cyclophilin-calcineurin bridging ligand. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5131), 248–250. <https://doi.org/10.1126/science.8211144>
- Aliakbar Tehrani, Z., Kim, K. S.. *Int. J. Quantum Chem.* 2016, 116, 622– 633. DOI: 10.1002/qua.25109
- Al-Shabib, N. A., Khan, J. M., Ali, M. S., Al-Lohedan, H. A., Khan, M. S., Al-Senaity, A. M., Husain, F. M., & Shamsi, M. B. (2017). Exploring the mode of binding between food additive “butylated hydroxytoluene (BHT)” and human serum albumin: Spectroscopic as well as molecular docking study. *Journal of Molecular Liquids*, 230, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.066>
- Andersson, C. D., Chen, B. Y., & Linusson, A. (2010). Mapping of ligand-binding cavities in proteins. *Proteins*, 78(6), 1408–1422. <https://doi.org/10.1002/prot.22655>
- Andrews, P. R., Craik, D. J., & Martin, J. L. (1984). Functional group contributions to drug-receptor interactions. *Journal of medicinal chemistry*, 27(12), 1648–1657. <https://doi.org/10.1021/jm00378a021>
- Armstrong, M. S., Morris, G. M., Finn, P. W., Sharma, R., Moretti, L., Cooper, R. I., & Richards, W. G. (2010). ElectroShape: fast molecular similarity calculations incorporating shape, chirality and electrostatics. *Journal of computer-aided molecular design*, 24(9), 789–801. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9374-0>
- Auffinger, Pascal et al. “Halogen bonds in biological molecules.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 101,48 (2004): 16789-94. doi:10.1073/pnas.0407607101
- Baud, D., Qi, X., Nielsen-Saines, K., Musso, D., Pomar, L., & Favre, G. (2020). Real estimates of mortality following COVID-19 infection. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(7), 773. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30195-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30195-X)
- Berman, H. M. (2008). The Protein Data Bank: A historical perspective. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 64(1), 88–95. <https://doi.org/10.1107/S0108767307035623>
- Bitencourt-Ferreira, G., Pintro, V. O., & de Azevedo, W. F., Jr (2019). Docking with AutoDock4. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2053, 125–148. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_9)
- Böhm H-J, Klebe G (1996) What can we learn from molecular recognition in protein-ligand complexes for the design of new drugs? *Angew Chem Int Ed Engl* 35:2588–2614
- Boland, A., Chang, L., & Barford, D. (2017). The potential of cryo-electron microscopy for structure-based drug design Introduction: context and history of structure-based drug design. *Essays in Biochemistry*, 61(September), 543–560. <https://doi.org/10.1042/EBC20170032>
- Bongrand, P. (1999). Ligand-receptor interactions. *Reports on Progress in Physics*, 62(6), 921–968. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/62/6/202>
- Bonneau, R., & Baker, D. (2001). Ab initio protein structure prediction: progress and prospects. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 30, 173–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.173>
- Bosshard, H. R., Marti, D. N., & Jelesarov, I. (2004). Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of molecular recognition : JMR*, 17(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/jmr.657>
- Branden C & Tooze J (1999) *Introduction to Protein Structure*, 2nd edn. New York: Garland Publishing.
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr, Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Karplus, M. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*, 30(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Budin, N., Majeux, N., & Caflisch, A. (2001). Fragment-Based flexible ligand docking by evolutionary optimization. *Biological chemistry*, 382(9), 1365–1372. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.168>

- Burley, S. K., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Capel, M., Chance, M. R., Gaasterland, T., Lin, D., Sali, A., Studier, F. W., & Swaminathan, S. (1999). Structural genomics: beyond the human genome project. *Nature genetics*, 23(2), 151–157. <https://doi.org/10.1038/13783>
- Burley, S., & Petsko, G. (1985). Aromatic-Aromatic Interaction: A Mechanism of Protein Structure Stabilization. *Science*, 229(4708), 23–28. Retrieved February 20, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/1695415>
- Caballero, D., Virrueta, A., O'Hern, C. S., & Regan, L. (2016). Steric interactions determine side-chain conformations in protein cores. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 29(9), 367–376. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw027>
- Carl Henrik Görbitz (2018) Basics of molecular recognition, 1st edition, Crystallography Reviews, 24:1, 67–69, DOI: 10.1080/0889311X.2017.1327521
- Carter, D. C., & Ho, J. X. (1994). Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry*, 45, 153–203. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60640-3](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60640-3)
- Castrense Savojarado, Pier Luigi Martelli, Rita Casadio. Protein–Protein Interaction Methods and Protein Phase Separation. Annual Review of Biomedical Data Science 2020 3:1, 89–112
- Castro-Alvarez, A., Costa, A. M., & Vilarrasa, J. (2017). The Performance of several docking programs at reproducing protein-macrolide-like crystal structures. *Molecules*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010136>
- Cerný J, Hobza P. Non-covalent interactions in biomacromolecules. Physical Chemistry Chemical Physics :PCCP. 2007 Oct;9(39):5291–5303. DOI: 10.1039/b704781a.
- Chahal, V., Nirwan, S. & Kakkar, R. (2019). Combined approach of homology modeling, molecular dynamics, and docking: computer-aided drug discovery. *Physical Sciences Reviews*, 4(10). <https://doi.org/10.1515/psr-2019-0066>
- Chandel, T. I., Zaman, M., Khan, M. V., Ali, M., Rabbani, G., Ishtikhar, M., & Khan, R. H. (2018). A mechanistic insight into protein-ligand interaction, folding, misfolding, aggregation and inhibition of protein aggregates: An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1115–1129. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.185>
- Chau, P. L., & Dean, P. M. (1994). Electrostatic complementarity between proteins and ligands. 1. Charge disposition, dielectric and interface effects. *Journal of computer-aided molecular design*, 8(5), 513–525. <https://doi.org/10.1007/BF00123663>
- Chen, Y., & Shoichet, B. K. (2009). Molecular docking and ligand specificity in fragment-based inhibitor discovery. *Nature chemical biology*, 5(5), 358–364. <https://doi.org/10.1038/nchembio.155>
- Chothia C. (1976). The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *Journal of molecular biology*, 105(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90191-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90191-1)
- Coupez, B., & Lewis, R. A. (2006). Docking and scoring--theoretically easy, practically impossible?. *Current medicinal chemistry*, 13(25), 2995–3003. <https://doi.org/10.2174/092986706778521797>
- D. A. Dougherty Cation– $\pi$  Interactions Involving Aromatic Amino Acids, *J. Nutr.*, 2007, **137**, 1504S —1508S
- Dean, P. M. (1987). *Molecular foundations of drug-receptor interaction*. Cambridge University Press.
- Deeb, O., Rosales-Hernández, M. C., Gómez-Castro, C., Garduño-Juárez, R., & Correa-Basurto, J. (2010). Exploration of human serum albumin binding sites by docking and molecular dynamics flexible ligand - Protein interactions. *Biopolymers*, 93(2), 161–170. <https://doi.org/10.1002/bip.21314>
- Desaphy, J., Bret, G., Rognan, D., & Kellenberger, E. (2015). sc-PDB: a 3D-database of ligandable binding sites--10 years on. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D399–D404. <https://doi.org/10.1093/nar/gku928>
- Diller, D. J., & Merz, K. M., Jr (2001). High throughput docking for library design and library prioritization. *Proteins*, 43(2), 113–124. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010501\)43:2<113::aid-prot1023>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010501)43:2<113::aid-prot1023>3.0.co;2-t)
- Diller, D.J., & Verlinde, C.L. (1999). A critical evaluation of several global optimization algorithms for the purpose of molecular docking. *J. Comput. Chem.*, 20, 1740–1751
- Długosz, M., & Trylska, J. (2008). Electrostatic similarity of proteins: application of three dimensional spherical harmonic decomposition. *The Journal of chemical physics*, 129(1), 015103. <https://doi.org/10.1063/1.2948414>

- Dockal, M., Carter, D. C., & Rüker, F. (1999). The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *The Journal of biological chemistry*, 274(41), 29303–29310. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29303>
- Dong F, Zhou HX. Electrostatic contribution to the binding stability of protein-protein complexes. *Proteins*. 2006 Oct 1;65(1):87-102. doi: 10.1002/prot.21070. PMID: 16856180
- Dos Santos, R. N., Ferreira, L. G., & Andricopulo, A. D. (2018). Practices in Molecular Docking and Structure-Based Virtual Screening. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1762, 31–50. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7_3)
- Du, S., Cao, Y., Zhu, Q., Yu, P., Qi, F., Wang, G., Du, X., Bao, L., Deng, W., Zhu, H., Liu, J., Nie, J., Zheng, Y., Liang, H., Liu, R., Gong, S., Xu, H., Yisimayi, A., Lv, Q., Wang, B., Qin, C. (2020). Structurally Resolved SARS-CoV-2 Antibody Shows High Efficacy in Severely Infected Hamsters and Provides a Potent Cocktail Pairing Strategy. *Cell*, 183(4), 1013–1023.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.035>
- Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., Ji, X. L., & Liu, S. Q. (2016). Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
- Edwards, Y.J.K., Cottage, A. Bioinformatics methods to predict protein structure and function. *Mol Biotechnol* 23, 139–166 (2003). <https://doi.org/10.1385/MB:23:2:139>
- Ekins, S., Kortagere, S., Iyer, M., Reschly, E. J., Lill, M. A., Redinbo, M. R., & Krasowski, M. D. (2009). Challenges predicting ligand-receptor interactions of promiscuous proteins: the nuclear receptor PXR. *PLoS computational biology*, 5(12), e1000594
- Evans T. W. (2002). Review article: albumin as a drug--biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 16 Suppl 5, 6–11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.16.s5.2.x>
- Ewing, T.J., Makino, S., Skillman, A.G. *et al.* DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J Comput Aided Mol Des* 15, 411–428 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1011115820450>
- Ezkurdia, I., Bartoli, L., Fariselli, P., Casadio, R., Valencia, A., & Tress, M. L. (2009). Progress and challenges in predicting protein-protein interaction sites. *Briefings in Bioinformatics*, 10(3), 233–246. <https://doi.org/10.1093/bib/bbp021>
- Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., & Ascenzi, P. (2012). Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular aspects of medicine*, 33(3), 209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>
- Ferreira De Freitas, R., & Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8(10), 1970–1981. <https://doi.org/10.1039/c7md00381a>
- Flower, T. G., Buffalo, C. Z., Hooy, R. M., Allaire, M., Ren, X., & Hurley, J. H. (2020). Structure of SARS-CoV-2 ORF8, a rapidly evolving coronavirus protein implicated in immune evasion. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2020.08.27.270637. <https://doi.org/10.1101/2020.08.27.270637>
- Fogolari, F., Brigo, A., & Molinari, H. (2002). The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *Journal of molecular recognition: JMR*, 15(6), 377–392. <https://doi.org/10.1002/jmr.577>
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols*, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
- Frieden R. Non-covalent interactions: Key to biological flexibility and specificity. *J Chem Educ* 1975;52:754–61.
- Gainza, P., Sverrisson, F., Monti, F., Rodolà, E., Boscaini, D., Bronstein, M. M., & Correia, B. E. (2020). Deciphering interaction fingerprints from protein molecular surfaces using geometric deep learning. *Nature methods*, 17(2), 184–192. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0666-6>
- Gallivan, J. P., & Dougherty, D. A. (1999). Cation-pi interactions in structural biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9459–9464. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9459>

- Galperin M. Y. (2006). The Molecular Biology Database Collection: 2006 update. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D3–D5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj162>
- Gao, M., & Skolnick, J. (2012). The distribution of ligand-binding pockets around protein-protein interfaces suggests a general mechanism for pocket formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), 3784–3789. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117768109>
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., & Ward, C. W. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, 110(6), 763–773. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00940-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00940-6)
- Gohlke, H., & Klebe, G. (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 41(15), 2644–2676. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020802\)41:15<2644::AID-ANIE2644>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020802)41:15<2644::AID-ANIE2644>3.0.CO;2-O)
- Grosdidier, S., & Fernández-Recio, J. (2008). Identification of hot-spot residues in protein-protein interactions by computational docking. *BMC bioinformatics*, 9, 447. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-447>
- Gunasekaran, K., & Nussinov, R. (2007). How different are structurally flexible and rigid binding sites? Sequence and structural features discriminating proteins that do and do not undergo conformational change upon ligand binding. *Journal of molecular biology*, 365(1), 257–273. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.062>
- Guo, Zuojun et al. “Identification of protein-ligand binding sites by the level-set variational implicit-solvent approach.” *Journal of chemical theory and computation* vol. 11,2 (2015): 753–65. doi:10.1021/ct500867u
- Gutteridge, A., & Thornton, J. (2005). Conformational changes observed in enzyme crystal structures upon substrate binding. *Journal of molecular biology*, 346(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.013>
- Habermann, S. M., & Murphy, K. P. (1996). Energetics of hydrogen bonding in proteins: a model compound study. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 5(7), 1229–1239. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050702>
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 47(4), 409–443. <https://doi.org/10.1002/prot.10115>
- Hedger, G., & Sansom, M. S. P. (2016). Lipid interaction sites on channels, transporters and receptors: Recent insights from molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(10), 2390–2400. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.037>
- Hernández-Santoyo, A., Yair, A., Altuzar, V., Vivanco-Cid, H., & Mendoza-Barrera, C. (2013). Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. *Protein Engineering - Technology and Application, Figure 1*. <https://doi.org/10.5772/56376>
- Hill, A. D., & Reilly, P. J. (2015). Scoring functions for AutoDock. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1273, 467–474. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4_27)
- Hill, A. D., & Reilly, P. J. (2015). Scoring functions for AutoDock. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1273, 467–474. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4_27)
- Hlavacek, W. S., Posner, R. G., & Perelson, A. S. (1999). Steric effects on multivalent ligand-receptor binding: exclusion of ligand sites by bound cell surface receptors. *Biophysical journal*, 76(6), 3031–3043. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77456-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77456-4)
- Ho, K. L., McNae, I. W., Schmiedeberg, L., Klose, R. J., Bird, A. P., & Walkinshaw, M. D. (2008). MeCP2 binding to DNA depends upon hydration at methyl-CpG. *Molecular cell*, 29(4), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.028>
- Hol, W. G. J. (1987). Protein crystallography, computer graphics and drug design. *Pure and Applied Chemistry*, 59(3), 431–436. <https://doi.org/10.1351/pac198759030431>
- Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K., Doré, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir, M., & Marshall, F. H. (2013). Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature*, 499(7459), 438–443. <https://doi.org/10.1038/nature12357>
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J. and Goodsell, D. S. (2007), A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation *J. Computational Chemistry*, 28: 1145-1152

- Hunter CA, Singh J, Thornton JM. Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1991 Apr;218(4):837-846. DOI: 10.1016/0022-2836(91)90271-7.
- Imming, P., Sinning, C., & Meyer, A. (2006). Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(10), 821–834. <https://doi.org/10.1038/nrd2132>
- Itoh, Y., Nakashima, Y., Tsukamoto, S. et al. N+–C–H···O Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. *Sci Rep* 9, 767 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36987-9>
- Jacquemard, C., Drwal, M.N., Desaphy, J. et al. Binding mode information improves fragment docking. *J Cheminform* 11, 24 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0346-7>
- Janin J. (1995). Elusive affinities. *Proteins*, 21(1), 30–39. <https://doi.org/10.1002/prot.340210105>
- Jeffrey G.A., Saenger W. (1994) The Importance of Hydrogen Bonds. In: *Hydrogen Bonding in Biological Structures*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-85135-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85135-3_1)
- 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, X., ... Yang, H. (2020). Structure of M<sup>pro</sup> from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 582(7811), 289–293. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
- Jones, S., & Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 13–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.13>
- K. Yakimchuk. Protein receptor-ligand interaction/binding assays. *Mater Methods* 2011;1:199
- Kabsch, W., & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12), 2577–2637. <https://doi.org/10.1002/bip.360221211>
- Kakiuchi, T. Salt bridge in electroanalytical chemistry: past, present, and future. *J Solid State Electrochem* 15, 1661–1671 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10008-011-1373-0>
- Kenakin, T., Bylund, D. B., Toews, M. L., Mullane, K., Winquist, R. J., & Williams, M. (2014). Replicated, replicable and relevant-target engagement and pharmacological experimentation in the 21st century. *Biochemical pharmacology*, 87(1), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.024>
- Kennedy, C. R., Lin, S., & Jacobsen, E. N. (2016). The Cation- $\pi$  Interaction in Small-Molecule Catalysis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 55(41), 12596–12624. <https://doi.org/10.1002/anie.201600547>
- Khazanov, N. A., & Carlson, H. A. (2013). Exploring the composition of protein-ligand binding sites on a large scale. *PLoS computational biology*, 9(11), e1003321. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003321>
- Koebel, M.R., Schmadeke, G., Posner, R.G. et al. AutoDock VinaXB: implementation of XBSF, new empirical halogen bond scoring function, into AutoDock Vina. *J Cheminform* 8, 27 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0139-1>
- Kolb, P., & Irwin, J. (2009). Docking Screens: Right for the Right Reasons? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(9), 755–770. <https://doi.org/10.2174/156802609789207091>
- Konc, J., & Janežič, D. (2014). ProBiS-ligands: A web server for prediction of ligands by examination of protein binding sites. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 215–220. <https://doi.org/10.1093/nar/gku460>
- Kragh-Hansen U. (1981). Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological reviews*, 33(1), 17–53
- Kurczab, R., Śliwa, P., Rataj, K., Kafel, R., & Bojarski, A. J. (2018). Salt Bridge in Ligand-Protein Complexes-Systematic Theoretical and Statistical Investigations. *Journal of chemical information and modeling*, 58(11), 2224–2238. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00266>
- Lange, O. F., Lakomek, N. A., Farès, C., Schröder, G. F., Walter, K. F., Becker, S., Meiler, J., Grubmüller, H., Griesinger, C., & de Groot, B. L. (2008). Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5882), 1471–1475. <https://doi.org/10.1126/science.1157092>
- Laskowski R. A. (1995). SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. *Journal of molecular graphics*, 13(5), 323–308. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(95\)00073-9](https://doi.org/10.1016/0263-7855(95)00073-9)
- Lavecchia, A., & Di Giovanni, C. (2013). Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Current medicinal chemistry*, 20(23), 2839–2860. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990001>

- Leaver-Fay, A., Butterfoss, G. L., Snoeyink, J., & Kuhlman, B. (2007). Maintaining solvent accessible surface area under rotamer substitution for protein design. *Journal of computational chemistry*, 28(8), 1336–1341. <https://doi.org/10.1002/jcc.20626>
- Lee, B., & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *Journal of molecular biology*, 55(3), 379–400. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90324](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90324)
- Lee, D., Redfern, O. & Orengo, C. Predicting protein function from sequence and structure. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 995–1005 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrm2281>
- Lee, E. C., Kim, D., Jurecka, P., Tarakeshwar, P., Hobza, P., & Kim, K. S. (2007). Understanding of assembly phenomena by aromatic-aromatic interactions: benzene dimer and the substituted systems. *The journal of physical chemistry. A*, 111(18), 3446–3457. <https://doi.org/10.1021/jp068635t>
- Lee, P., & Wu, X. (2015). Review: modifications of human serum albumin and their binding effect. *Current pharmaceutical design*, 21(14), 1862–1865.
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K., Lau, E., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., Tu, W., Feng, Z. (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *The New England journal of medicine*, 382(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
- Lincong Wang. The quantification of protein-protein interaction interfaces using solvent-excluded surface-defined properties. *BioRxiv* 294074; doi: <https://doi.org/10.1101/294074>
- Linkuvienė, V., Talibov, V. O., Danielson, U. H., & Matulis, D. (2018). Introduction of Intrinsic Kinetics of Protein-Ligand Interactions and Their Implications for Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(6), 2292–2302. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01408>
- Liolios, K., Tavernarakis, N., Hugenholtz, P., & Kyrpides, N. C. (2006). The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D332–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj145>
- Liu, F., Mu, J., & Xing, B. (2015). Recent advances on the development of pharmacotherapeutic agents on the basis of human serum albumin. *Current pharmaceutical design*, 21(14), 1866–1888. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150302115411>
- Liu, K., Tan, S., Niu, S., Wang, J., Wu, L., Sun, H., Zhang, Y., Pan, X., Qu, X., Du, P., Meng, Y., Jia, Y., Chen, Q., Deng, C., Yan, J., Wang, H. W., Wang, Q., Qi, J., & Gao, G. F. (2021). Cross-species recognition of SARS-CoV-2 to bat ACE2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(1), e2020216118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020216118>
- Lo Conte, L., Chothia, C., & Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of molecular biology*, 285(5), 2177–2198. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2439>
- Lodish, Harvey F. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2000
- Longo, G. S., Thompson, D. H., & Szleifer, I. (2008). Ligand-receptor interactions between surfaces: the role of binary polymer spacers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(18), 10324–10333. <https://doi.org/10.1021/la8009699>
- Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2003). Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5772–5777. <https://doi.org/10.1073/pnas.1030237100>
- Maggio, E. T., & Ramnarayan, K. (2001). Recent developments in computational proteomics. *Drug Discovery Today*, 6(19), 996–1004. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02003-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02003-7)
- Magliery, T.J., Regan, L. Sequence variation in ligand binding sites in proteins. *BMC Bioinformatics* 6, 240 (2005). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-240>
- Marinho, E. M., Batista de Andrade Neto, J., Silva, J., Rocha da Silva, C., Cavalcanti, B. C., Marinho, E. S., & Nobre Júnior, H. V. (2020). Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. *Microbial Pathogenesis*, 104365.
- Martinez, Chelsea R.; Iverson, Brent L. (2012). Rethinking the term "pi-stacking. *Chemical Science*. 3 (7): 2191. doi:10.1039/c2sc20045g. hdl:2152/41033. ISSN 2041-6520
- McConkey, B. J., Sobolev, V., & Edelman, M. (2002). The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*, 83(7), 845–856

- McCoy, A. J., Chandana Epa, V., & Colman, P. M. (1997). Electrostatic complementarity at protein/protein interfaces. *Journal of molecular biology*, 268(2), 570–584. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0987>
- 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>
- Miller, S., Lesk, A. M., Janin, J., & Chothia, C. (1987). The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. *Nature*, 328(6133), 834–836. <https://doi.org/10.1038/328834a0>
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 443, 365–382. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19)
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. (1998), Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function *J. Computational Chemistry*, **19**: 1639-1662
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Morrow, J. K., & Zhang, S. (2012). Computational prediction of protein hot spot residues. *Current pharmaceutical design*, 18(9), 1255–1265. <https://doi.org/10.2174/138161212799436412>
- Muchmore, S. W., Souers, A. J., & Akritopoulou-Zanze, I. (2006). The use of three-dimensional shape and electrostatic similarity searching in the identification of a melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonist. *Chemical biology & drug design*, 67(2), 174–176
- Muegge, I. & Rarey, M. (2001). Small Molecule Docking and Scoring. In *Reviews in Computational Chemistry*, Vol. 17, pp. 1-60. Wiley-VCH
- Müller, W. E., & Wollert, U. (1979). Human serum albumin as a 'silent receptor' for drugs and endogenous substances. *Pharmacology*, 19(2), 59–67. <https://doi.org/10.1159/000137289>
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., & Chothia, C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of molecular biology*, 247(4), 536–540. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0159>
- Naqvi, A., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(10), 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
- Náray-Szabó G. Analysis of molecular recognition: steric electrostatic and hydrophobic complementarity. *J Mol Recognit.* 1993 Dec;6(4):205-10. doi: 10.1002/jmr.300060409. PMID: 7522489
- Osguthorpe, D. J., Sherman, W., & Hagler, A. T. (2012). Generation of receptor structural ensembles for virtual screening using binding site shape analysis and clustering. *Chemical biology & drug design*, 80(2), 182–193. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01396.x>
- Otagiri M. (2005). A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 20(5), 309–323. <https://doi.org/10.2133/dmpk.20.309>
- P.J. Halling, Proteins: structures and molecular properties, second ed., in: T.E. Creighton, W.H. Freeman (Eds.), New York, 1992, 512 pp. ISBN: 0-7167-7030-X, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62 (1) (1995) 105
- Pace, C. N., Fu, H., Fryar, K. L., Landua, J., Trevino, S. R., Shirley, B. A., Hendricks, M. M., Iimura, S., Gajiwala, K., Scholtz, J. M., & Grimsley, G. R. (2011). Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Journal of molecular biology*, 408(3), 514–528. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.053>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews*, 9(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Parsekar, S. U., Velankanni, P., Sridhar, S., Haldar, P., Mate, N. A., Banerjee, A., Sudhadevi Antharjanam, P. K., Koley, A. P., & Kumar, M. (2020). Protein binding studies with human serum albumin, molecular docking and: In vitro cytotoxicity studies using HeLa cervical carcinoma cells of Cu(ii)/Zn(ii) complexes

- containing a carbohydrazone ligand. *Dalton Transactions*, 49(9), 2947–2965. <https://doi.org/10.1039/c9dt04656a>
- Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., Sudhakar, A., & Varma, A. K. (2010). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *PLoS one*, 5(8), e12029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>
- Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., Sudhakar, A., & Varma, A. K. (2010). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *PLoS one*, 5(8), e12029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>
- Pazos, F., & Sternberg, M. J. (2004). Automated prediction of protein function and detection of functional sites from structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14754–14759. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404569101>
- Pedretti, A., Granito, C., Mazzolari, A., & Vistoli, G. (2016). Structural Effects of Some Relevant Missense Mutations on the MECP2-DNA Binding: A MD Study Analyzed by Rescore+, a Versatile Rescoring Tool of the VEGA ZZ Program. *Molecular informatics*, 35(8-9), 424–433. <https://doi.org/10.1002/minf.201501030>
- Pedretti, A., Villa, L., & Vistoli, G. (2004). VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 18(3), 167–173. <https://doi.org/10.1023/B:JCAM.0000035186.90683.f2>
- Peele, K. A., Potla Durthi, C., Srihansa, T., Krupanidhi, S., Ayyagari, V. S., Babu, D. J., Indira, M., Reddy, A. R., & Venkateswarulu, T. C. (2020). Molecular docking and dynamic simulations for antiviral compounds against SARS-CoV-2: A computational study. *Informatics in medicine unlocked*, 19, 100345. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100345>
- Pereira de Araujo, A. F., Pochapsky, T. C., & Joughin, B. (1999). Thermodynamics of interactions between amino acid side chains: experimental differentiation of aromatic-aromatic, aromatic-aliphatic, and aliphatic-aliphatic side-chain interactions in water. *Biophysical journal*, 76(5), 2319–2328. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77389-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77389-3)
- Petrek M, Otyepka M, Banás P, Kosinová P, Koca J, Damborský J. CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics*. 2006 Jun 22;7:316. doi: 10.1186/1471-2105-7-316. PMID: 16792811; PMCID: PMC1539030
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004 Oct;25(13):1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.ç
- Pierre Bongrand. LIGAND-RECEPTOR INTERACTIONS. Reports on Progress in Physics, IOP Publishing, 1999, 62, pp.921-968
- Potterton, E., McNicholas, S., Krissinel, E., Cowtan, K., & Noble, M. (2002). The CCP4 molecular-graphics project. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 58(Pt 11), 1955–1957. <https://doi.org/10.1107/s0907444902015391>
- Potterton, E., McNicholas, S., Krissinel, E., Cowtan, K., & Noble, M. (2002). The CCP4 molecular-graphics project. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 58(Pt 11), 1955–1957. <https://doi.org/10.1107/s0907444902015391>
- Prieto-Martínez FD, Arciniega M, Medina-Franco JL. Molecular docking: current advances and challenges. *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol*. 2018;21(Suppl: 1):65-87
- R. Wintjens , J. Lievin , M. Rooman and E. Buisine , Contribution of cation– $\pi$  interactions to the stability of protein–DNA complexes, *J. Mol. Biol.*, 2000, **302** , 395 —410
- Rabbani, G., Baig, M. H., Lee, E. J., Cho, W. K., Ma, J. Y., & Choi, I. (2017). Biophysical Study on the Interaction between Eperisone Hydrochloride and Human Serum Albumin Using Spectroscopic, Calorimetric, and Molecular Docking Analyses. *Molecular Pharmaceutics*, 14(5), 1656–1665. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01124>
- Rizvi SM, Shakil S, Haneef M. A simple click by click protocol to perform docking: AutoDock 4.2 made easy for non-bioinformaticians. *EXCLI J*. 2013 Sep 23;12:831-57. PMID: 26648810; PMCID: PMC4669947.
- Robert C. Edgar, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, Volume 32, Issue 5, 1 March 2004, Pages 1792–1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

- Roche, D. B., Brackenridge, D. A., & McGuffin, L. J. (2015). Proteins and Their Interacting Partners: An Introduction to Protein-Ligand Binding Site Prediction Methods. *International journal of molecular sciences*, *16*(12), 29829–29842. <https://doi.org/10.3390/ijms161226202>
- Rodriguez, E. A., Li, X., Lehmler, H. J., Robertson, L. W., & Duffel, M. W. (2016). Sulfation of Lower Chlorinated Polychlorinated Biphenyls Increases Their Affinity for the Major Drug-Binding Sites of Human Serum Albumin. *Environmental Science and Technology*, *50*(10), 5320–5327. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00484>
- Rodriguez, E. A., Li, X., Lehmler, H. J., Robertson, L. W., & Duffel, M. W. (2016). Sulfation of Lower Chlorinated Polychlorinated Biphenyls Increases Their Affinity for the Major Drug-Binding Sites of Human Serum Albumin. *Environmental Science and Technology*, *50*(10), 5320–5327. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00484>
- Rose, P. W., Prlić, A., Bi, C., Bluhm, W. F., Christie, C. H., Dutta, S., Green, R. K., Goodsell, D. S., Westbrook, J. D., Woo, J., Young, J., Zardecki, C., Berman, H. M., Bourne, P. E., & Burley, S. K. (2015). The RCSB Protein Data Bank: Views of structural biology for basic and applied research and education. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D345–D356. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1214>
- Rosell, M., & Fernández-Recio, J. (2018). Hot-spot analysis for drug discovery targeting protein-protein interactions. *Expert opinion on drug discovery*, *13*(4), 327–338. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1430763>
- Rost, B., & Sander, C. (1994). Conservation and prediction of solvent accessibility in protein families. *Proteins*, *20*(3), 216–226. <https://doi.org/10.1002/prot.340200303>
- Rub, M. A., Khan, J. M., Azum, N., & Asiri, A. M. (2017). Influence of antidepressant clomipramine hydrochloride drug on human serum albumin: Spectroscopic study. *Journal of Molecular Liquids*, *241*, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.143>
- Ruhong Zhou and B. J. Berne, "Smart walking: A new method for Boltzmann sampling of protein conformations", *The Journal of Chemical Physics* *107*, 9185-9196 (1997) <https://doi.org/10.1063/1.475210>
- Rut W, Groborz K, Zhang L, et al. Substrate specificity profiling of SARS-CoV-2 main protease enables design of activity-based probes for patient-sample imaging. *bioRxiv*; 2020. DOI: 10.1101/2020.03.07.981928
- S.F. Sousa, A.J.M. Ribeiro, J.T.S. Coimbra, R.P.P. Neves, S.A. Martins, N.S.H.N. Moorthy, P.A. Fernandes and M.J. Ramos, "Protein-Ligand Docking in the New Millennium – A Retrospective of 10 Years in the Field", *Current Medicinal Chemistry* (2013) *20*: 2296. <https://doi.org/10.2174/0929867311320180002>
- Saha, R. P., Bahadur, R. P., Pal, A., Mandal, S., & Chakrabarti, P. (2006). ProFace: a server for the analysis of the physicochemical features of protein-protein interfaces. *BMC structural biology*, *6*, 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-6-11>
- Saldaño, T. E., Monzon, A. M., Parisi, G., & Fernandez-Alberti, S. (2016). Evolutionary Conserved Positions Define Protein Conformational Diversity. *PLoS computational biology*, *12*(3), e1004775. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004775>
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*, *43*(W1), W443–W447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv31>
- Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- Sastry, G. M., 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>
- Scior T, Martínez-Morales E, Cruz S, Salinas-Stefanon EM. In silico modeling of toluene binding site in the pore of voltage-gate sodium channel. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*. 2009;2:1-2 <https://doi.org/10.2147/JRLCR.S4618>
- Scior, T. F., Islas, A. A., Martínez-Morales, E., Cuanalo-Contreras, K., Millan-Perezpeña, L., & Salinas-Stefanón, E. M. (2011). An in silico approach to primaquine binding to Trp756 in the external vestibule of sodium channel Nav 1.4. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, *4*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.179>

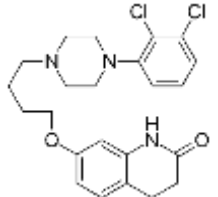
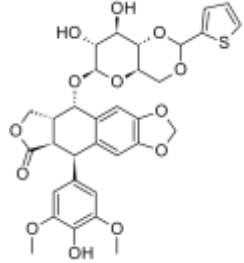
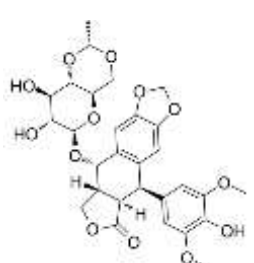
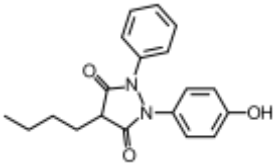
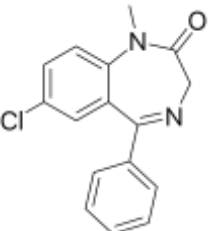
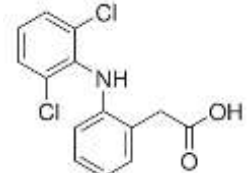
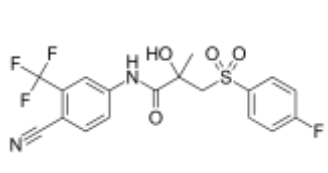
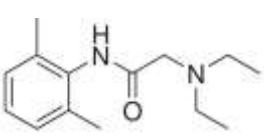
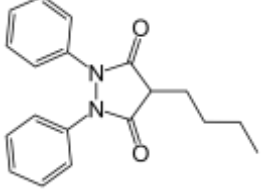
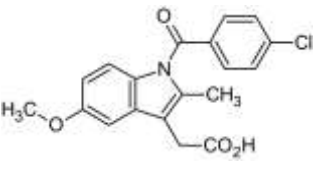
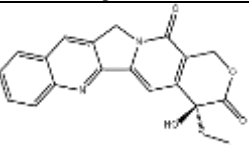
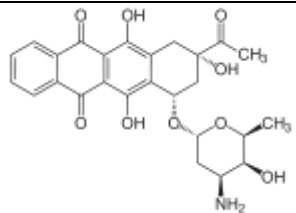
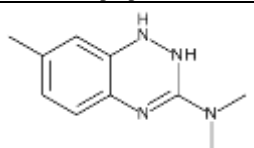
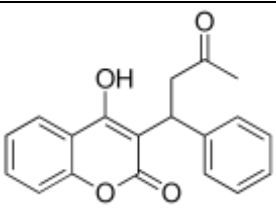
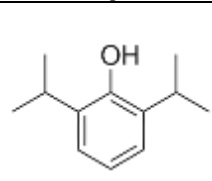
- Scior, T., Lozano-Aponte, J., Ajmani, S., Hernández-Montero, E., Chávez-Silva, F., Hernández-Núñez, E., Moo-Puc, R., Fraguera-Collar, A., & Navarrete-Vázquez, G. (2015). Antiprotozoal Nitazoxanide Derivatives: Synthesis, Bioassays and QSAR Study Combined with Docking for Mechanistic Insight. *Current Computer Aided-Drug Design*, 11(1), 21–31. <https://doi.org/10.2174/1573409911666150414145937>
- Scott, D. E., Coyne, A. G., Hudson, S. A., & Abell, C. (2012). Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. *Biochemistry*, 51(25), 4990–5003. <https://doi.org/10.1021/bi3005126>
- Shashikala, H., Chakravorty, A., & Alexov, E. (2019). Modeling Electrostatic Force in Protein-Protein Recognition. *Frontiers in molecular biosciences*, 6, 94. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00094>
- Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J., & Sherman, W. (2010). Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *Journal of chemical theory and computation*, 6(5), 1509–1519. <https://doi.org/10.1021/ct900587b>
- Shoichet B. K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, 432(7019), 862–865. <https://doi.org/10.1038/nature03197>
- Shrake, A., & Rupley, J. A. (1973). Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *Journal of molecular biology*, 79(2), 351–371. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90011-9)
- Singh, A.N., Baruah, M.M. & Sharma, N. Structure Based docking studies towards exploring potential anti-androgen activity of selected phytochemicals against Prostate Cancer. *Sci Rep* 7, 1955 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02023-5>
- Sirimulla, Suman et al. “Halogen interactions in protein-ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design.” *Journal of chemical information and modeling* vol. 53,11 (2013): 2781-91. doi:10.1021/ci400257k
- Sonnet, A. M., & Virga, E. G. (2008). Steric effects in dispersion forces interactions. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 77(3 Pt 1), 031704. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.77.031704>
- Sowmya, G., & Ranganathan, S. (2015). Discrete structural features among interface residue-level classes. *BMC bioinformatics*, 16 Suppl 18(Suppl 18), S8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S18-S8>
- Sowmya, G., Anita, S., & Kanguane, P. (2011). Insights from the structural analysis of protein heterodimer interfaces. *Bioinformation*, 6(4), 137–143. <https://doi.org/10.6026/97320630006137>
- Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J Mol Model* 19, 1–32 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>
- Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular pharmacology*, 11(6), 824–832.
- Tachoua, W., Kabrine, M., Mushtaq, M., & Ul-Haq, Z. (2020). An in-silico evaluation of COVID-19 main protease with clinically approved drugs. *Journal of molecular graphics & modelling*, 101, 107758. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107758>
- Taguchi, K., Chuang, V. T., Maruyama, T., & Otagiri, M. (2012). Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(9), 3033–3046. <https://doi.org/10.1002/jps.23181>
- Talarico, C., Gervasoni, S., Manelfi, C., Pedretti, A., Vistoli, G., & Beccari, A. R. (2020). Combining Molecular Dynamics and Docking Simulations to Develop Targeted Protocols for Performing Optimized Virtual Screening Campaigns on The hTRPM8 Channel. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2265. <https://doi.org/10.3390/ijms21072265>
- Tien, M. Z., Meyer, A. G., Sydykova, D. K., Spielman, S. J., & Wilke, C. O. (2013). Maximum allowed solvent accessibilities of residues in proteins. *PloS one*, 8(11), e80635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080635>
- Torres, P., Sodero, A., Jofily, P., & Silva-Jr, F. P. (2019). Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4574. <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>
- Tripathi V.K., Dasgupta B., Deb K. (2007) A Computational Method for Viewing Molecular Interactions in Docking. In: Lévy P.P. et al. (eds) Pixelization Paradigm. VIEW 2006. *Lecture Notes in Computer Science*, vol 4370. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71027-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71027-1_13)

- Tzeng, S. R., & Kalodimos, C. G. (2011). Protein dynamics and allostery: an NMR view. *Current opinion in structural biology*, 21(1), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.10.007>
- Ullrich, S., & Nitsche, C. (2020). The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 30(17), 127377. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127377>
- Van Rossum, G., & Drake Jr, F. L. (1995). *Python reference manual*. Centrum voor Wiskunde en Informatica Amsterdam
- Villa-Diaz F, Lopez-Nunez S, Ruiz-Castelan JE, Salinas-Stefanon EM, Scior T. Chemometric Models of Differential Amino Acids at the Nav $\alpha$  and Nav $\beta$  Interface of Mammalian Sodium Channel Isoforms. *Molecules*. 2020 Aug 3;25(15):3551. doi: 10.3390/molecules25153551. PMID: 32756517; PMCID: PMC7435598
- Vipin K. Tripathi, Bhaskar Dasgupta, and Kalyanmoy Deb. (2006). A computational method for viewing molecular interactions in docking. In Proceedings of the 1st first visual information expert conference on Pixelization paradigm (VIEW'06). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 152–163
- Voet, A., Berenger, F., & Zhang, K. Y. (2013). Electrostatic similarities between protein and small molecule ligands facilitate the design of protein-protein interaction inhibitors. *PloS one*, 8(10), e75762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075762>
- Weikl, T. R., & von Deuster, C. (2009). Selected-fit versus induced-fit protein binding: kinetic differences and mutational analysis. *Proteins*, 75(1), 104–110. <https://doi.org/10.1002/prot.22223>
- Wishner, B. C., Ward, K. B., Lattman, E. E., & Love, W. E. (1975). Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 98(1), 179–194. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80108-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80108-2)
- Wong, E. T., Na, D., & Gsponer, J. (2013). On the importance of polar interactions for complexes containing intrinsically disordered proteins. *PLoS computational biology*, 9(8), e1003192. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003192>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu, Z., Elgart, V., Qian, H., & Xing, J. (2009). Amplification and detection of single-molecule conformational fluctuation through a protein interaction network with bimodal distributions. *The journal of physical chemistry. B*, 113(36), 12375–12381. <https://doi.org/10.1021/jp903548d>
- Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., Qi, F., Bao, L., Du, L., Liu, S., Qin, C., Sun, F., Shi, Z., Zhu, Y., Jiang, S., & Lu, L. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell research*, 30(4), 343–355. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x>
- Xie, N. Z., Du, Q. S., Li, J. X., & Huang, R. B. (2015). Exploring Strong Interactions in Proteins with Quantum Chemistry and Examples of Their Applications in Drug Design. *PloS one*, 10(9), e0137113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137113>
- Yang, F., Zhang, Y., & Liang, H. (2014). Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3580–3595. <https://doi.org/10.3390/ijms15033580>
- Young, L., Jernigan, R. L., & Covell, D. G. (1994). A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 3(5), 717–729. <https://doi.org/10.1002/pro.5560030501>
- Yuriev, E., & Ramsland, P. A. (2013). Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *Journal of molecular recognition : JMR*, 26(5), 215–239. <https://doi.org/10.1002/jmr.2266>
- Zacharias, N., & Dougherty, D. A. (2002). Cation- $\pi$  interactions in ligand recognition and catalysis. *Trends in pharmacological sciences*, 23(6), 281–287. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)02027-8](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)02027-8)
- Zakaria, N. H., Wai, L. K., Hassan, I. Molecular Docking Study of the Interactions between Plasmodium falciparum Lactate Dehydrogenase and 4-aminoquinoline Hybrids. *Sains Malaysiana* 49(8)(2020): 1905–1913. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2020-4908-12>

- Zampighi, L. M., Kavanau, C. L., & Zampighi, G. A. (2004). The Kohonen self-organizing map: a tool for the clustering and alignment of single particles imaged using random conical tilt. *Journal of structural biology*, 146(3), 368–380. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.01.008>
- Zhang, J., Zhuang, S., Tong, C., & Liu, W. (2013). Probing the molecular interaction of triazole fungicides with human serum albumin by multispectroscopic techniques and molecular modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30), 7203–7211. <https://doi.org/10.1021/jf401095n>
- Zhang, J., Zhuang, S., Tong, C., & Liu, W. (2013). Probing the molecular interaction of triazole fungicides with human serum albumin by multispectroscopic techniques and molecular modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30), 7203–7211. <https://doi.org/10.1021/jf401095n>
- Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6489), 409–412. <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
- Zhou, P., Yang, X. Lou, 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. Di, 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), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020). <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), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- 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), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zuber, B., & Unwin, N. (2013). Structure and superorganization of acetylcholine receptor-rapsyn complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26), 10622–10627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301277110>

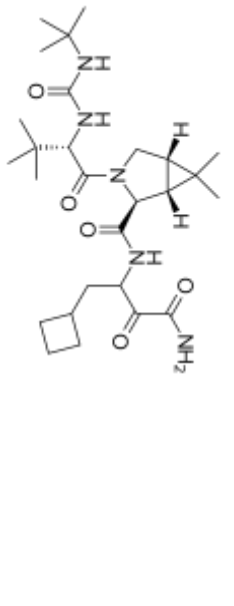
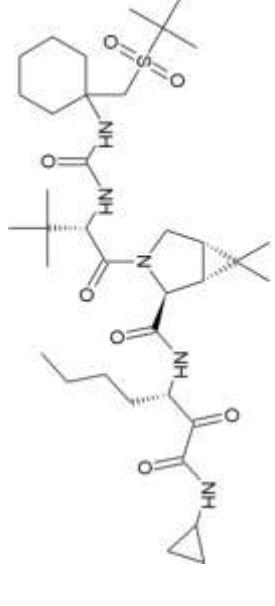
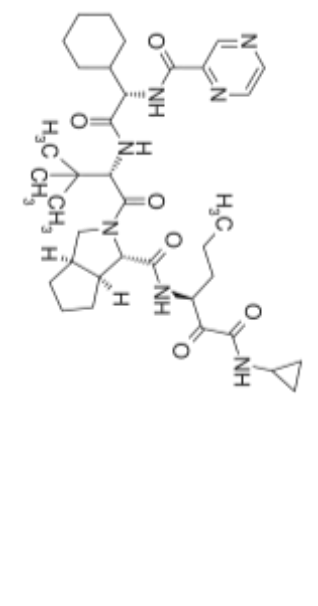
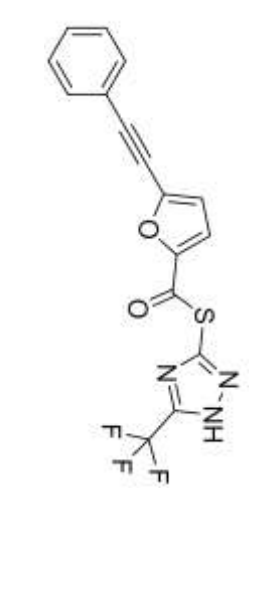
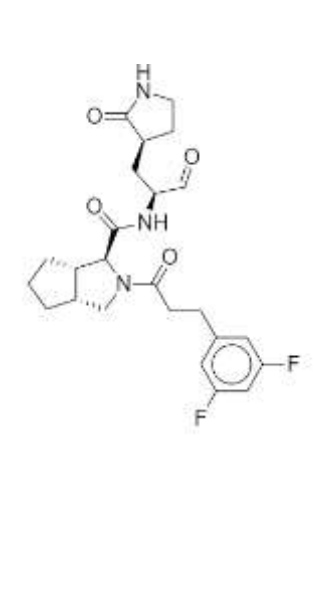
## XI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla S1.** Estructuras químicas de ligandos seleccionados en interfaz con ASH

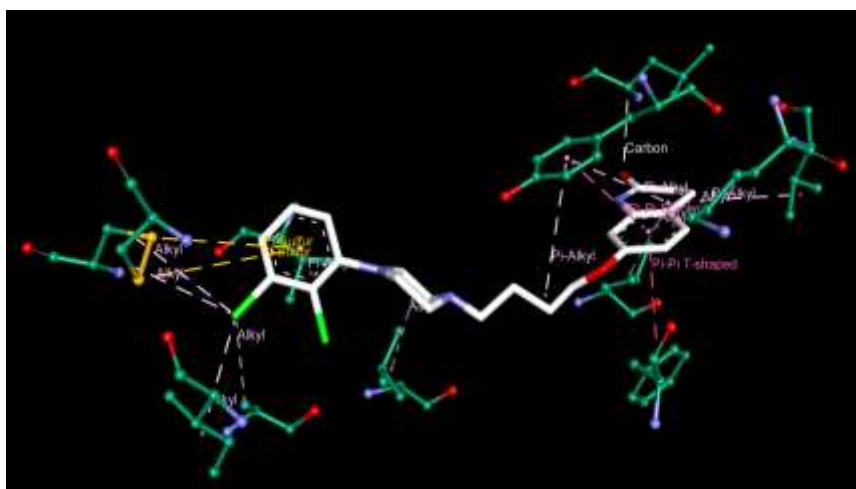
<b>Nombre</b>	Aripiprazol	Tenipósido	Etopósido	Oxifenbutazona	Diazepam
<b>Estructura</b>					
<b>PDB/L-ID</b>	6A7P/9SC	4L9Q/9TP	4LB9/EVP	2BXC/OPB	2BXF/DZP
<b>Características</b>	Antipsicótico	Antineoplásico	Antineoplásico	Antiinflamatorio	Ansiolítico
<b>Nombre</b>	Diclofenaco	Bicalutamida	Lidocaína	Fenilbutazona	Indometacina
<b>Estructura</b>					
<b>PDB/L-ID</b>	4Z69/DIF	4LA0/198	3JQZ/LQZ	2BXC/P1Z	2BKK/IMN
<b>Características</b>	Antiinflamatorio	Antiandrógeno	Anestésico local	Antiinflamatorio	Antiinflamatorio
<b>Nombre</b>	Camptotecina	Idarubicina	Azapropazona	Warfarina	Propofol
<b>Estructura</b>					
<b>PDB/L-ID</b>	4L9K/EHF	4LB2/DM5	2BX8/AZQ	2BXD/RWF	1E7A/PFL
<b>Características</b>	Anticancerígeno	Antineoplásico	Antiinflamatorio	Anticoagulante	Anestésico general

*L-ID: Código de ligando de acuerdo a la base de datos PDB*

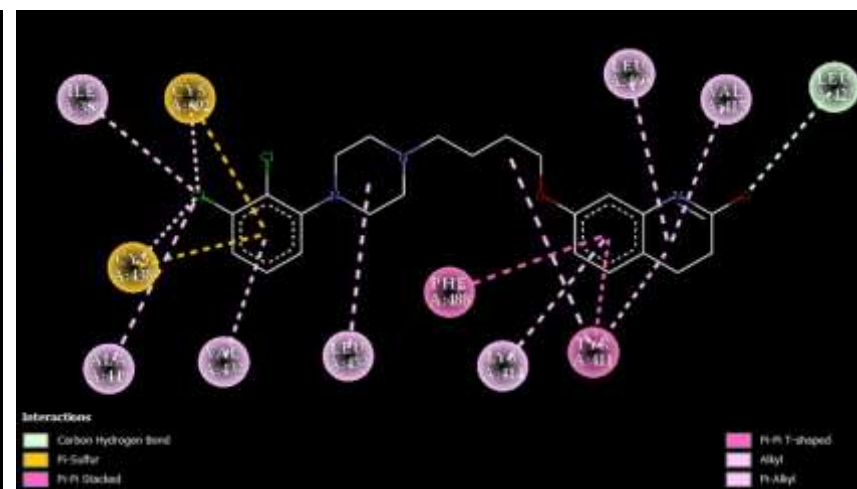
**Tabla S2.** Estructuras químicas de ligandos seleccionados en interfaz con PPS

Nombre	Boceprevir	Narlaprevir	Telaprevir	Inhibidor	MI-23
Estructura					
PDB/L-ID	6WNP/U5G	7D1O/NNA	7C7P/SV6	2GZ8/F3F	7D3I/GQU
Características	Inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C	Inhibidor de la proteasa del virus de la hepatitis C	Inhibir de la enzima NS3 del virus de la hepatitis C	Inhibidor de la proteasa	Inhibidor de la proteasa

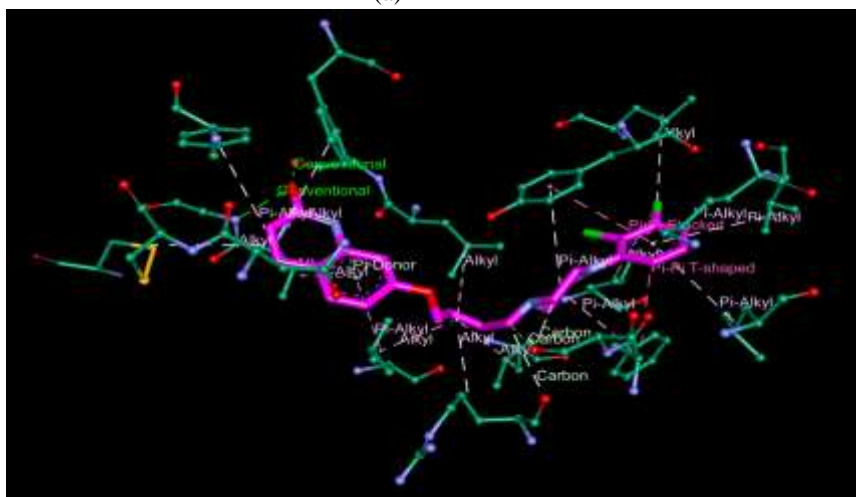
L-ID: Código de ligando de acuerdo a la base de datos PDB



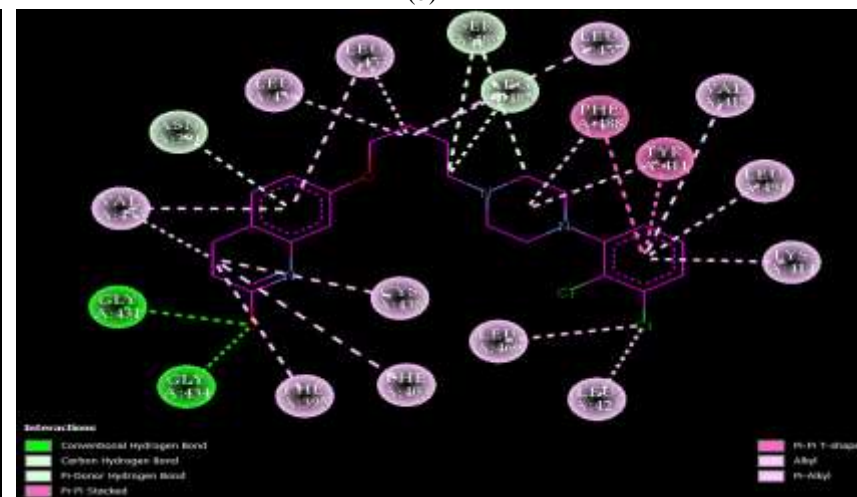
(a)



(b)

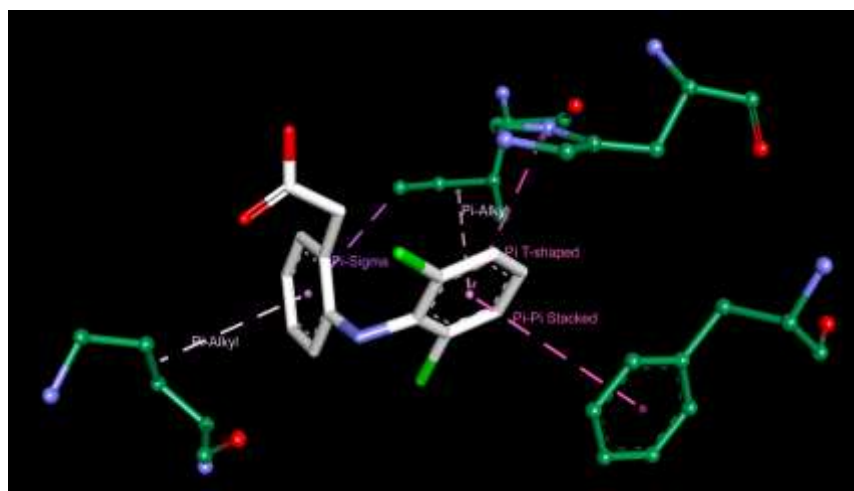


(c)

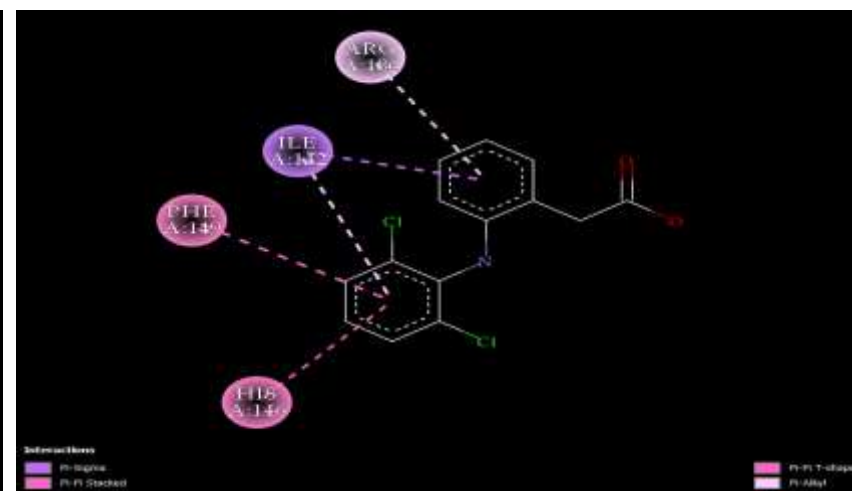


(d)

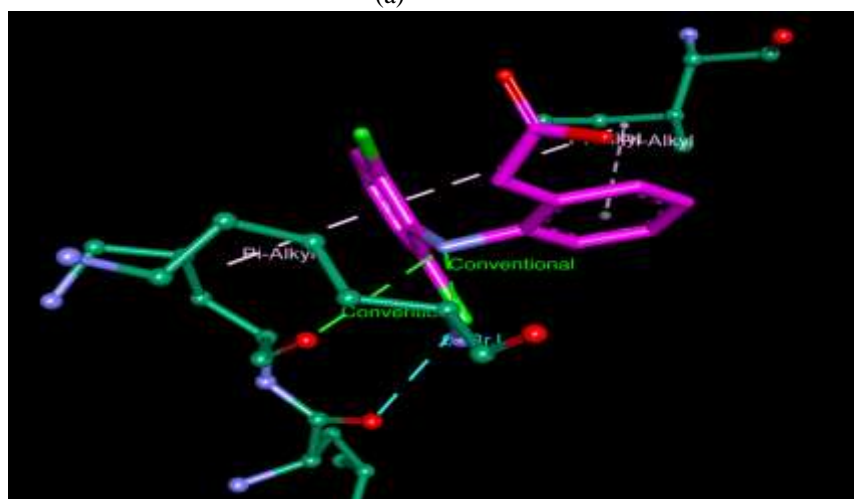
**Figura S1.** Análisis estructural de interacciones de ASH/ARI. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/ARI ORI (PDB: 6A7P); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/ARI DOC; ARI ORI, en blanco; ARI DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



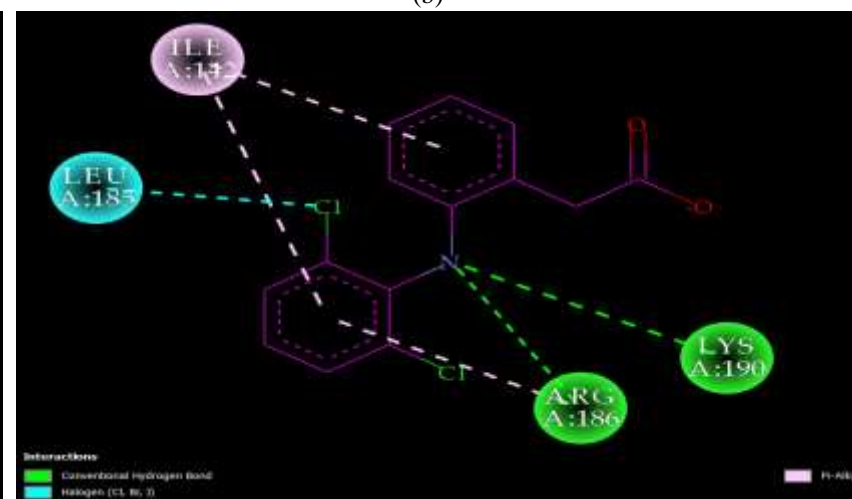
(a)



(b)



(c)

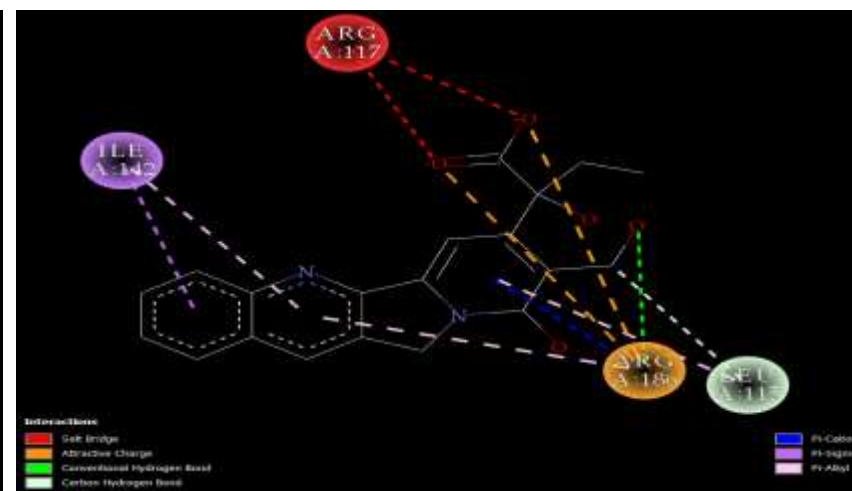


(d)

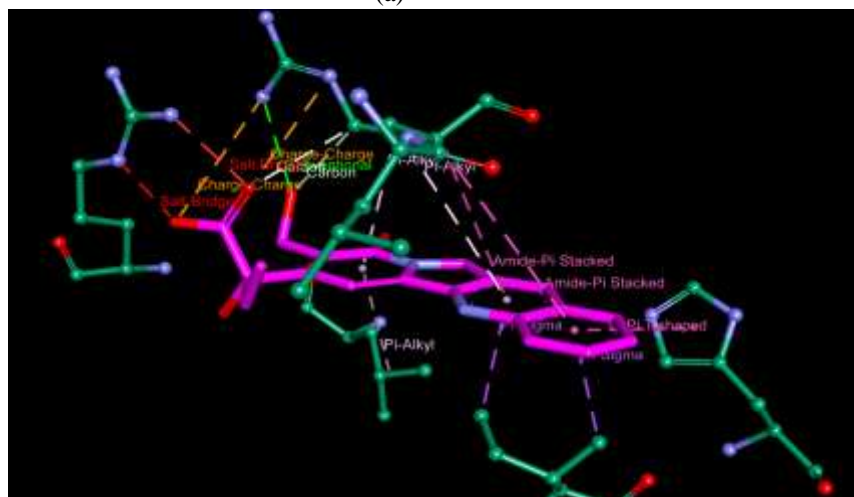
**Figura S2.** Análisis estructural de interacciones de ASH/DIF. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/DIF ORI (PDB: 4Z69); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/DIF DOC; DIF ORI, en blanco; DIF DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



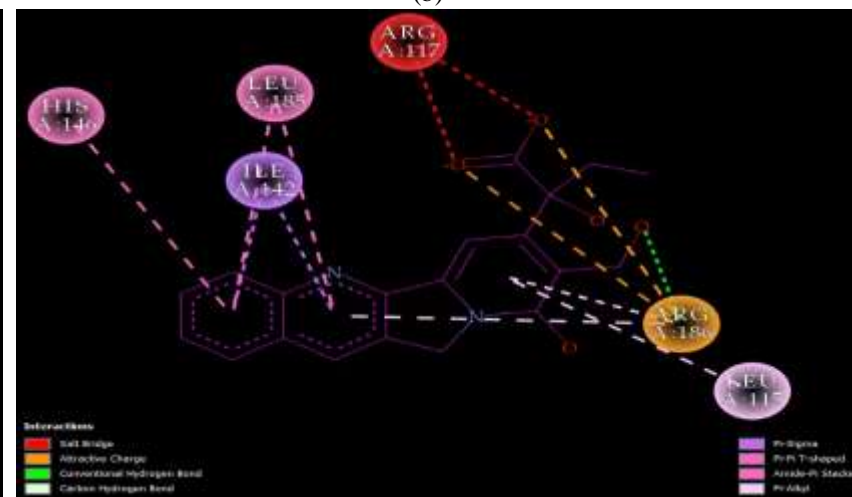
(a)



(b)

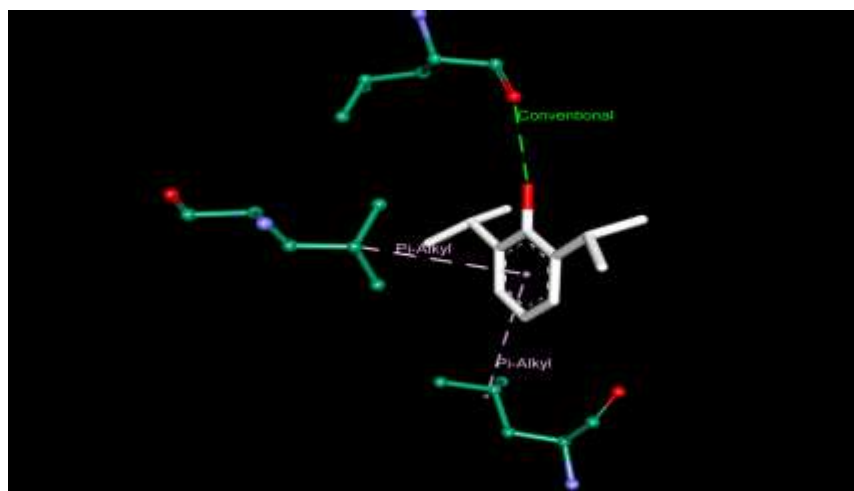


(c)

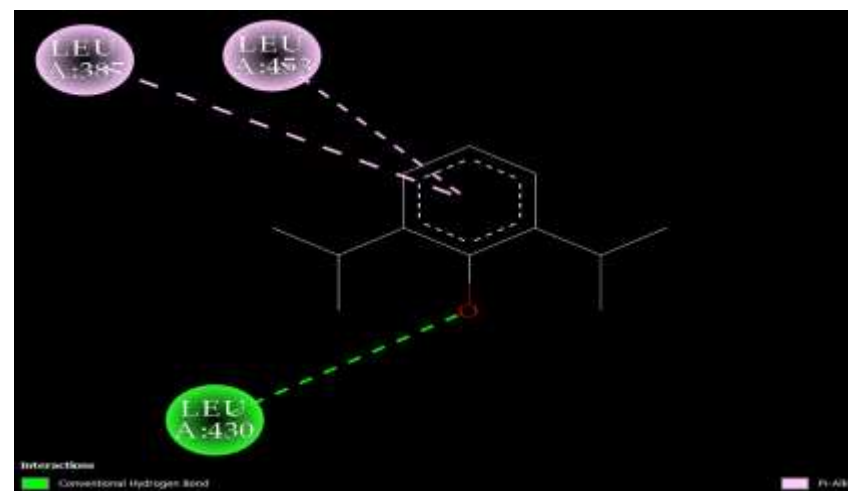


(d)

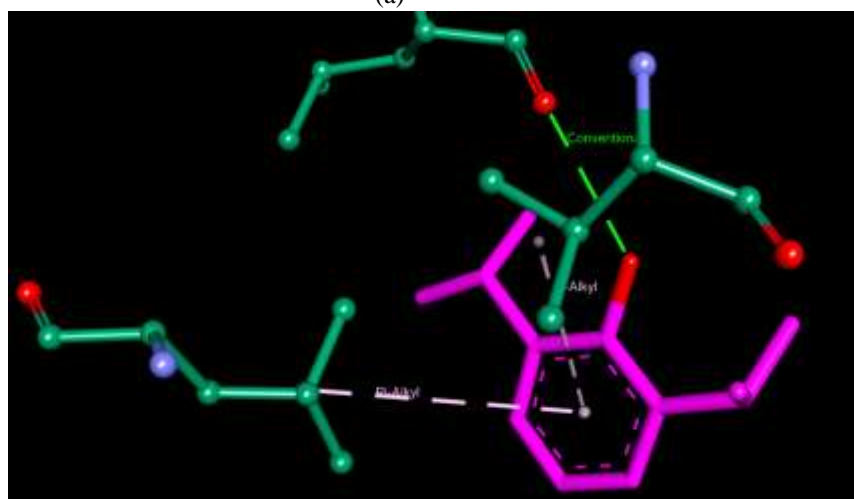
**Figura S3.** Análisis estructural de interacciones de ASH/CAM. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/CAM ORI (PDB: 4L9K); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/CAM DOC; CAM ORI, en blanco; CAM DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



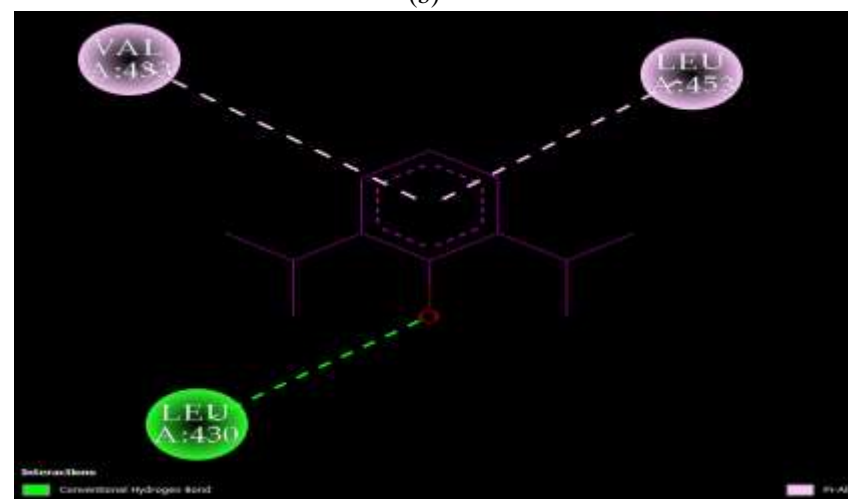
(a)



(b)

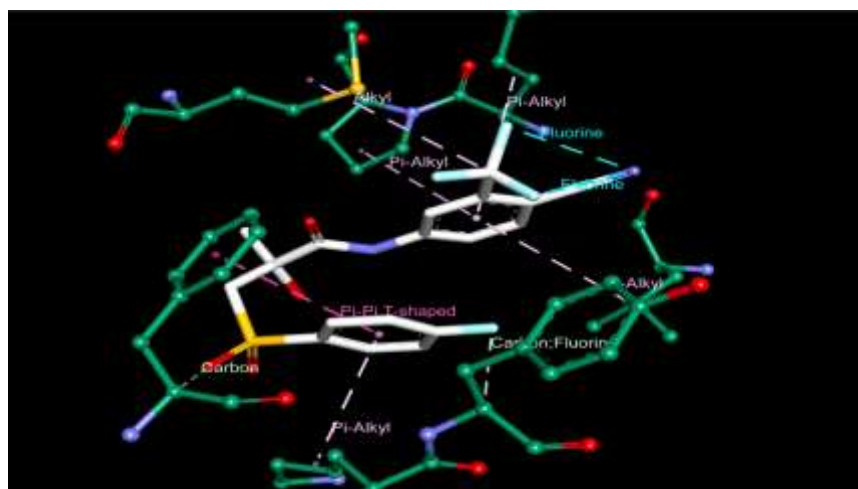


(c)

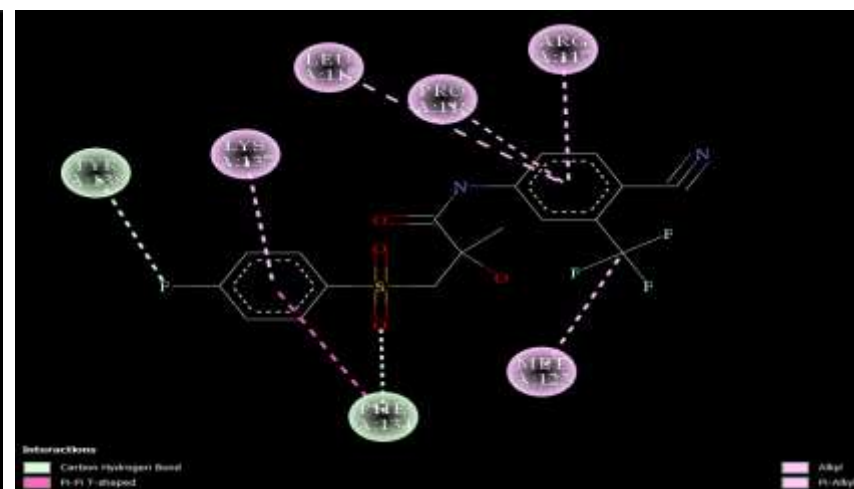


(d)

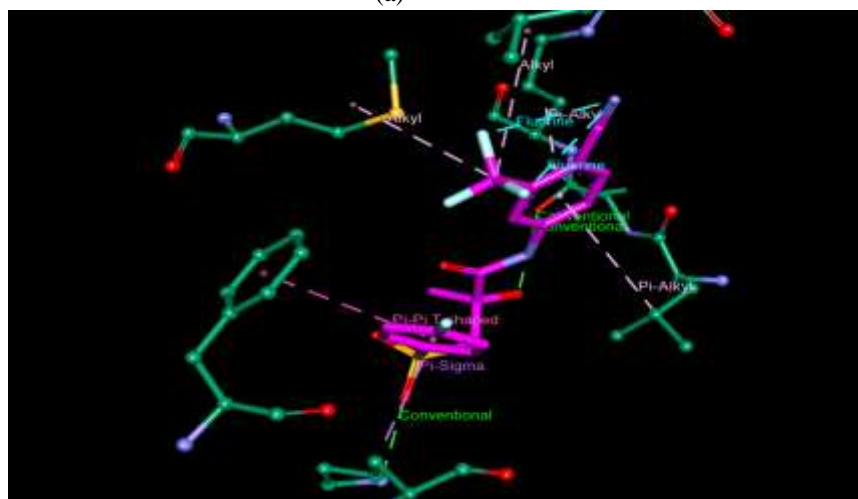
**Figura S4.** Análisis estructural de interacciones de ASH/PRO. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/PRO ORI (PDB: 1E7A); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/PRO DOC; PRO ORI, en blanco; PRO DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



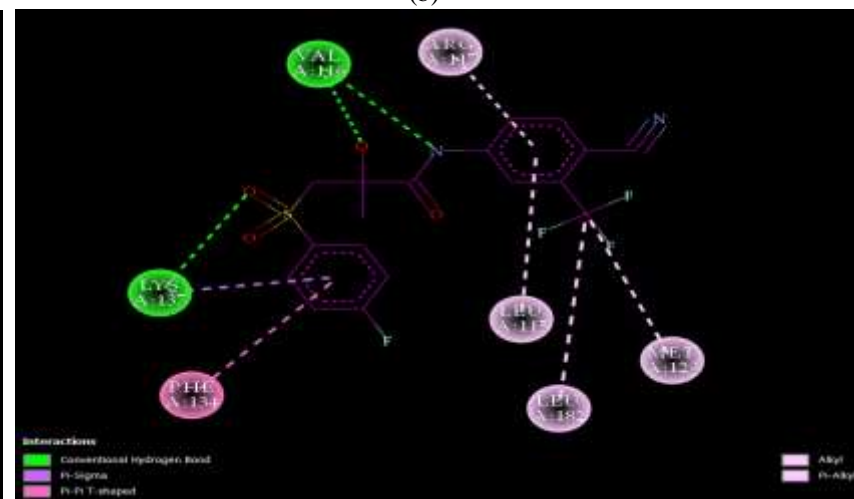
(a)



(b)

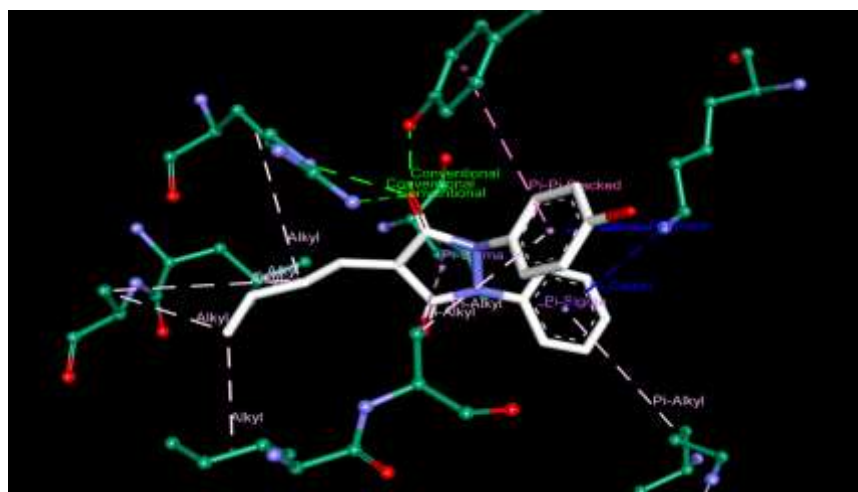


(c)

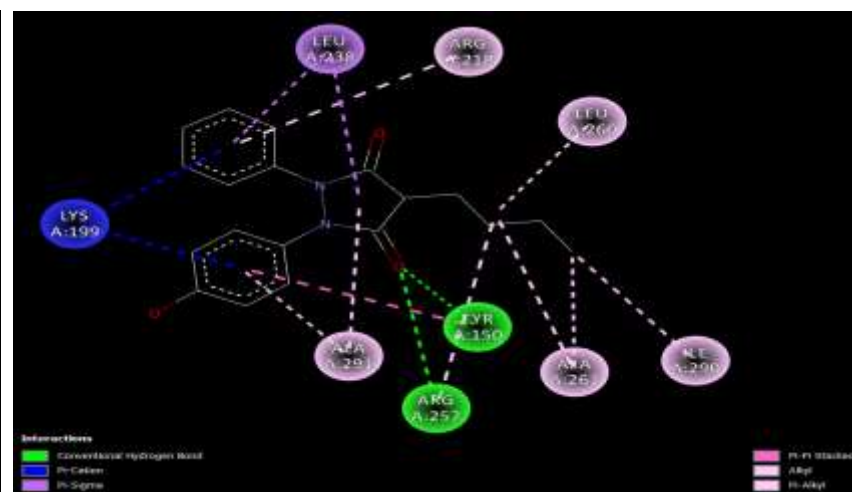


(d)

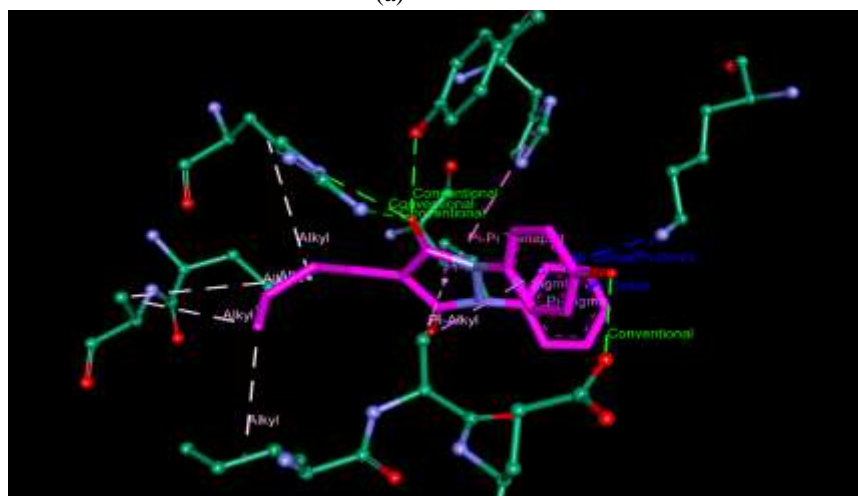
**Figura S5.** Análisis estructural de interacciones de ASH/BIC. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/BIC ORI (PDB: 4LA0); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/BIC DOC; BIC ORI, en blanco; BIC DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



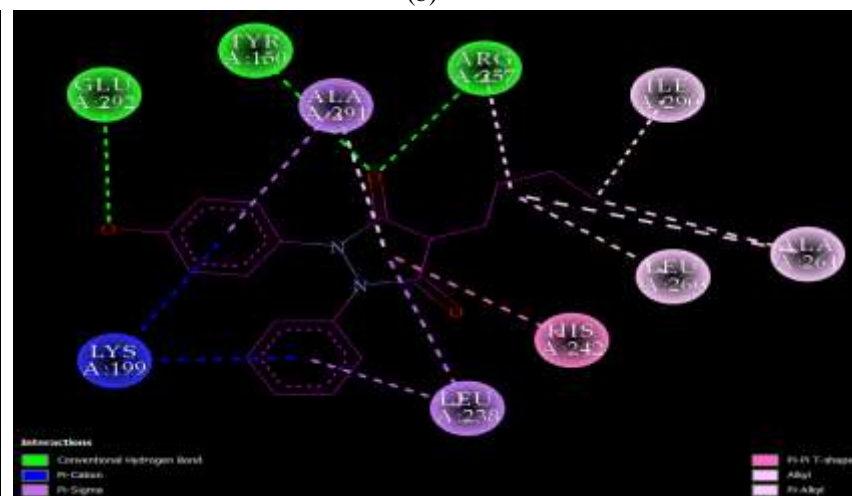
(a)



(b)

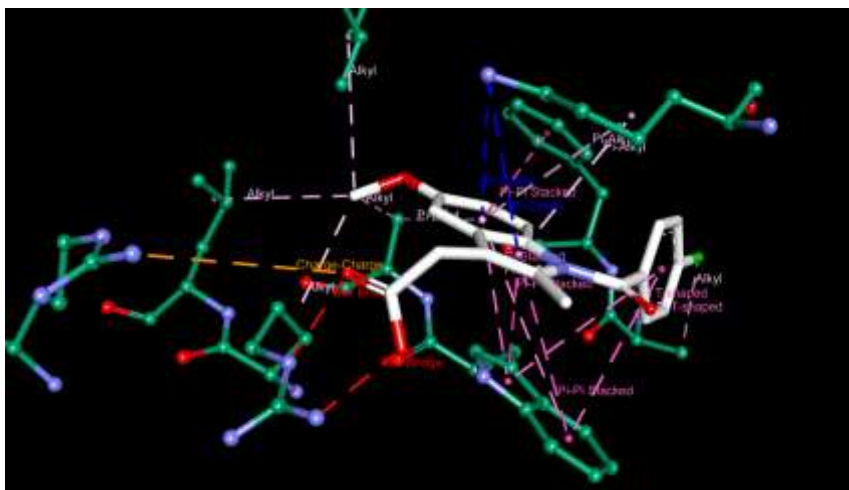


(c)

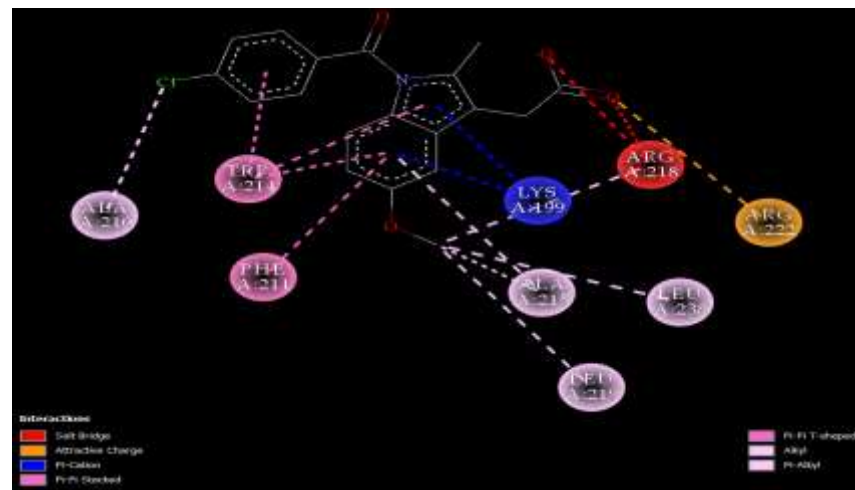


(d)

**Figura S6.** Análisis estructural de interacciones de ASH/OXI. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/OXI ORI (PDB: 2BXB); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/OXI DOC; OXI ORI, en blanco; OXI DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



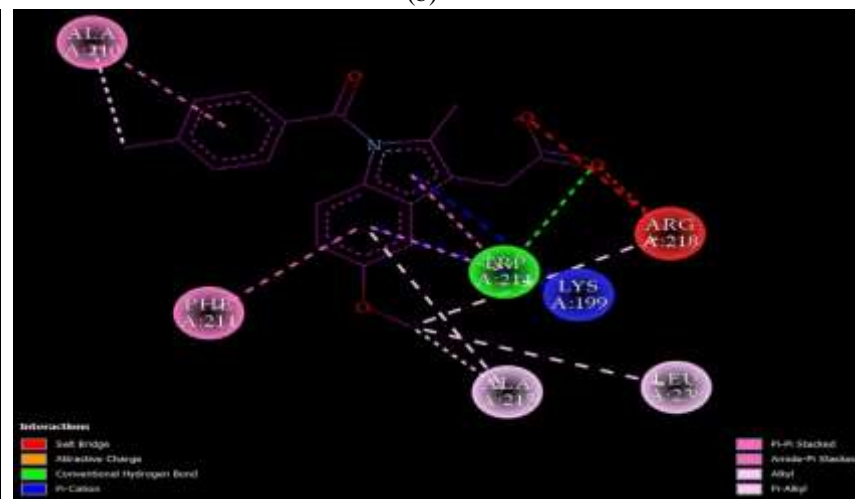
(a)



(b)

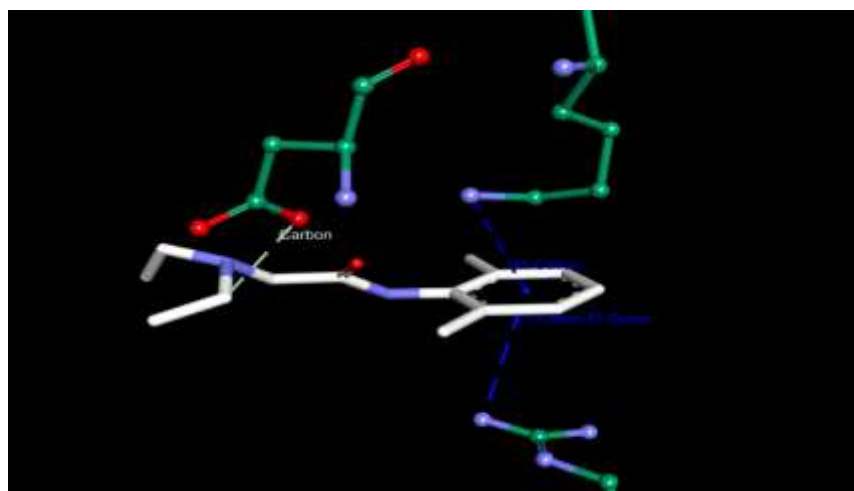


(c)

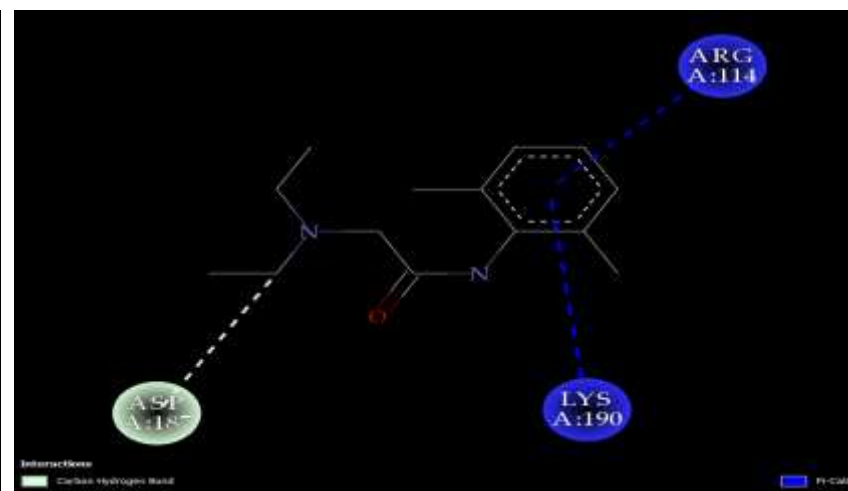


(d)

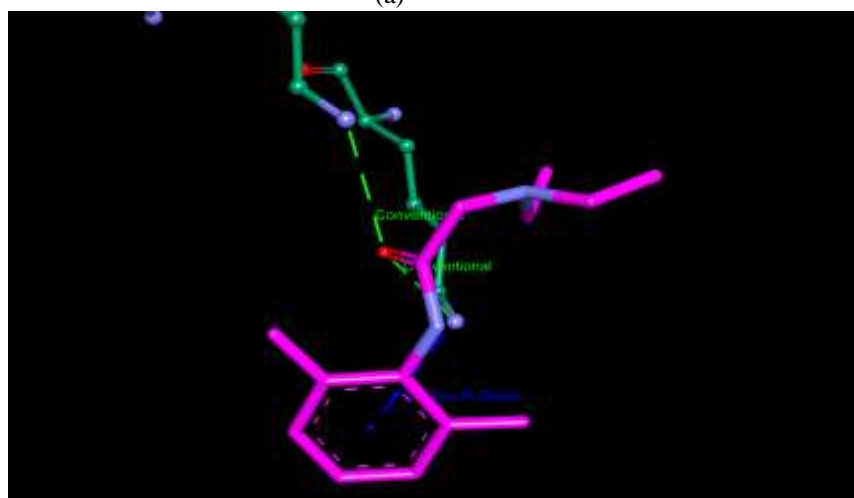
**Figura S7.** Análisis estructural de interacciones de ASH/IND. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IND ORI (PDB: 2BXK); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IND DOC; IND ORI, en blanco; IND DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



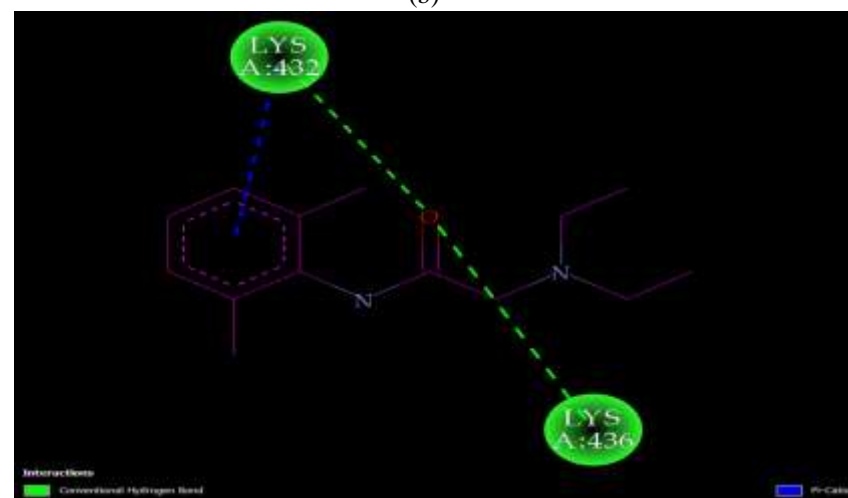
(a)



(b)

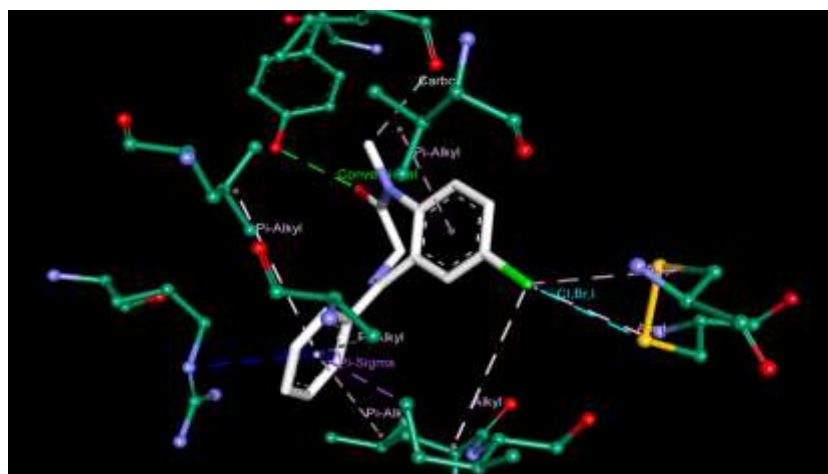


(c)

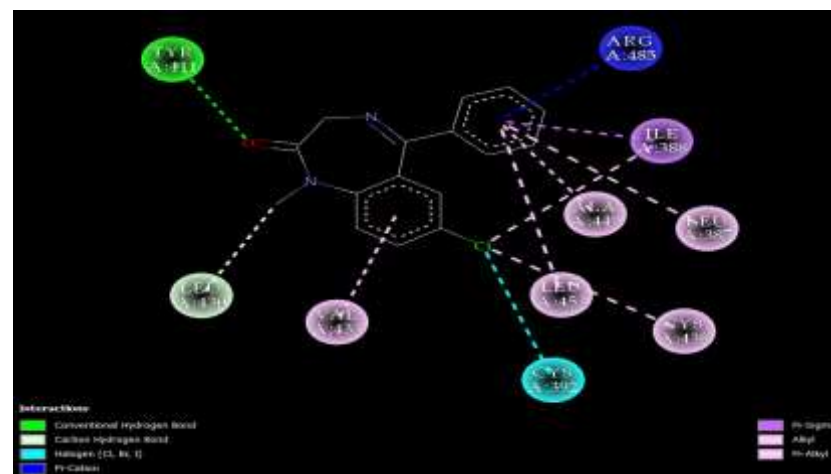


(d)

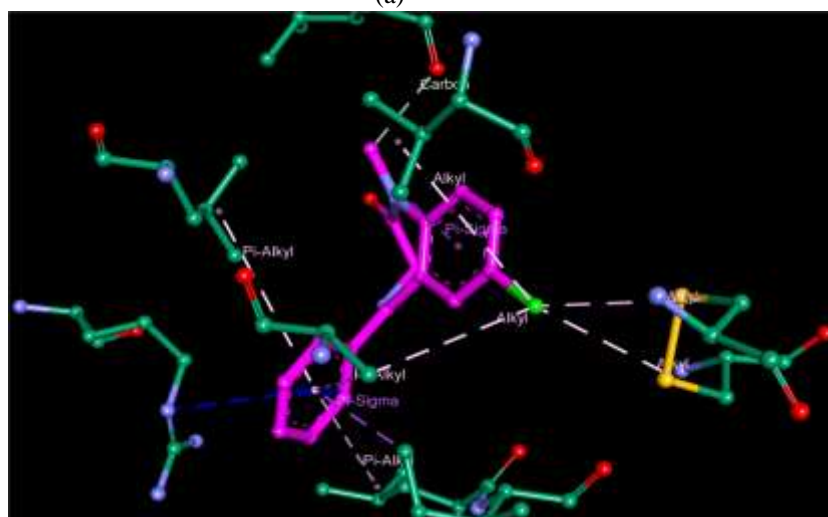
**Figura S8.** Análisis estructural de interacciones de ASH/LID. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/LID ORI (PDB: 3JQZ); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/LID DOC; LID ORI, en blanco; LID DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



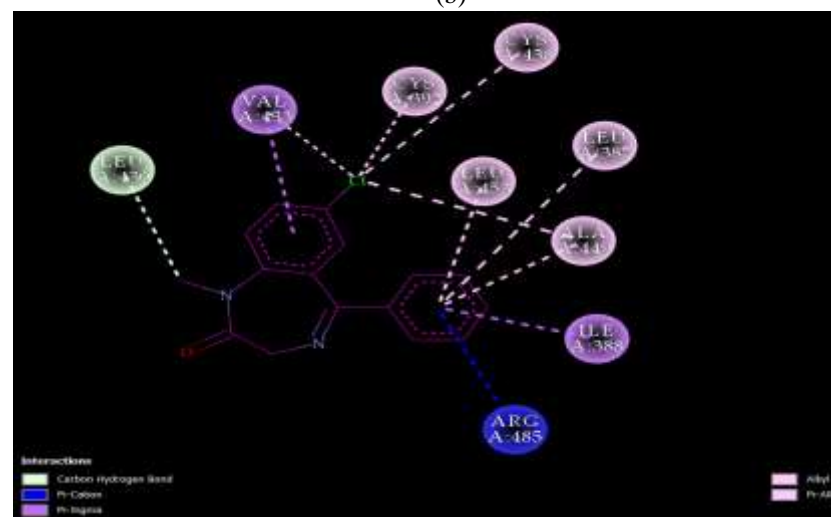
(a)



(b)



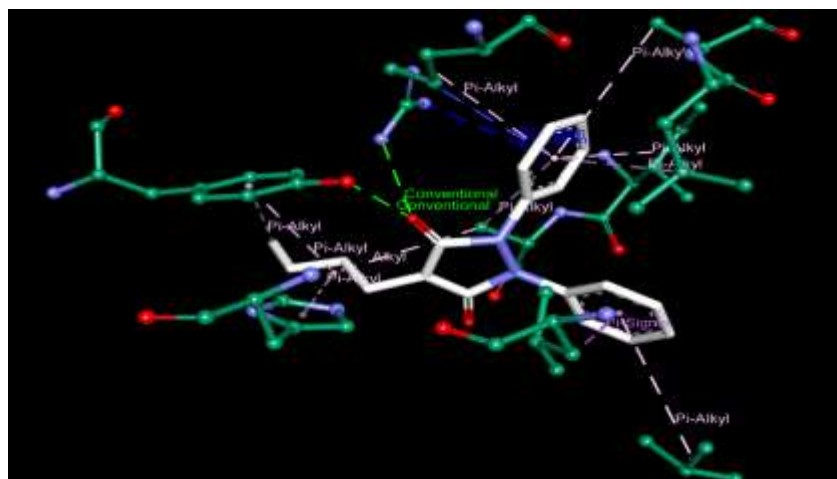
(c)



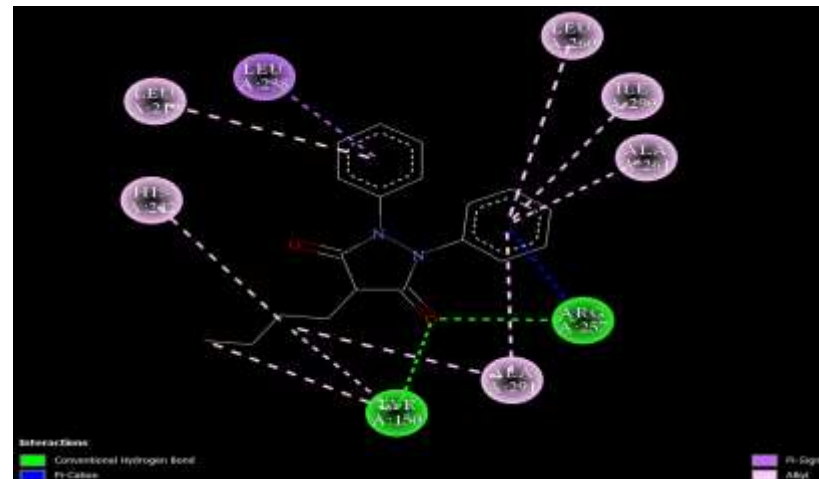
(d)

**Figura S9.** Análisis estructural de interacciones de ASH/DZP. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/DZP ORI (PDB: 2BXF); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/DZP DOC; DZP ORI, en blanco; DZP DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.

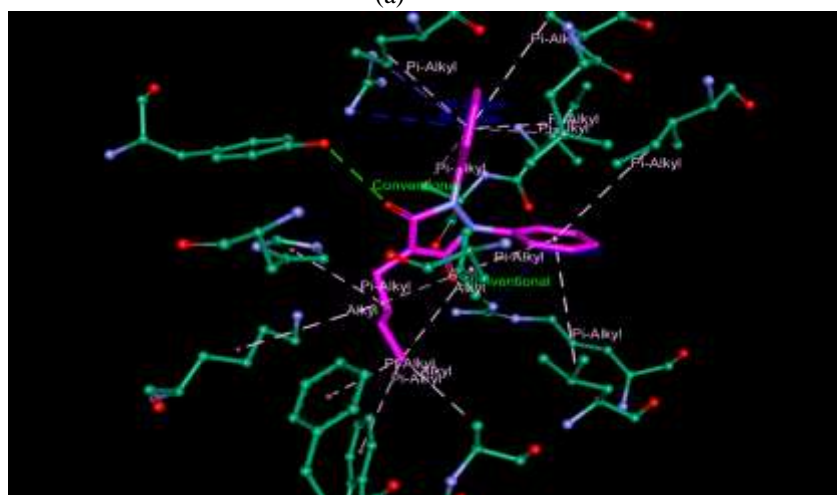




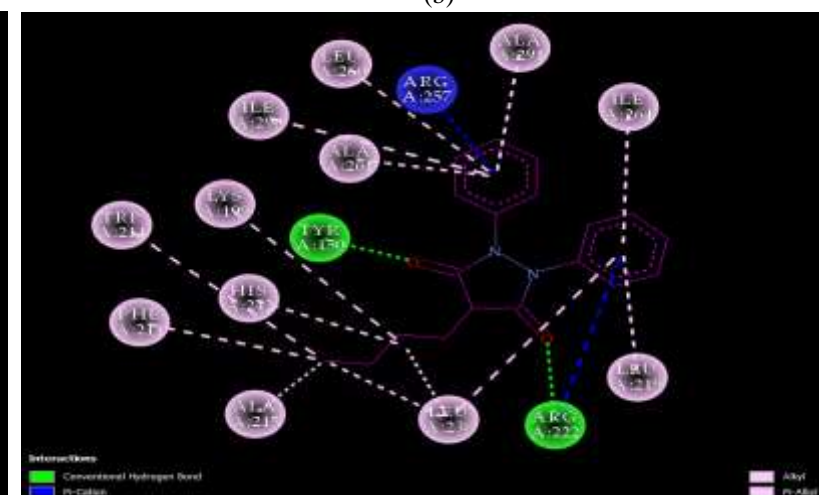
(a)



(b)

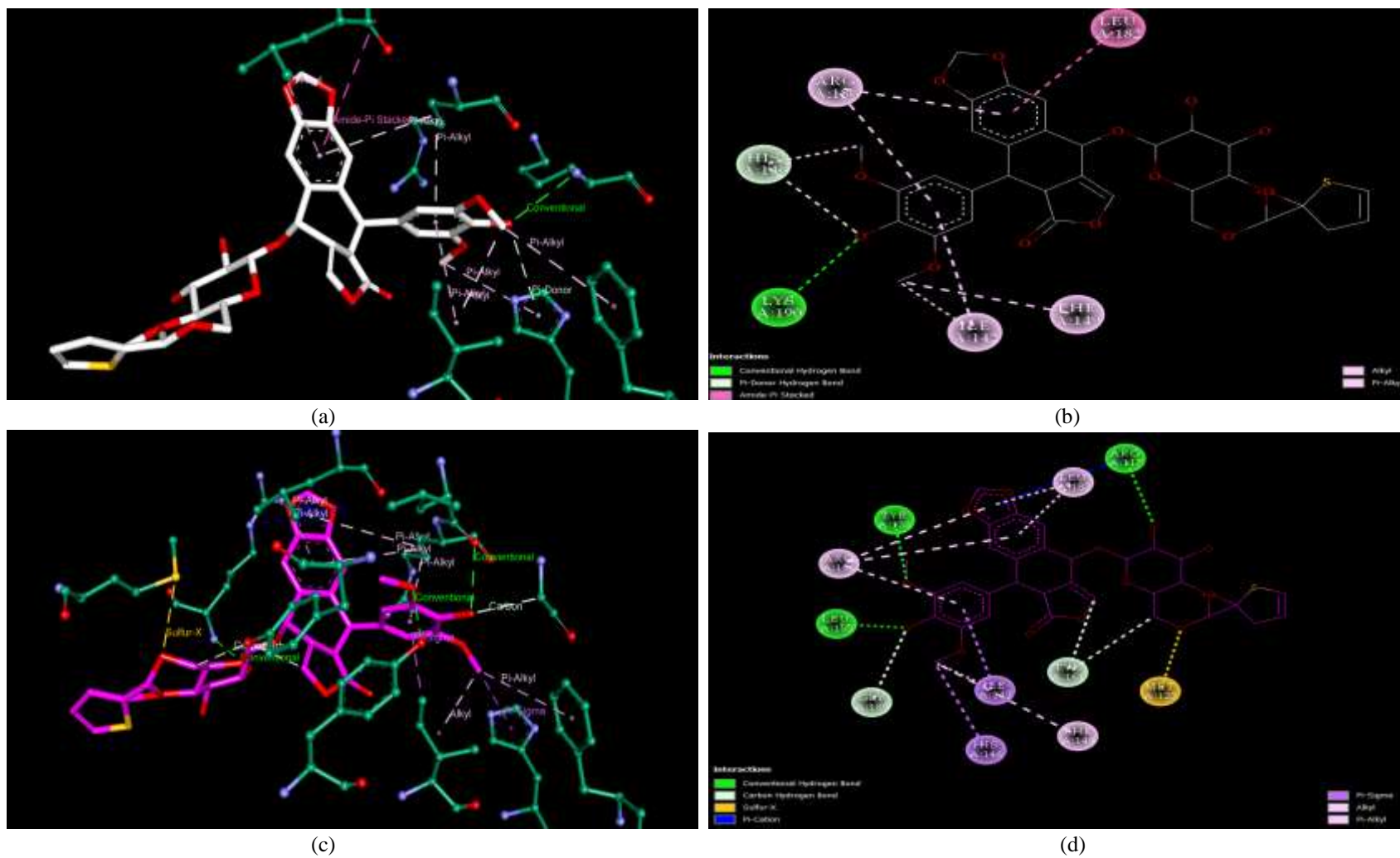


(c)

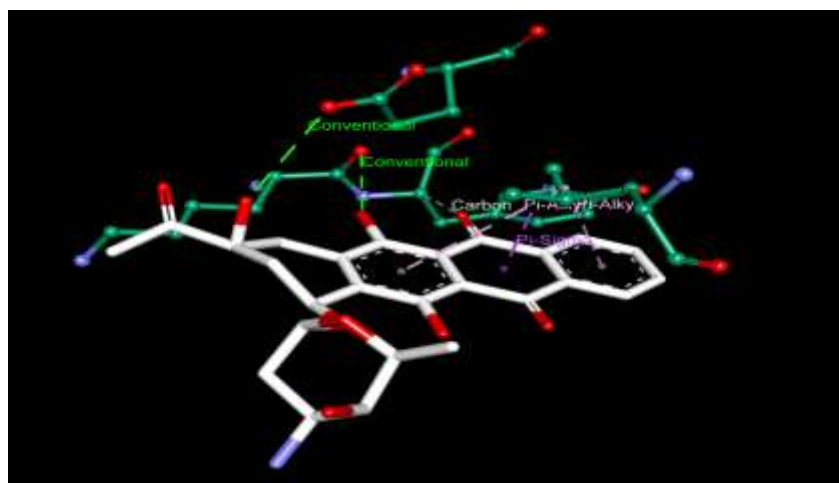


(d)

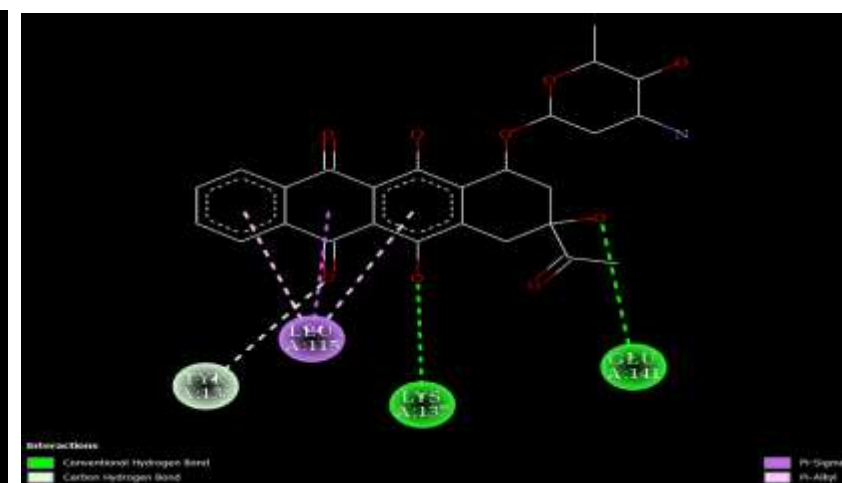
**Figura S11.** Análisis estructural de interacciones de ASH/FBZ. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/FBZ ORI (PDB: 2BXC); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/FBZ DOC; FBZ ORI, en blanco; FBZ DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



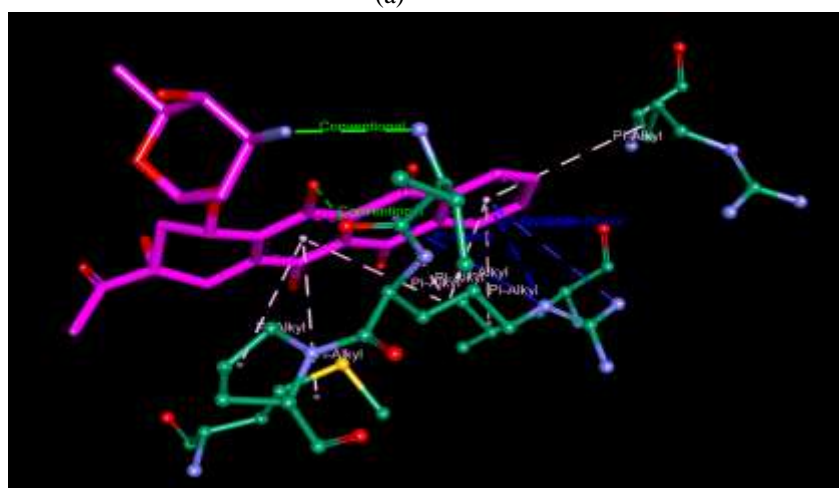
**Figura S12.** Análisis estructural de interacciones de ASH/TPS. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/TPS ORI (PDB: 4L9Q); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/TPS DOC; TPS ORI, en blanco; TPS DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



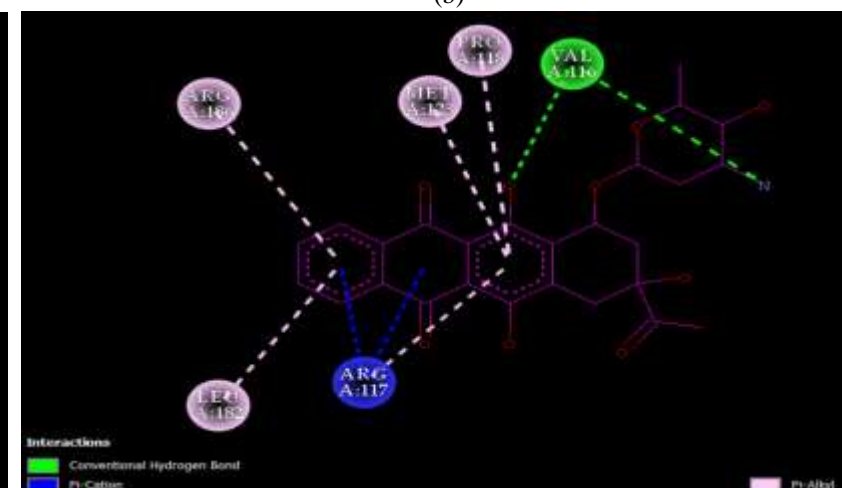
(a)



(b)

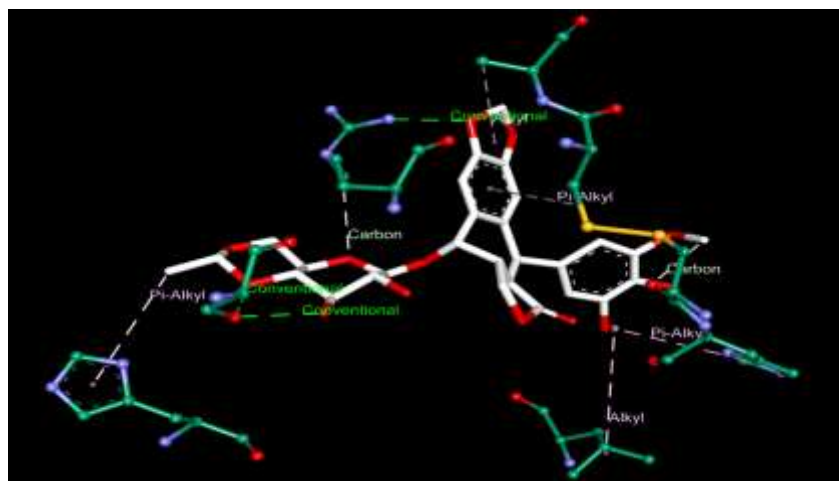


(c)

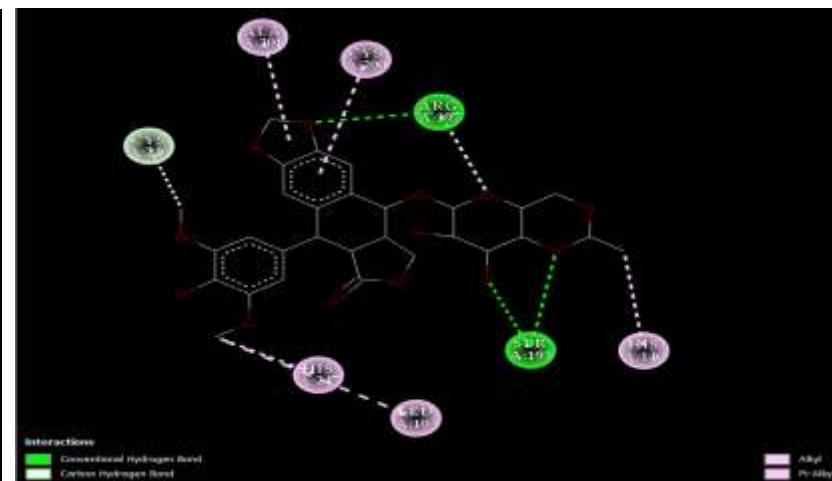


(d)

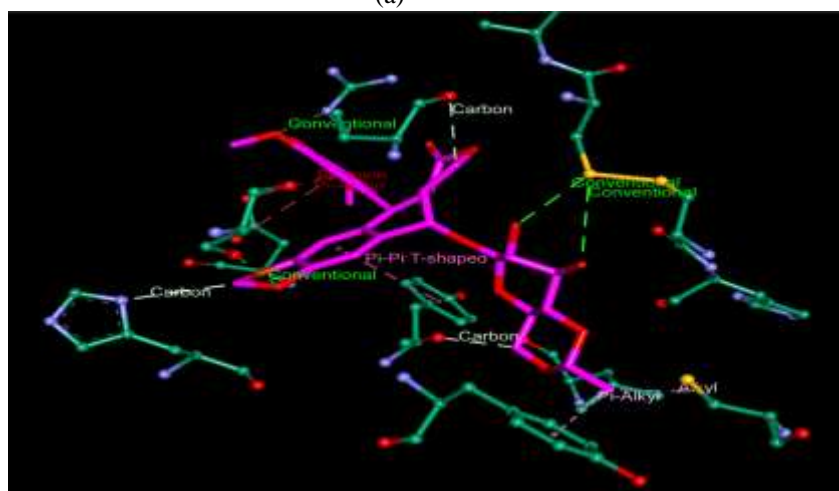
**Figura S13.** Análisis estructural de interacciones de ASH/IBC. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IBC ORI (PDB: 4LB2); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IBC DOC; IBC ORI, en blanco; IBC DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



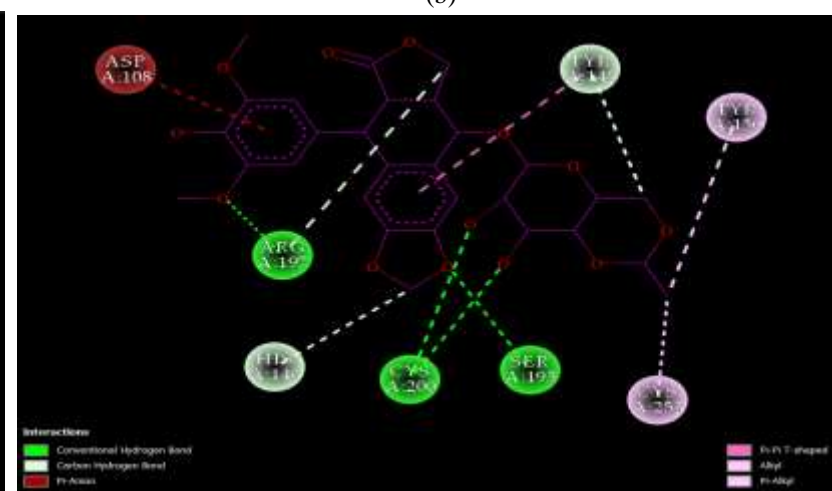
(a)



(b)

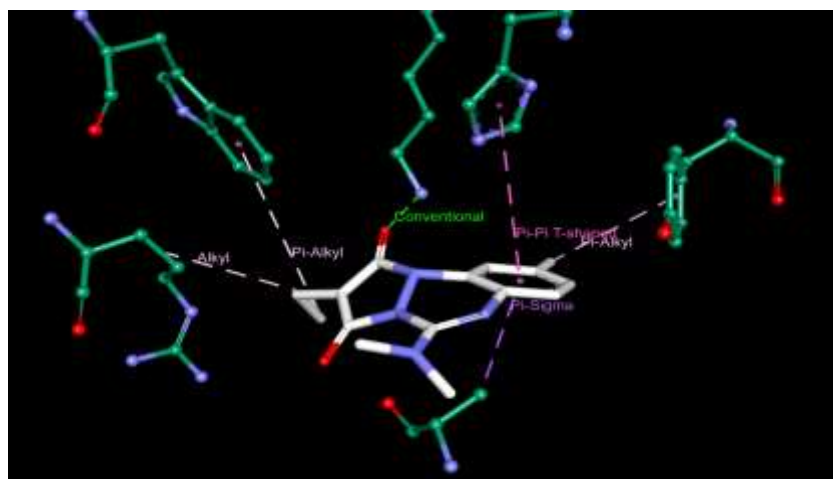


(c)

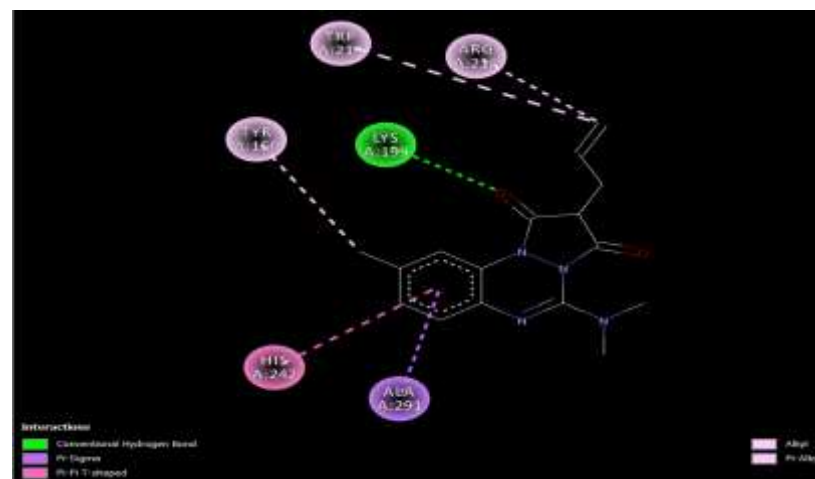


(d)

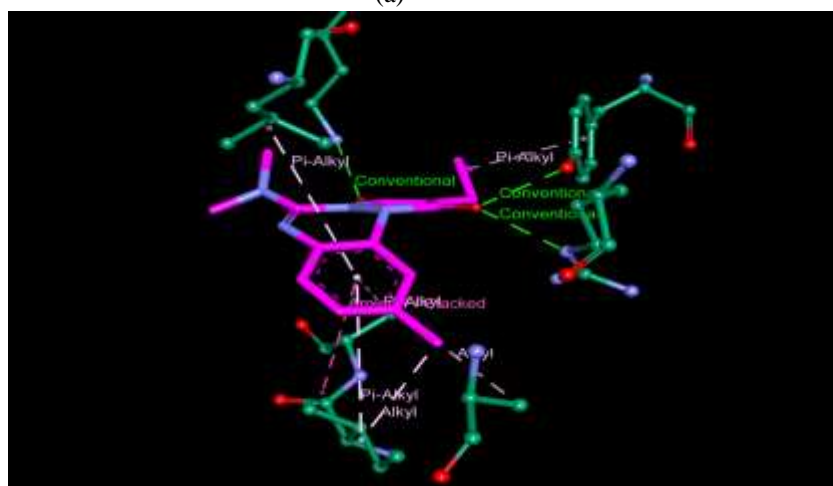
**Figura S14.** Análisis estructural de interacciones de ASH/EPS. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/EPS ORI (PDB: 4LB9); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/EPS DOC; EPS ORI, en blanco; EPS DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



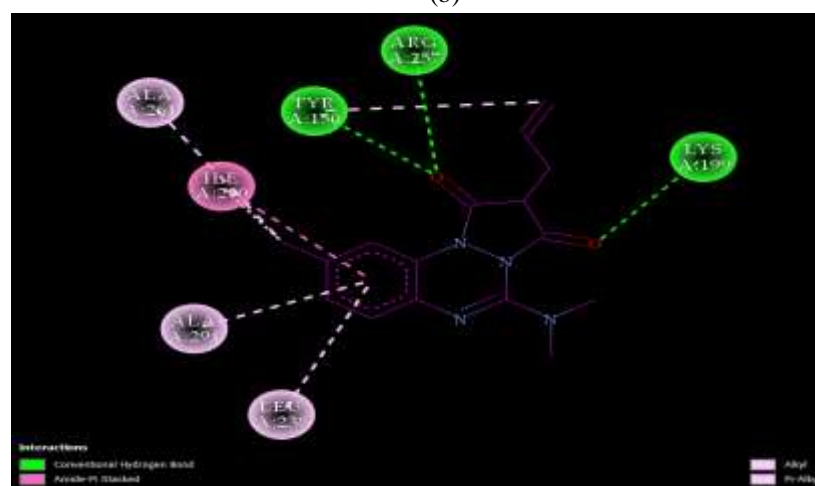
(a)



(b)

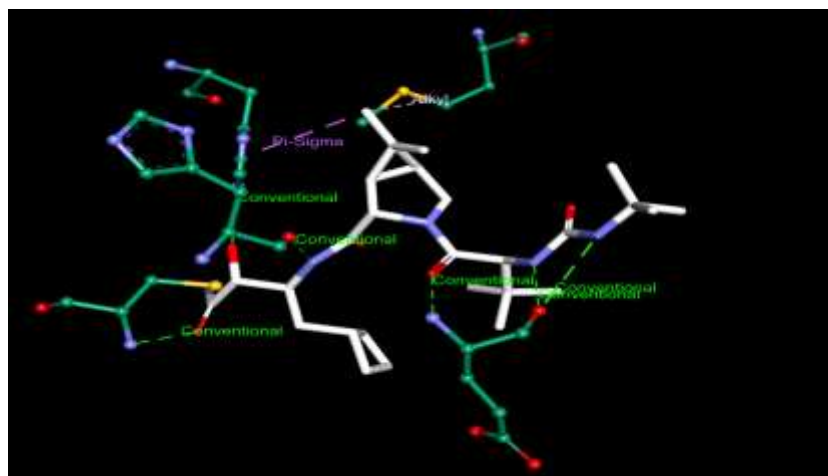


(c)

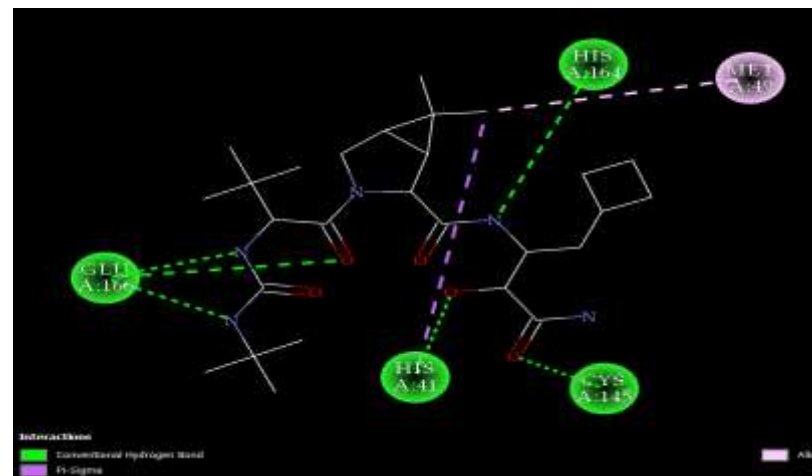


(d)

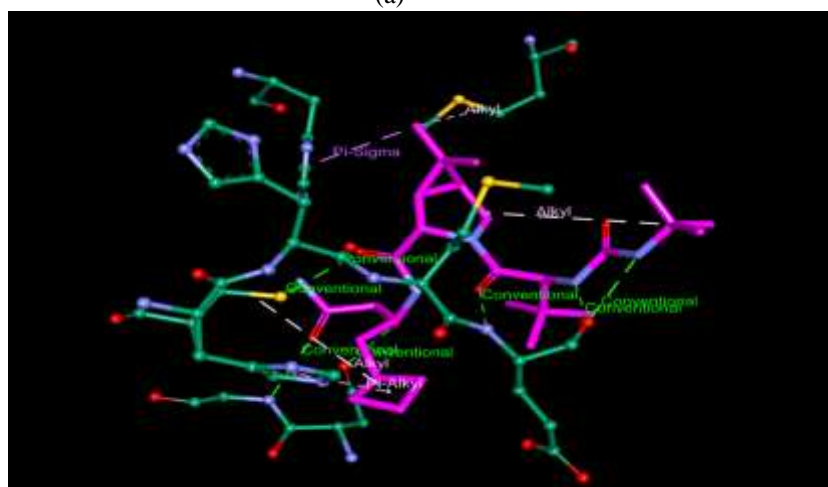
**Figura S15.** Análisis estructural de interacciones de ASH/APP. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/APP ORI (PDB: 2BX8); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/APP DOC; APP ORI, en blanco; APP DOC, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



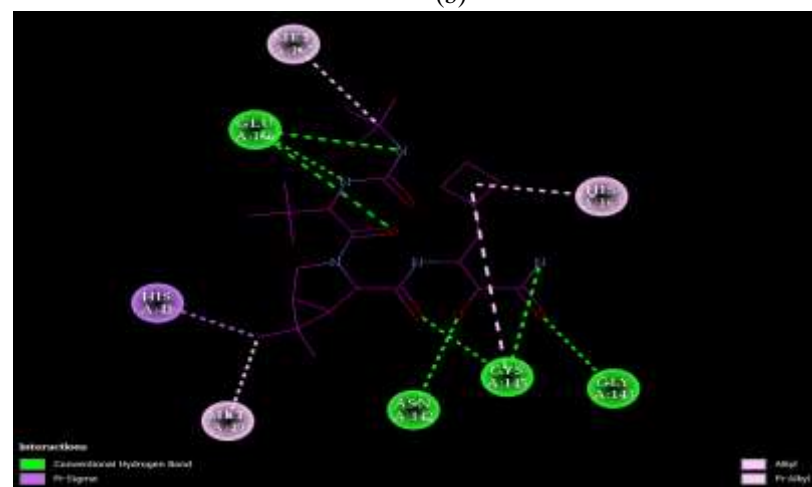
(a)



(b)

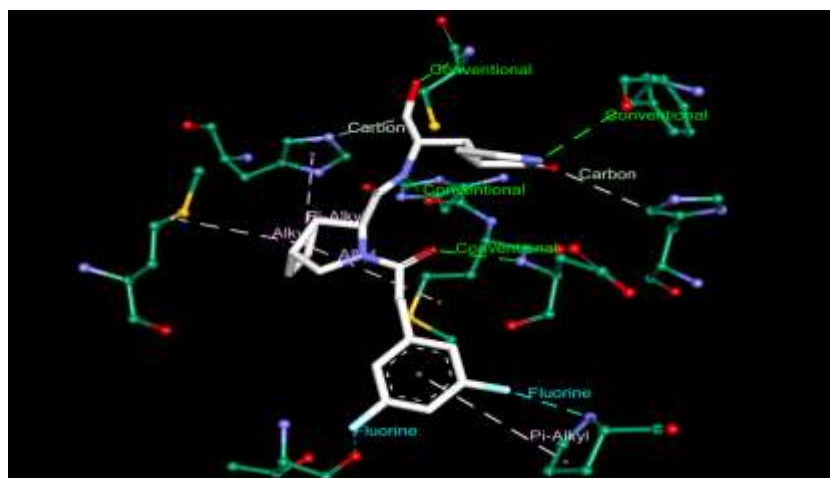


(c)

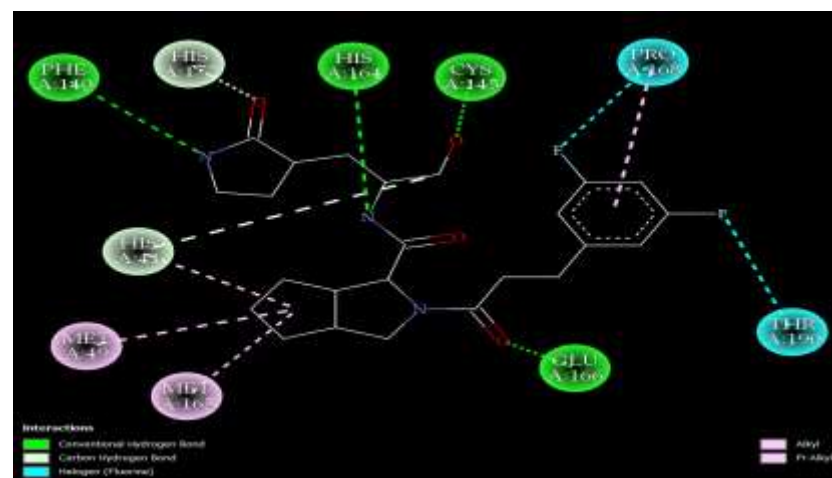


(d)

**Figura S16.** Análisis estructural de interacciones de PPS/BCP. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/BCP ORI (PDB: 6WNP); **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/BCP DOC; BCP ORI, en blanco; BCP DOC, en magenta; PPS, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



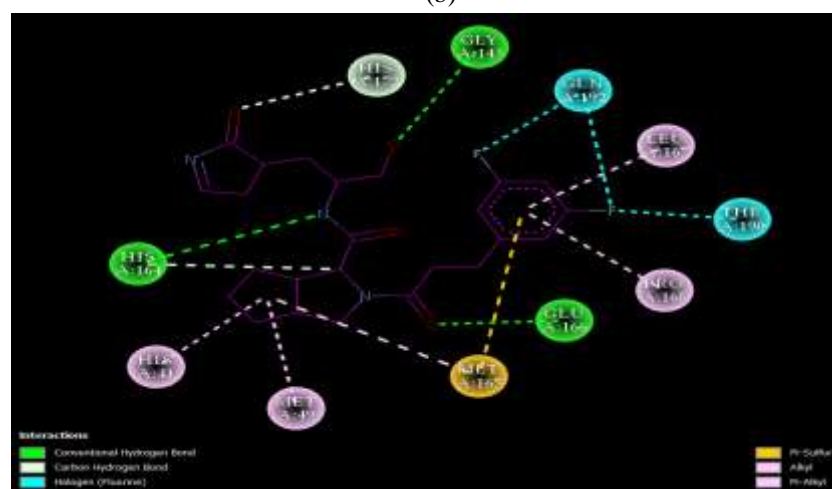
(a)



(b)

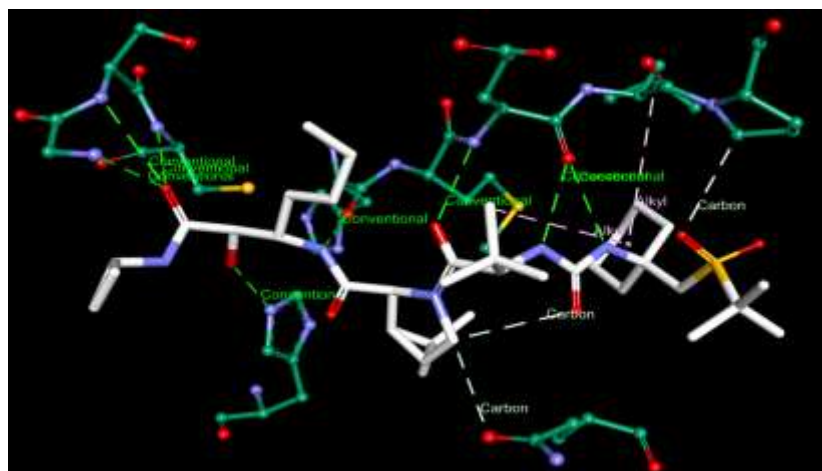


(c)

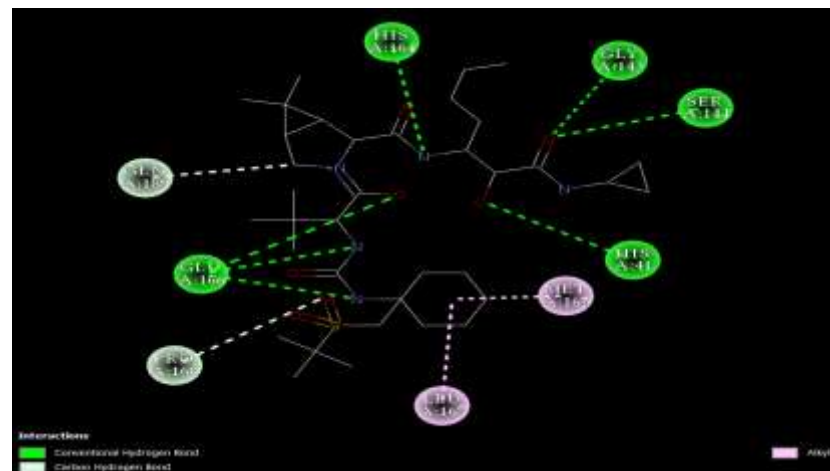


(d)

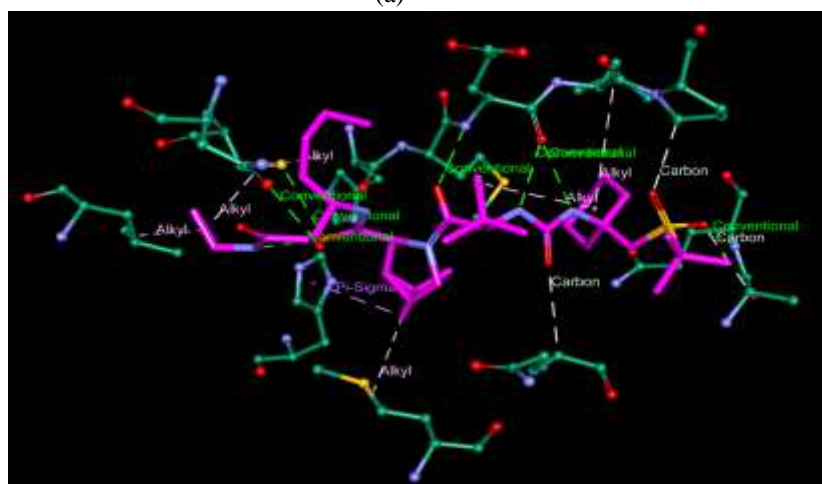
**Figura S17.** Análisis estructural de interacciones de PPS/MI23. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/MI23 ORI (PDB: 7D31); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/MI23 DOC; MI23 ORI, en blanco; MI23 DOC, en magenta; PPS, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



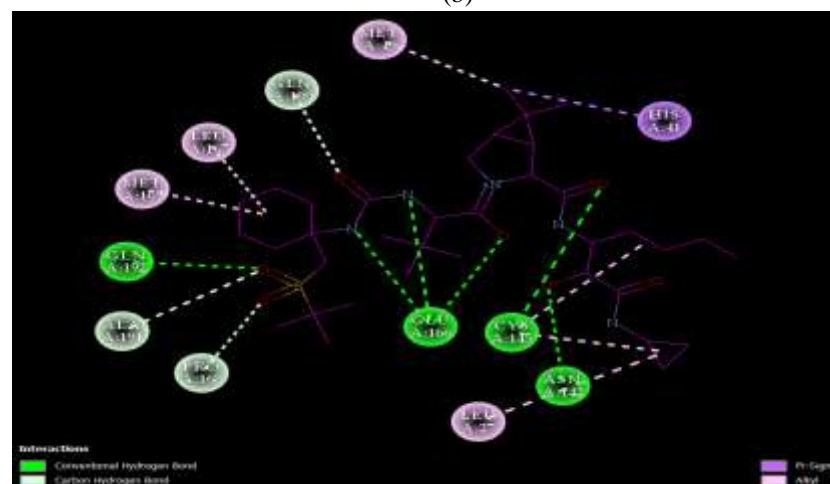
(a)



(b)

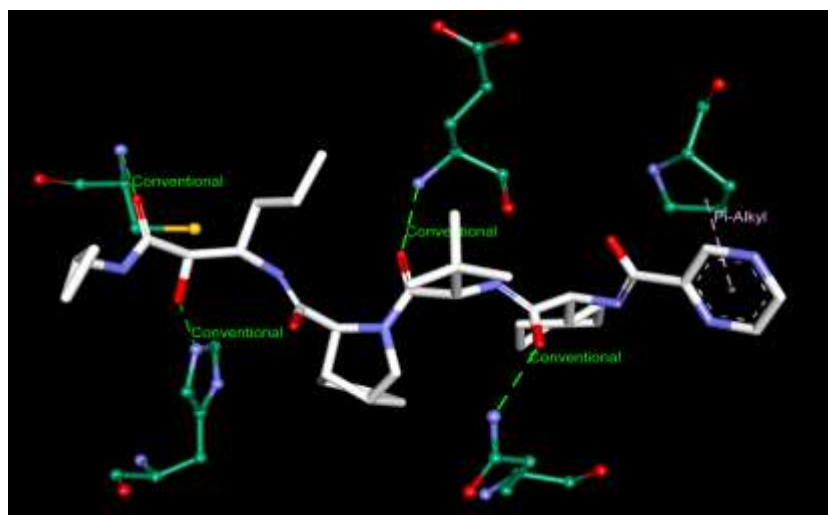


(c)

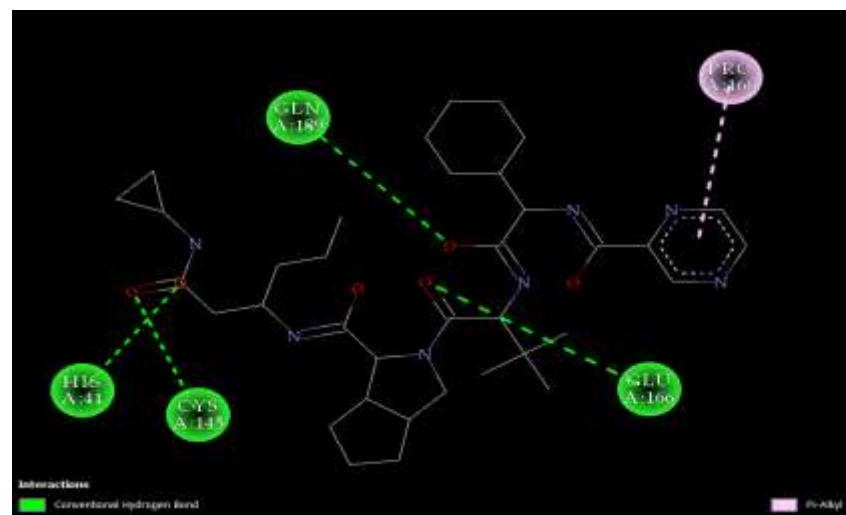


(d)

**Figura S18.** Análisis estructural de interacciones de PPS/NPV. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/NPV ORI (PDB: 7D10); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/NPV DOC; NPV ORI, en blanco; NPV DOC, en magenta; PPS, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



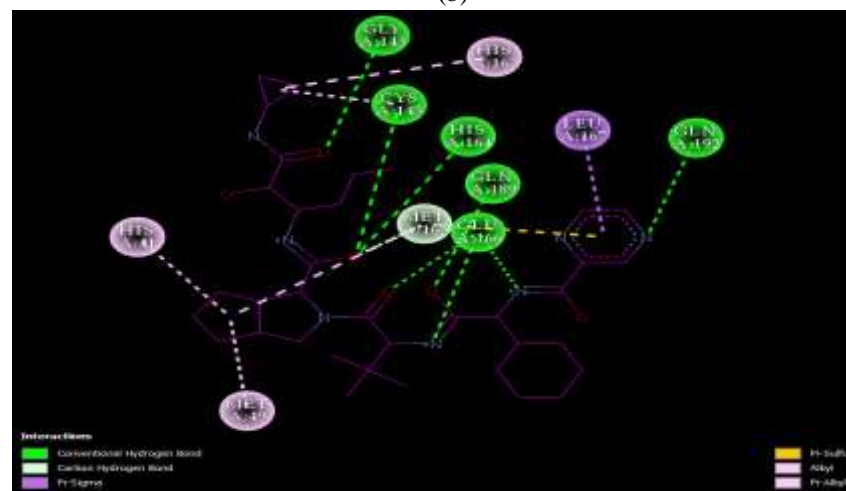
(a)



(b)

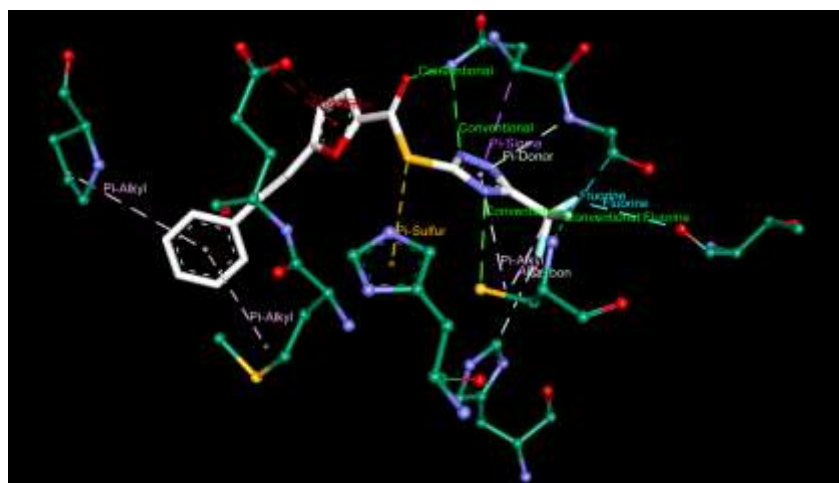


(c)

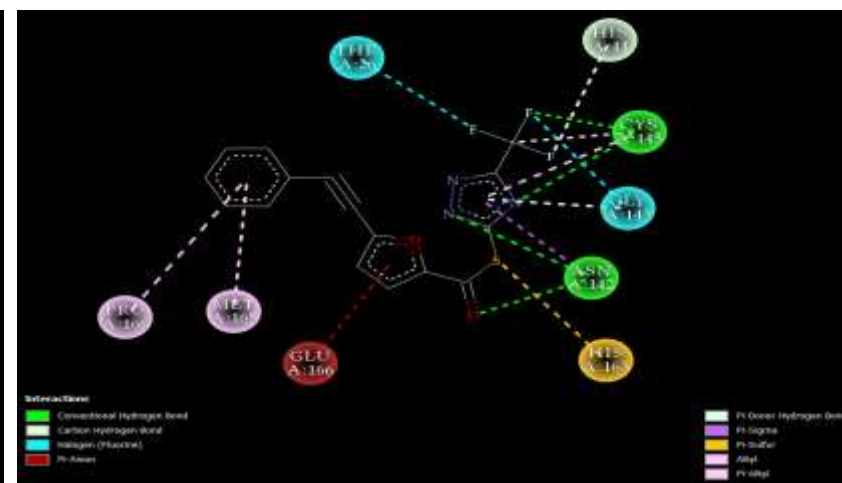


(d)

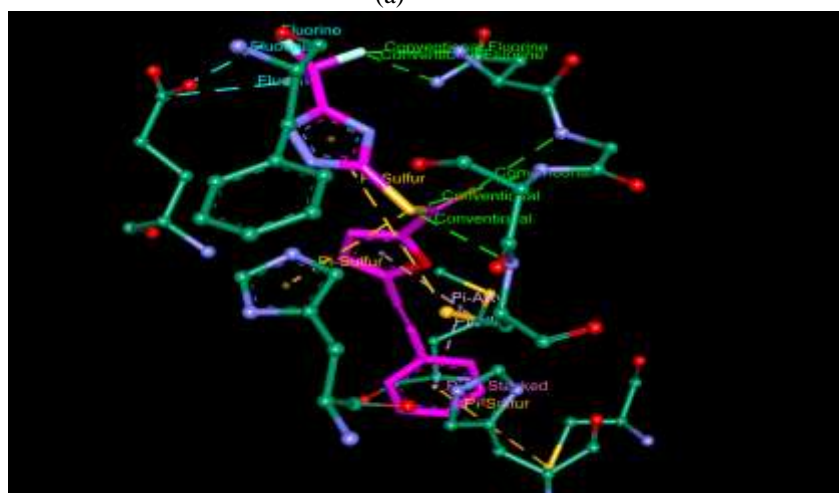
**Figura S19.** Análisis estructural de interacciones de PPS/TPV. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/TPV ORI (PDB: 7C7P); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/TPV DOC; TPV ORI, en blanco; TPV DOC, en magenta; PPS, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



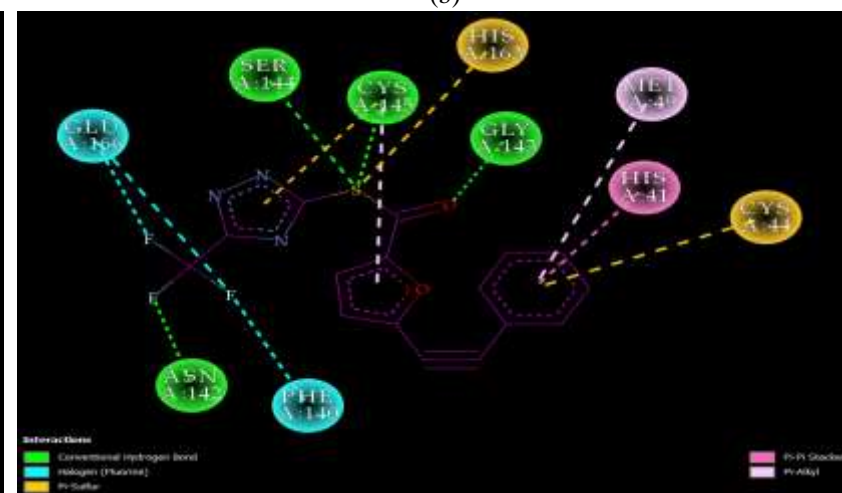
(a)



(b)

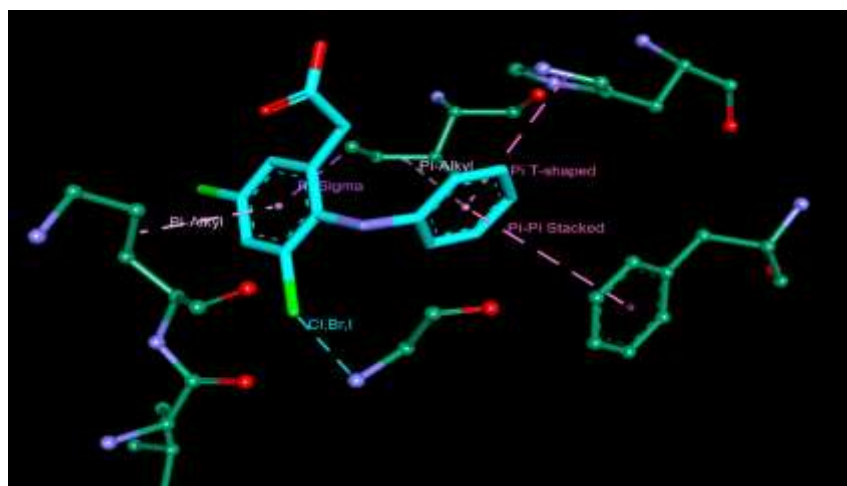


(c)

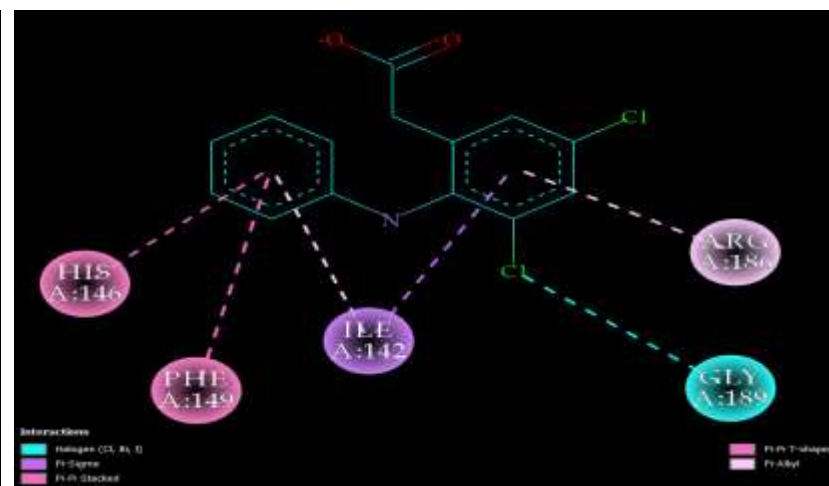


(d)

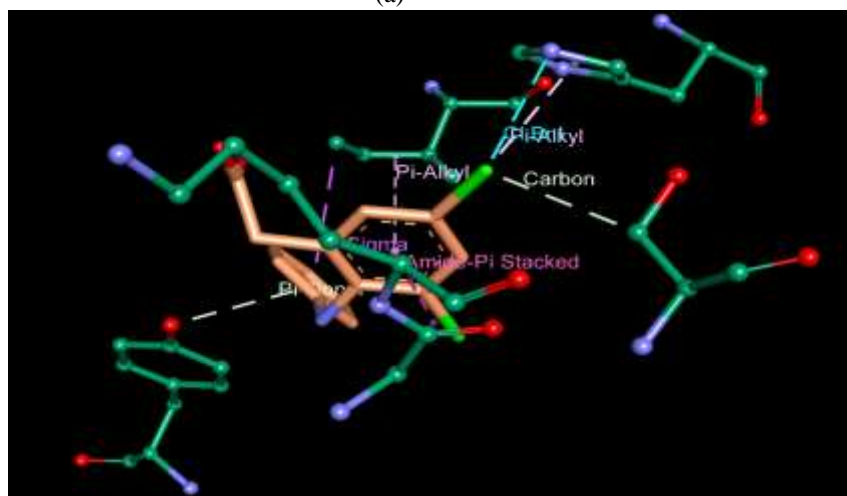
**Figura S20.** Análisis estructural de interacciones de PPS/F3F. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/F3F ORI (PDB: 2GZ8); **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de PPS/F3F DOC; F3F ORI, en blanco; F3F DOC, en magenta; PPS, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



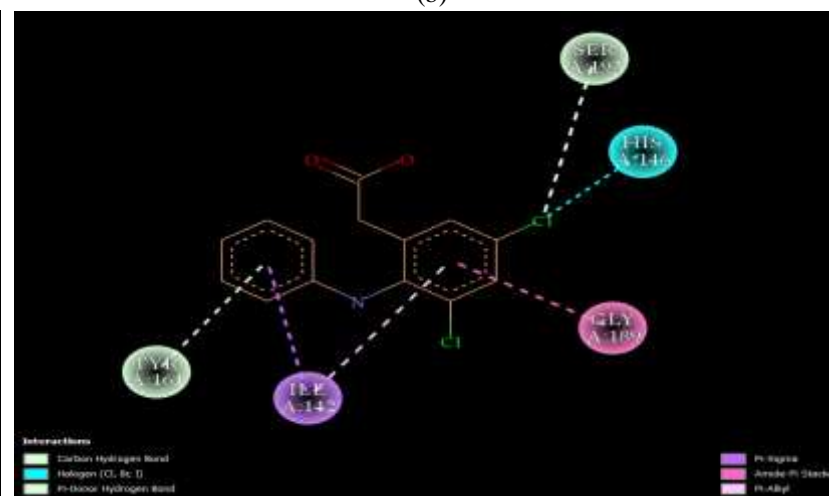
(a)



(b)

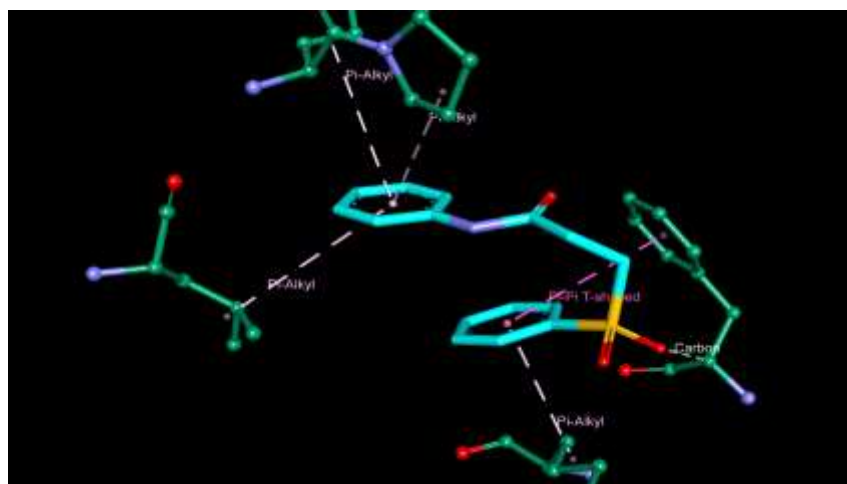


(c)

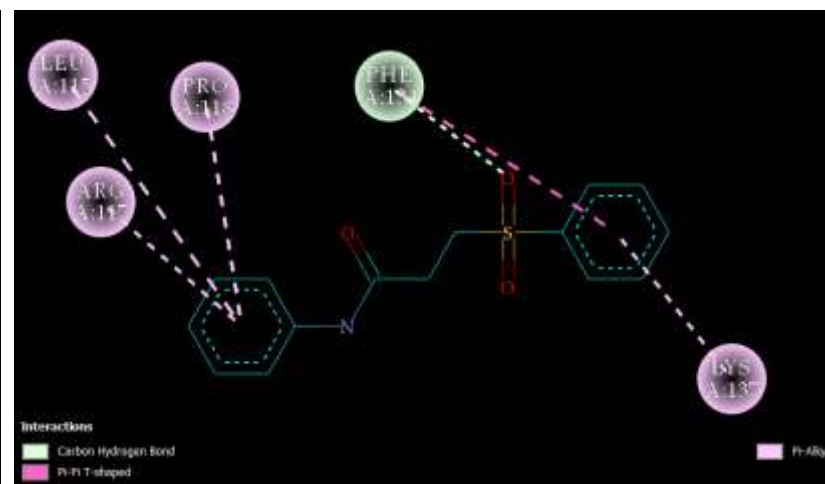


(d)

**Figura S21.** Análisis estructural de interacciones de ASH/DIF-M. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/DIF ORI-M; **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/DIF DOC-M; DIF ORI-M, en cian; DIF-M DOC, en salmón; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



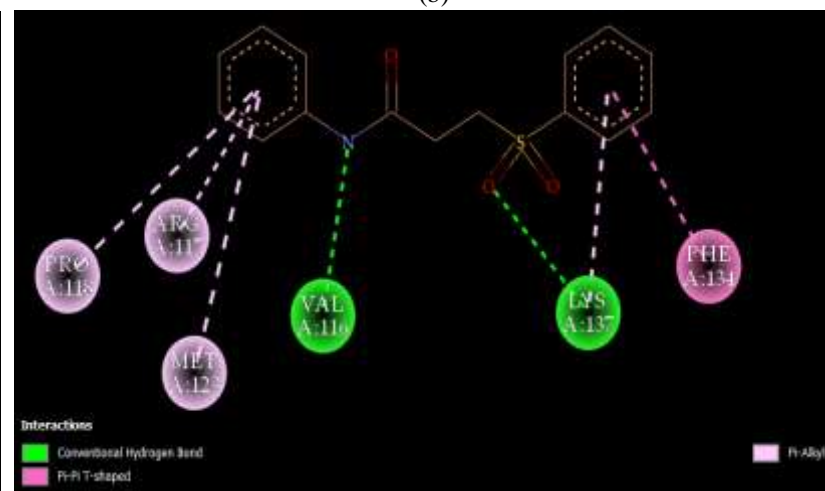
(a)



(b)

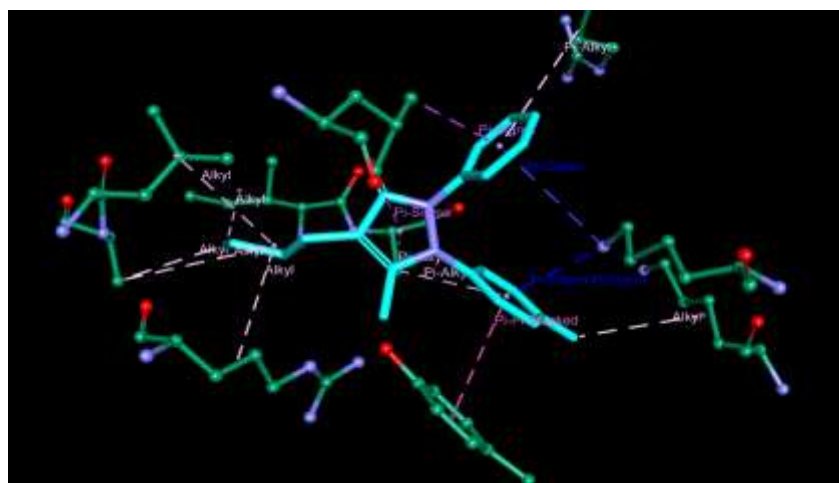


(c)

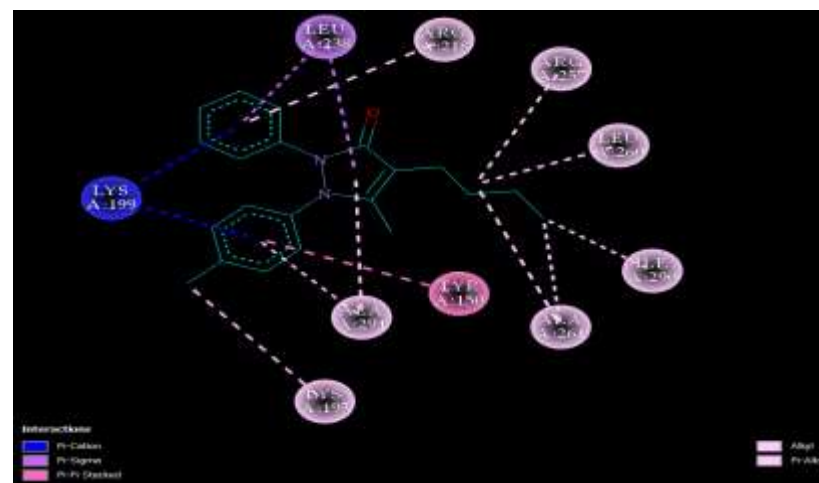


(d)

**Figura S22.** Análisis estructural de interacciones de ASH/BIC-M. **a** y **b**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/BIC ORI-M; **c** y **d**: Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/BIC DOC-M; BIC ORI-M, en cyan; BIC DOC-M, en salmón; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



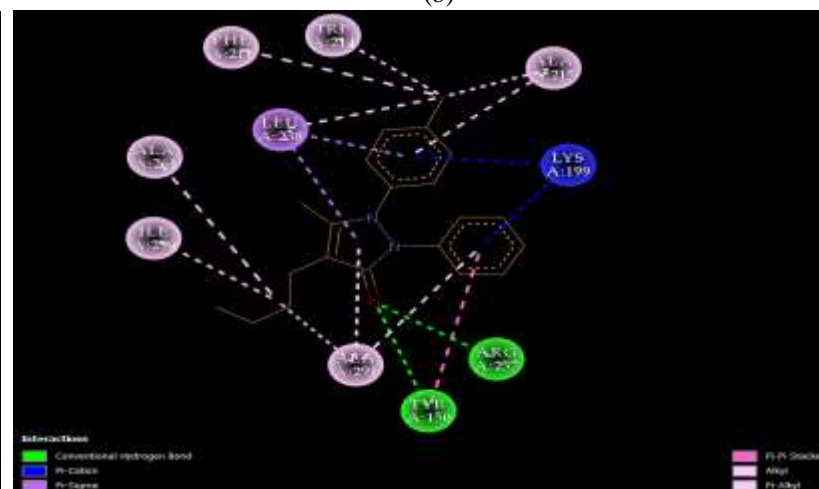
(a)



(b)

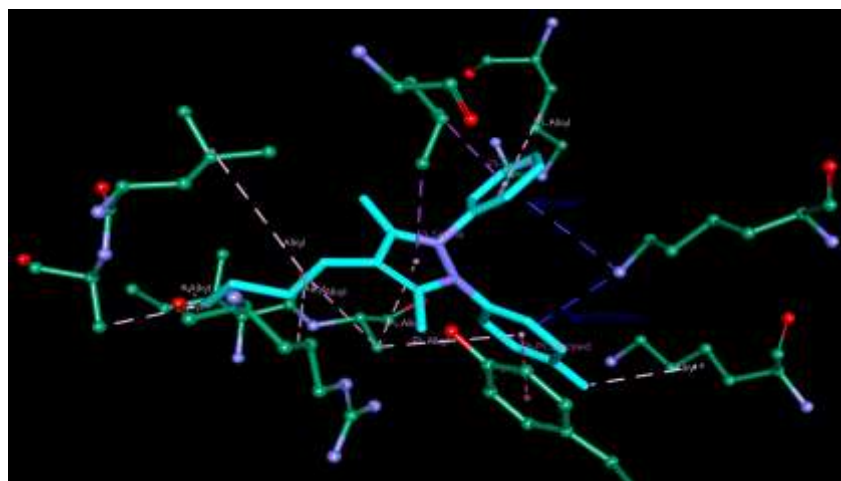


(c)

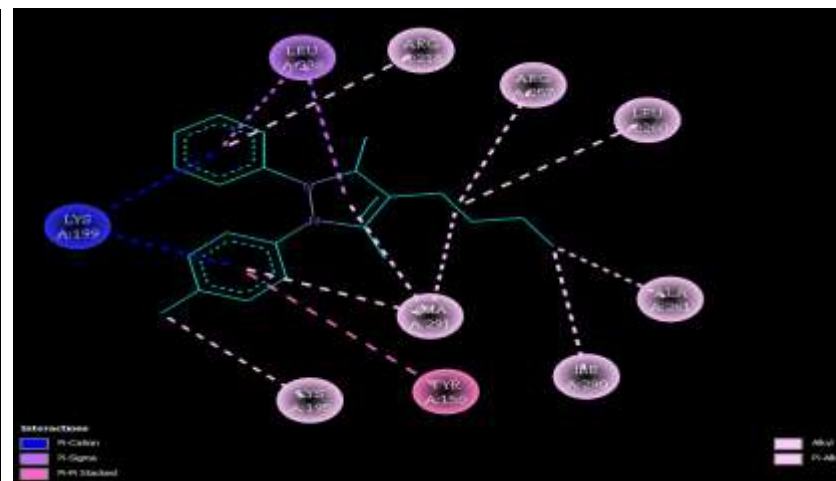


(d)

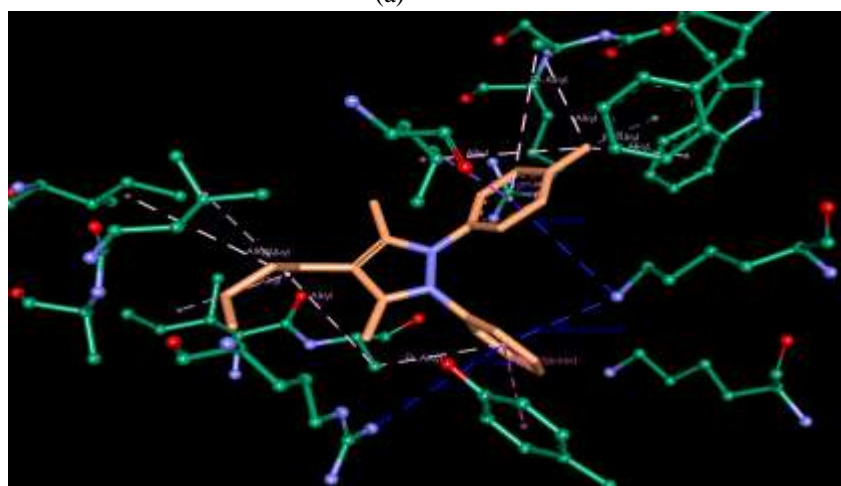
**Figura S23.** Análisis estructural de interacciones de ASH/OXI-M. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/OXI ORI-M; **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/OXI DOC-M; OXI ORI-M, en blanco; OXI DOC-M, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



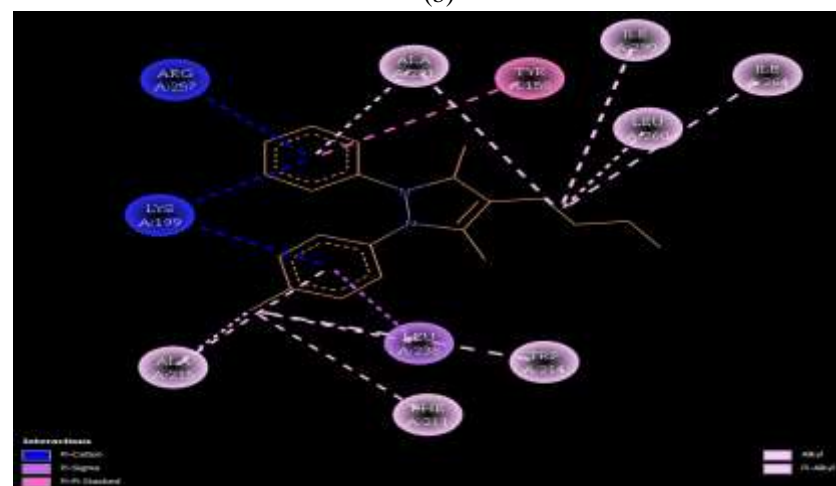
(a)



(b)

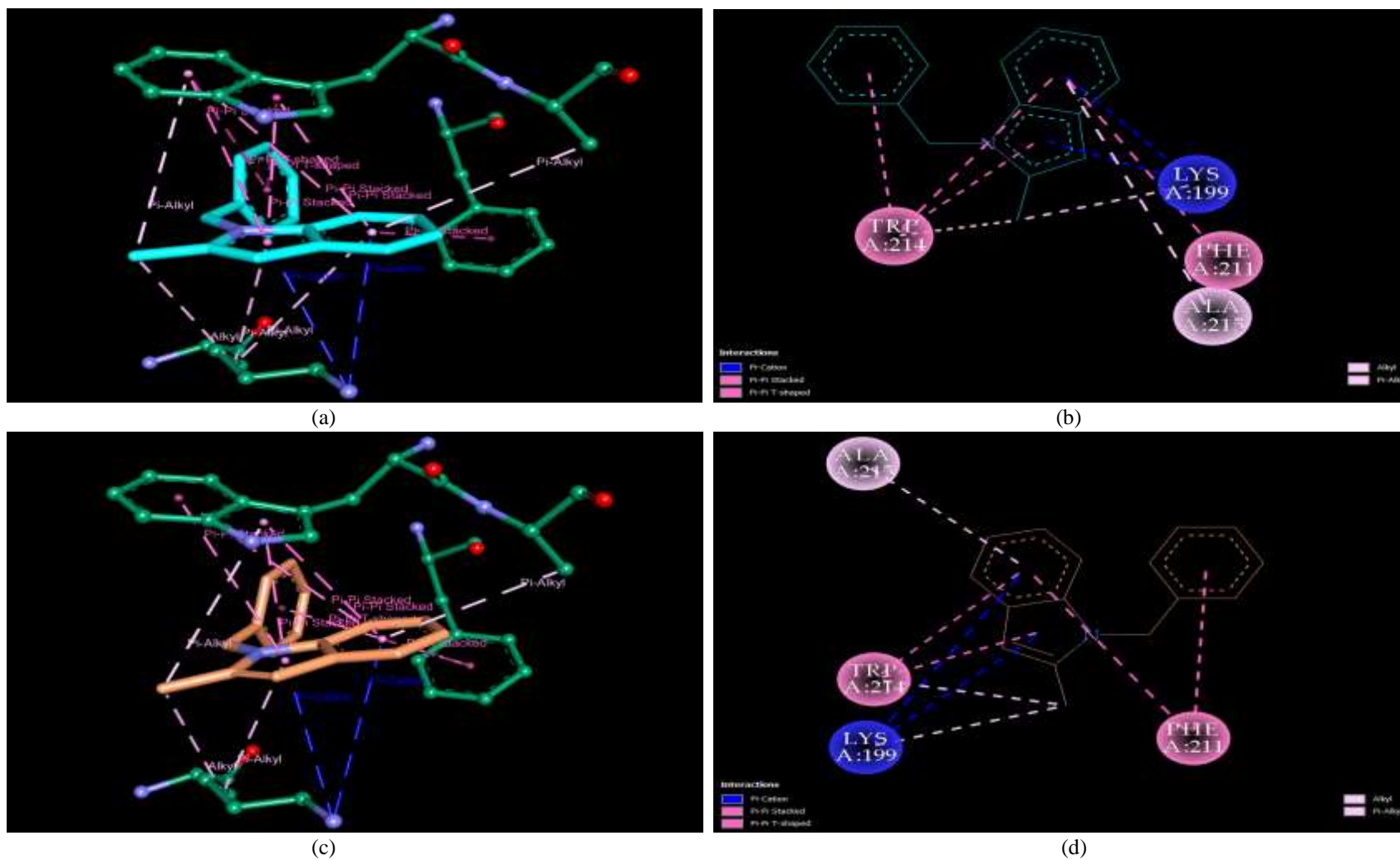


(c)



(d)

**Figura S24.** Análisis estructural de interacciones de ASH/OXI-M2. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/OXI ORI-M2; **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/OXI DOC-M2; OXI ORI-M2, en blanco; OXI DOC-M2, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.



**Figura S25.** Análisis estructural de interacciones de ASH/IND-M. **a y b:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IND ORI-M; **c y d:** Imágenes 3D y 2D, respectivamente de ASH/IND DOC-M; IND ORI-M, en blanco; IND DOC-M, en magenta; ASH, en verde bosque; El código de color de enlaces se muestra en las imágenes 2D.

## 11.1. Script en código Python para la preparación del receptor en Autodock4

```
# PrepRecAD4.py
import os

from MolKit import Read
import MolKit.molecule
import MolKit.protein
from AutoDockTools.MoleculePreparation import AD4ReceptorPreparation

if __name__ == '__main__':
    import sys
    import getopt

    def usage():
        "Print helpful, accurate usage statement to stdout."
        print "Usage: prepare_receptor4.py -r filename"
        print
        print " Description of command..."
        print "-r receptor_filename "
        print " supported file types include pdb,mol2,pdbq,pdbqs,pdbqt, possibl
pqr,cif"
        print " Optional parameters:"
        print " [-v] verbose output (default is minimal output)"
        print " [-o pdbqt_filename] (default is 'molecule_name.pdbqt')"
        print " [-A] type(s) of repairs to make: "
        print " 'bonds_hydrogens': build bonds and add hydrogens "
        print " 'bonds': build a single bond from each atom with no bonds to its
closest neighbor"
        print " 'hydrogens': add hydrogens"
        print " 'checkhydrogens': add hydrogens only if there are none already"
        print " 'None': do not make any repairs "
        print " (default is 'None')"
        print " [-C] preserve all input charges ie do not add new charges "
        print " (default is addition of gasteiger charges)"
        print " [-p] preserve input charges on specific atom types, eg -p Zn -p Fe"
        print " [-U] cleanup type:"
        print " 'nphs': merge charges and remove non-polar hydrogens"
        print " 'lps': merge charges and remove lone pairs"
        print " 'waters': remove water residues"
        print " 'nonstdres': remove chains composed entirely of residues of"
        print " types other than the standard 20 amino acids"
        print " 'deleteAltB': remove XX@B atoms and rename XX@A
atoms->XX"
        print " (default is 'nphs_lps_waters_nonstdres') "
        print " [-e] delete every nonstd residue from any chain"
        print " 'True': any residue whose name is not in this list:"
        print " ['CYS','ILE','SER','VAL','GLN','LYS','ASN', "
        print " 'PRO','THR','PHE','ALA','HIS','GLY','ASP', "
        print " 'LEU','ARG','TRP','GLU','TYR','MET', "
        print " 'HID','HSP','HIE','HIP','CYX','CSS']"
        print " will be deleted from any chain. "
        print " NB: there are no nucleic acid residue names at all "
        print " in the list and no metals. "
        print " (default is False which means not to do this)"
        print " [-M] interactive "
        print " (default is 'automatic': outputfile is written with no further user input)"
        print " [-d dictionary_filename] file to contain receptor summary information"

    # process command arguments
    try:
        opt_list, args = getopt.getopt(sys.argv[1:], 'r:vo:A:Cp:U:eM:d:')

    except getopt.GetoptError, msg:
        print 'prepare_receptor4.py: %s' % msg
        usage()
        sys.exit(2)

    files = os.listdir('Folder Dir')
    # mol = []
    for file in files:
        # ligand_filename = None
        receptor_filename = os.path.join("C:(Folder dir)# initialize

    required parameters
        #-s: receptor
        #receptor_filename = None

    # optional parameters
    verbose = None
    #-A: repairs to make: add bonds and/or hydrogens or checkhydrogens
    repairs = ''
    #-C default: add gasteiger charges
```

```

charges_to_add = 'gasteiger'
#-p preserve charges on specific atom types
preserve_charge_types=None
#-U: cleanup by merging nphs_lps, nphs, lps, waters, nonstdres
cleanup = "nphs_lps_waters_nonstdres"
#-o outputfilename
outputfilename = None
#-m mode
mode = 'automatic'
#-e delete every nonstd residue from each chain
delete_single_nonstd_residues = None
#-d dictionary
dictionary = None

#'r:vo:A:Cp:U:eMh'
for o, a in opt_list:
    if o in ('-r', '--r'):
        receptor_filename = a
        if verbose: print 'set receptor_filename to ', a
    if o in ('-v', '--v'):
        verbose = True
        if verbose: print 'set verbose to ', True
    if o in ('-o', '--o'):
        outputfilename = a
        if verbose: print 'set outputfilename to ', a
    if o in ('-A', '--A'):
        repairs = a
        if verbose: print 'set repairs to ', a
    if o in ('-C', '--C'):
        charges_to_add = None
        if verbose: print 'do not add charges'
    if o in ('-p', '--p'):
        if not preserve_charge_types:
            preserve_charge_types = a
        else:
            preserve_charge_types = preserve_charge_types + ',' + a
        if verbose: print 'preserve initial charges on ', preserve_charge_types
    if o in ('-U', '--U'):
        cleanup = a
        if verbose: print 'set cleanup to ', a
    if o in ('-e', '--e'):
        delete_single_nonstd_residues = True
        if verbose: print 'set delete_single_nonstd_residues to True'
    if o in ('-M', '--M'):
        mode = a
        if verbose: print 'set mode to ', a
    if o in ('-d', '--d'):
        dictionary = a
        if verbose: print 'set dictionary to ', dictionary
    if o in ('-h', '--'):
        usage()
        sys.exit()

if not receptor_filename:
    print 'prepare_receptor4: receptor filename must be specified.'
    usage()
    sys.exit()

mols = Read(receptor_filename)
if verbose: print 'read ', receptor_filename
mol = mols[0]
preserved = {}
if charges_to_add is not None and preserve_charge_types is not None:
    preserved_types = preserve_charge_types.split(',')
    if verbose: print "preserved_types=", preserved_types
    for t in preserved_types:
        if verbose: print 'preserving charges on type->', t
        if not len(t): continue
        ats = mol.allAtoms.get(lambda x: x.autodock_element==t)
        if verbose: print "preserving charges on ", ats.name
        for a in ats:
            if a.chargeSet is not None:
                preserved[a] = [a.chargeSet, a.charge]

if len(mols)>1:
    if verbose: print "more than one molecule in file"
    #use the molecule with the most atoms
    ctr = 1
    for m in mols[1:]:
        ctr += 1
        if len(m.allAtoms)>len(mol.allAtoms):
            mol = m
            if verbose: print "mol set to ", ctr, "th molecule with",
            len(mol.allAtoms), "atoms"
    mol.buildBondsByDistance()

```

```

if verbose:
    print "setting up RPO with mode=", mode,
    print "and outputfilename= ", outputfilename
    print "charges_to_add=", charges_to_add
    print "delete_single_nonstd_residues=", delete_single_nonstd_residues

RPO = AD4ReceptorPreparation(mol, mode, repairs, charges_to_add,

                             cleanup, outputfilename=outputfilename,
                             preserved=preserved,

delete_single_nonstd_residues=delete_single_nonstd_residues,
                             dict=dictionary)
if charges_to_add is not None:
    #restore any previous charges
    for atom, chargeList in preserved.items():
        atom._charges[chargeList[0]] = chargeList[1]
        atom.chargeSet = chargeList[0]
# To execute this command type:
# PrepRecAD4.py -r pdb_file -o outputfilename -A checkhydrogens

```

## 11.2. Script en código Python para la preparación del ligando en Autodock4

```
# PrepLigAD4.py
import os

from MolKit import Read

from AutoDockTools.MoleculePreparation import AD4LigandPreparation

if __name__ == '__main__':
    import sys
    import getopt

def usage():
    "Print helpful, accurate usage statement to stdout."
    print "Usage: prepare_ligand4.py -l filename"
    print
    print " Description of command..."
    print "-l ligand_filename (.pdb or .mol2 or .pdbqt format)"
    print " Optional parameters:"
    print " [-v] verbose output"
    print " [-o pdbqt_filename] (default output filename is ligand_filename_stem"
+ ".pdbqt)"
    print " [-d] dictionary to write types list and number of active torsions "
    print " [-A] type(s) of repairs to make:\n\t\t bonds_hydrogens, bonds,"
hydrogens (default is to do no repairs)"
    print " [-C] do not add charges (default is to add gasteiger charges)"
    print " [-p] preserve input charges on atom type, eg -p Zn"
    print " (default is not to preserve charges on any specific atom type)"
    print " [-U] cleanup type:\n\t\t nphs_lps, nphs, lps, '' (default is 'nphs_lps')
"
    print " [-B] type(s) of bonds to allow to rotate "
    print " (default sets 'backbone' rotatable and 'amide' + 'guanidinium'
non-rotatable)"
    print " [-R] index for root"
    print " [-F] check for and use largest non-bonded fragment (default is not to do this)"
    print " [-M] interactive (default is automatic output)"
    print " [-I] string of bonds to inactivate composed of "
    print " of zero-based atom indices eg 5_13_2_10 "
    print " will inactivate atoms[5]-atoms[13] bond "
    print " and atoms[2]-atoms[10] bond "
    print " (default is not to inactivate any specific bonds)"
    print " [-Z] inactivate all active torsions "
    print " (default is leave all rotatable active except amide and guanidinium)"
    print " [-g] attach all nonbonded fragments "
    print " [-s] attach all nonbonded singletons: "
    print " NB: sets attach all nonbonded fragments too"
    print " (default is not to do this)"

# process command arguments
try:
    opt_list, args = getopt.getopt(sys.argv[1:], 'l:vo:d:A:Cp:U:B:R:MFI:Zgsh')
except getopt.GetoptError, msg:
    print 'prepare_ligand4.py: %s' %msg
    usage()
    sys.exit(2)

# initialize required parameters
#-l: ligand

files = os.listdir('Dir Ligand')
mol = []
for file in files:
    # ligand_filename = None
    ligand_filename = os.path.join("Folder Directory", file)

    # optional parameters
    verbose = None
    add_bonds = False
    #-A: repairs to make: add bonds and/or hydrogens repairs = ""
    #-C default: add gasteiger charges
    charges_to_add = 'gasteiger'
    #-p preserve charges on specific atom types
```

```

preserve_charge_types=''
#-U: cleanup by merging nphs_lps, nphs, lps
cleanup = "nphs_lps"
#-B named rotatable bond type(s) to allow to rotate
#allowed_bonds = ""
allowed_bonds = "backbone"
#-r root
root = 'auto'
#-o outputfilename
outputfilename = None
#-F check_for_fragments
check_for_fragments = False
#-I bonds_to_inactivate
bonds_to_inactivate = ""
#-Z inactivate all torsions
inactivate_all_torsions = False
#-g attach_nonbonded_fragments
attach_nonbonded_fragments = False
#-s attach_nonbonded_singletons
attach_singletons = False
#-m mode
mode = 'automatic'
#-d dictionary
dict = None

#l:vo:d:A:CKU:B:R:MFI:Zgs'
for o, a in opt_list:
    #print "o=", o, " a=", a
    if o in ('-l', '--l'):
        ligand_filename = a
        if verbose: print 'set ligand_filename to ', a
    if o in ('-v', '--v'):
        verbose = True
        if verbose: print 'set verbose to ', True
    if o in ('-o', '--o'):
        outputfilename = a
        if verbose: print 'set outputfilename to ', a

    if o in ('-d', '--d'):
        dict = a
        if verbose: print 'set dict to ', a
    if o in ('-A', '--A'):
        repairs = a
        if verbose: print 'set repairs to ', a
    if o in ('-C', '--C'):
        charges_to_add = None
        if verbose: print 'do not add charges'
    if o in ('-p', '--p'):
        preserve_charge_types+=a
        preserve_charge_types+=", "
        if verbose: print 'preserve initial charges on ', preserve_charge_types
    if o in ('-U', '--U'):
        cleanup = a
        if verbose: print 'set cleanup to merge ', a
    if o in ('-B', '--B'):
        allowed_bonds = a
        if verbose: print 'allow ', a, 'bonds set to rotate'
    if o in ('-R', '--R'):
        root = a
        if verbose: print 'set root to ', root
    if o in ('-F', '--F'):
        check_for_fragments = True
        if verbose: print 'set check_for_fragments to True'
    if o in ('-M', '--M'):
        mode = a
        if verbose: print 'set mode to ', a
    if o in ('-I', '--I'):
        bonds_to_inactivate = a
        if verbose: print 'set bonds_to_inactivate to ', a
    if o in ('-Z', '--Z'):
        inactivate_all_torsions = True
        if verbose: print 'set inactivate_all_torsions to ', inactivate_all_torsions
    if o in ('-g', '--g'):
        attach_nonbonded_fragments = True
        if verbose: print 'set attach_nonbonded_fragments to ', attach_nonbonded_fragments
    if o in ('-s', '--s'):
        attach_singletons = True
        if verbose: print 'set attach_singletons to ', attach_singletons
    if o in ('-h', '--'):
        usage()
        sys.exit()

if not ligand_filename:
    print 'prepare_ligand4: ligand filename must be specified.'
    usage()
    sys.exit()

```

```

if attach_singletons:
    attach_nonbonded_fragments = True
    if verbose: print "using attach_singletons so attach_nonbonded_fragments also"

mols = Read(ligand_filename)
if verbose: print 'read ', ligand_filename
mol = mols[0]
if len(mols)>1:
    if verbose:
        print "more than one molecule in file"
        #use the one molecule with the most atoms
        ctr = 1
        for m in mols[1:]:
            ctr += 1
            if len(m.allAtoms)>len(mol.allAtoms):
                mol = m
            if verbose:
                print "mol set to ", ctr, "th molecule with", len(mol.allAtoms),
"atoms"
coord_dict = {}
for a in mol.allAtoms: coord_dict[a] = a.coords

mol.buildBondsByDistance()
if charges_to_add is not None:
    preserved = {}
    preserved_types = preserve_charge_types.split(',')
    for t in preserved_types:
        if not len(t): continue
        ats = mol.allAtoms.get(lambda x: x.autodock_element==t)
        for a in ats:
            if a.chargeSet is not None:
                preserved[a] = [a.chargeSet, a.charge]

if verbose:
    print "setting up LPO with mode=", mode,
    print "and outputfilename= ", outputfilename
    print "and check_for_fragments=", check_for_fragments
    print "and bonds_to_inactivate=", bonds_to_inactivate
    LPO = AD4LigandPreparation(mol, mode, repairs, charges_to_add,
        cleanup, allowed_bonds, root,
        outputfilename=outputfilename,
        dict=dict, check_for_fragments=check_for_fragments,
        bonds_to_inactivate=bonds_to_inactivate,
        inactivate_all_torsions=inactivate_all_torsions,

attach_nonbonded_fragments=attach_nonbonded_fragments,
        attach_singletons=attach_singletons)
#do something about atoms with too many bonds (?)
#FIX THIS: could be peptide ligand (???)
# ??use isPeptide to decide chargeSet??
if charges_to_add is not None:
    #restore any previous charges
    for atom, chargeList in preserved.items():
        atom._charges[chargeList[0]] = chargeList[1]
        atom.chargeSet = chargeList[0]
if verbose: print "returning ", mol.returnCode
bad_list = []
for a in mol.allAtoms:
    if a in coord_dict.keys() and a.coords!=coord_dict[a]:
        bad_list.append(a)
    if len(bad_list):
        print len(bad_list), ' atom coordinates changed!'
        for a in bad_list:
            print a.name, ":", coord_dict[a], ' -> ', a.coords
    else:
        if verbose: print "No change in atomic coordinates"
if mol.returnCode!=0:
    sys.stderr.write(mol.returnMsg+"\n")
sys.exit(mol.returnCode)

# 4 execute --> command type:
# PreLigAD4.py -l pdb_file -v

```

### 11.3. Script en código Python para el cálculo de área enterrada SAS

```
def buried_area(operation, atoms1, atoms2,
               probeRadius = 1.4, vertexDensity = 2.0):

    xyzr = atom_xyzr(atoms1 + atoms2)
    n1 = len(atoms1)
    xyzr1 = xyzr[:n1]
    xyzr2 = xyzr[n1:]
    xyzr12 = xyzr

    failed = False
    import MoleculeSurface as ms
    try:
        s1 = ms.xyzr_surface_geometry(xyzr1, probeRadius, vertexDensity)
        s2 = ms.xyzr_surface_geometry(xyzr2, probeRadius, vertexDensity)
        s12 = ms.xyzr_surface_geometry(xyzr12, probeRadius, vertexDensity)
    except ms.Surface_Calculation_Error:
        failed = True

    if failed or not s1[6] or not s2[6] or not s12[6]:
        # All component calculation failed.
        try:
            s1 = ms.xyzr_surface_geometry(xyzr1, probeRadius, vertexDensity,
                                         all_components = False)
            s2 = ms.xyzr_surface_geometry(xyzr2, probeRadius, vertexDensity,
                                         all_components = False)
            s12 = ms.xyzr_surface_geometry(xyzr12, probeRadius, vertexDensity,
                                         all_components = False)
        except ms.Surface_Calculation_Error:
            raise CommandError, 'Surface calculation failed.'
        from chimera import replyobj
        replyobj.warning('Calculation of some surface components failed. Using only single surface component. This
may give inaccurate areas if surfaces of either set of atoms or the combined set are disconnected.\n')

    # Assign per-atom buried areas.
    aareas1, aareas2, aareas12 = s1[3], s2[3], s12[3]
    ases121 = asas121 = ases122 = asas122 = 0
    for ai,a in enumerate(atoms1):
        a.buriedSESArea = aareas1[ai,0] - aareas12[ai,0]
        a.buriedSASArea = aareas1[ai,1] - aareas12[ai,1]
        ases121 += aareas12[ai,0]
        asas121 += aareas12[ai,1]
    for ai,a in enumerate(atoms2):
        a.buriedSESArea = aareas2[ai,0] - aareas12[n1+ai,0]
        a.buriedSASArea = aareas2[ai,1] - aareas12[n1+ai,1]
        ases122 += aareas12[n1+ai,0]
        asas122 += aareas12[n1+ai,1]
    careas1, careas2, careas12 = s1[4], s2[4], s12[4]
    ases1, asas1 = area_sums(careas1)
    ases2, asas2 = area_sums(careas2)
    ases12, asas12 = area_sums(careas12)
    bsas1 = asas1 - asas121
    bsas2 = asas2 - asas122
    bsas = 0.5 * (bsas1 + bsas2)
    bses1 = ases1 - ases121
    bses2 = ases2 - ases122
    bses = 0.5 * (bses1 + bses2)

    # TODO: include atomspec's in output message.
    msg = ('Buried solvent accessible surface area\n'
          ' B1SAS = %.6g, B2SAS = %.6g, BaveSAS = %.6g\n'
          ' (A1 = %.6g, A2 = %.6g, A12 = %.6g = %.6g + %.6g)\n' %
          (bsas1, bsas2, bsas, asas1, asas2, asas12, ases121, asas122) +
          'Buried solvent excluded surface area\n' +
          ' B1SES = %.6g, B2SES = %.6g, BaveSES = %.6g\n'
          ' (A1 = %.6g, A2 = %.6g, A12 = %.6g = %.6g + %.6g)\n' %
          (bses1, bses2, bses, ases1, ases2, ases12, ases121, ases122))
    from chimera import replyobj
    replyobj.info(msg)

    smsg = 'Buried areas: SAS = %.6g, SES = %.6g\n' % (bsas, bses)
    replyobj.status(smsg)
```