UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Biología

DISEÑO COMPUTACIONAL DE UN PÉPTIDO INTERFERENTE PARA EL COMPLEJO DE ELONGACIÓN, REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DE SARS-CoV-2

Tesis presentada como parte de los requisitos
para optar al Grado de Licenciado en Biología.

Camila Valeria Francisca Villegas Sánchez
Director de Tesis: Valeria Márquez Miranda

Santiago de Chile,
2023

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias de la Vida
Carrera de Biología

DISEÑO COMPUTACIONAL DE UN PÉPTIDO INTERFERENTE PARA EL COMPLEJO DE ELONGACIÓN, REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DE SARS-CoV-2

Camila Valeria Francisca Villegas Sánchez

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dra. Valeria Márquez Miranda en el Centro de Bioinformática y Biología Integrativa, Universidad Andrés Bello y aprobado por los miembros de la Comisión de Evaluación

_____
Dra. Valeria Márquez Miranda
Directora de Tesis

_____
Dra. Romina Sepúlveda
Comisión de Tesis

_____
Dra. Carolina Otero
Comisión de Tesis

Santiago de Chile, 2023

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....v
INDICE DE TABLAS.....vi
1. RESUMEN.....x
2. INTRODUCCIÓN.....1
2.1 Estructura de SARS-CoV-2.....1
2.2 Complejo de elongación, replicación y transcripción de SARS-CoV-2.....2
2.3 Estructura de Nsp12.....4
2.4 Interacción proteína-proteína (PPI).....5
2.5 Péptidos interferentes (PIs).....7
2.6 Aminoácidos, polaridad y estructura..... 8
2.7 Métodos computacionales para el desarrollo de PIs.....10
2.7.1 *Docking* molecular (Acoplamiento molecular) en diseño de PIs...10
2.7.2 Simulación molecular en el desarrollo de PIs.....12
2.7.3 *Molecular Mechanics/ generalized Born surface area* (MM/GBSA) en el diseño de PIs.....13
3. HIPÓTESIS.....15
4. OBJETIVOS.....15
4.1 Objetivo General.....15
4.2 Objetivos Específicos.....15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....16
5.1 Generar péptidos de diferentes tamaños a partir de la secuencia de Nsp8 que interactúa con Nsp12, utilizando la suite de Rosetta.....16
5.2 Obtener las puntuaciones de afinidad de los péptidos candidatos mediante *docking* molecular.....17
5.3 Determinar el comportamiento de los complejos Nsp12-PIs candidatos a lo largo del tiempo mediante el método de simulación molecular.....19

5.4 Obtener la energía de afinidad entre los péptidos candidatos y Nsp12 mediante cálculos de energía libre a partir de las trayectorias de simulación molecular....20
6. RESULTADOS....22
6.1 Péptido interferente inicial....22
6.2 *Docking* molecular....28
6.2.1 Pymol Autodock Vina Sofosbuvir....28
6.2.2 *FlexPepDock* péptidos candidatos....29
6.3 *Alanine Scanning Method* para determinar posibles optimizaciones de los fragmentos nativos de 13 y 15 aa....30
6.4 Mutaciones de fragmentos nativos de 13 y 15 aminoácidos 34
6.4.1 Mutaciones péptido *wild type* 13 aminoácidos (13 WT)....35
6.4.2 Mutaciones péptido *wild type* 15 aminoácidos (15 WT)....37
6.5 Simulación de dinámica molecular para describir el comportamiento péptido-*target* a través del tiempo....38
6.5.1 Simulación MD 13 aminoácidos *wild type*....38
6.5.2 Simulación MD 13 aminoácidos MUT1....43
6.5.3 Simulación MD 13 aminoácidos MUT2....46
6.5.4 Simulación MD 15 aminoácidos *wild type*....51
6.6 MM/GBSA para todos los PI, 13 WT, 13 MUT1, 13 MUT2 y 15 WT....53
7. DISCUSIÓN....55
8. CONCLUSIÓN....60
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....61
10. ANEXO 1....74
10.1 Mutaciones I938....74
10.2 Mutaciones en base a I938F....75
11. ANEXO 2....78
11.1 Cercanía e interacción Nsp12- 13 WT....78
11.2 Cercanía e interacción Nsp12- 13 MUT1....80
11.3 Cercanía e interacción Nsp12- 13 MUT2....81

11.4 Cercanía e interacción Nsp12- 15 WT.....82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de SARS-CoV-2.....2
Figura 2. Estructura del complejo de elongación, replicación y transcripción.....3
Figura 3. Estructura de Nsp12.....4
Figura 4. Estructura básica de un aminoácido.....9
Figura 5. Estructura especifica de cada aminoácido.....9
Figura 6. Diagrama de flujo de metodología.....21
Figura 7. Péptidos candidatos para el complejo de elongación, replicación y transcripción de SARS-CoV-2.....24
Figura 8. Interacción Nsp12-PIs candidatos de 12, 13, 14 y 15 aminoácidos.....27
Figura 9. Sitio de interacción entre el medicamento Sofosbuvir y Nsp12.....28
Figura 10. Proteína *target* y las mejores posiciones desde *FlexPepDock* de los candidatos de 12, 13, 14 y 15 aminoácidos.....29
Figura 11. Interacciones entre residuos más relevantes del péptido candidato de 13 WT y la proteína *target*.....31
Figura 12. Interacciones entre residuos más relevantes del péptido candidato de 15 WT y la proteína target.....33
Figura 13. Diagrama de mutaciones de 13 WT..... .35
Figura 14. Representación de las cajas de agua para simulación MD, con la caja del péptido candidato de 13 WT.....39
Figura 15. Interacciones entre Nsp12 y PI 13 WT los primeros 50 ns.....40
Figura 16. Interacciones entre Nsp12 y PI 13 WT los últimos 50 ns.....41
Figura 17. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y PI 13 WT en los primeros y últimos 50 ns.....42
Figura 18. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT2 los primeros 50 ns.....43
Figura 19. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT2 los últimos 50 ns.....45
Figura 20. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y 13 MUT1 en los primeros y últimos 50 ns.....45

Figura 21. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT2 los últimos 50 ns.....47
Figura 22. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT2 los últimos 50 ns.....48
Figura 23. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y 13 MUT2 en los primeros y últimos 50 ns.....49
Figura 24. Interacciones entre Nsp12 y 15 WT los primeros y últimos 50 ns.....52
Figura 25. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y 15 WT en los primeros y últimos 50 ns.....53
Figura 26. Interacciones entre 13 MUT1 (mutante de dos residuos de 13 WT) y la proteína *target*..... 76
Figura 27. Interacciones entre 13 MUT2 (mutante de 3 residuos 13 WT) y la proteína *target*.....77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Péptidos candidatos iniciales.....23
Tabla 2. Mejores puntuaciones del *FlexPepDock*.....30
Tabla 3. *Alanine Scanning Method* 13 WT.....32
Tabla 4. *Alanine Scanning Method* 15 WT.....34
Tabla 5. Puntuación de *FlexPepDock* de PI 13 aa mutado.....36
Tabla 6. Mutaciones de *hot spots* en PI candidato 15 WT.....37
Tabla 7. Péptidos mutados a trabajar.....37
Tabla 8. Porcentaje de interacción de residuos mutados en13 WT y 13 MUT1. 46
Tabla 9. Porcentaje de interacción de residuos mutados en13 WT, 13 MUT1 y 13 MUT2.....50
Tabla 10. Puntuaciones MM/GBSA de 13 WT, 13 MUT1, 13 MUT2 y 15 WT.... 54
Tabla 11. Secuencias de los PI candidatos.....56
Tabla 12. Mutaciones de I938.....74
Tabla 13. Mutaciones en base a I938F.....75
Tabla 14. Cercanía e interacción residuos Nsp12- 13 WT primeros y últimos 50 ns.....78

Tabla 15. Cercanías e interacciones con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 13 WT.....79
Tabla 16. Cercanías con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 13 MUT1.....80
Tabla 17. Interacciones con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 13 MUT2.....81
Tabla 18. Cercanías e interacciones con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 15 WT.....82

DEDICATORIA

Le quiero dedicar esta investigación a mi mamá, Lilian Sánchez, y a mi papá, Alejandro Villegas por siempre darme las posibilidades de seguir mis sueños, pero también a todos mis familiares que hoy en día no están, Miguel Gala y Magaly Hoffmann, que si estuvieran presentes estaría eternamente orgullosos de la mujer e investigadora en la cual me he convertido.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Valeria Márquez, mi profesora de tesis por su apoyo constante, al centro de bioinformática y biología integrativa (CBIB) por la utilización de sus servidores y dispositivos, a Furman Lab por la utilización de sus servidores de acoplamiento molecular y al servidor de Rosetta y la Universidad Andrés Bello por hacer posible este proyecto.

También quiero agradecer a mis compañeros de tesis, Emilio Salas y Favio Robledo por acompañarme, enseñarme y ayudarme durante este periodo de tesis.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por estar constantemente conmigo apoyándome y leyendo todos los escritos que hice, a mi mejor amiga, Catalina Gómez por llevarme al mundo científico y acompañarme mientras me desarrollo como científica y a mis amigos más cercanos, Felipe Sobarzo y Monserrat Ibarra, que a pesar de que no entienden nada de lo que trata esta tesis han estado dispuestos a leerla y ayudarme.

1. RESUMEN

El año 2020 inició una pandemia a causa del virus SARS-CoV-2, el cual se replica en las células huésped gracias a su complejo de elongación, replicación y transcripción (Nsp7/Nsp8/Nsp12). Actualmente, existen muchos fármacos que han sido desarrollados *in sílico* (como naringenina) y otros que han llegado a las pruebas *in vitro* (sofosbuvir (SOF)) dando resultados positivos a la hora de inhibir RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp o Nsp12). Si bien ha habido avances en el tema, los fármacos en estudio podrían resultar no ser tan eficientes cuando existen mutaciones del virus, esto es debido a que tanto medicamentos como vacunas se enfocan principalmente en la proteína *Spike* (propensa a mutaciones) o presentar alta toxicidad.

Con el fin de disminuir la actividad viral y el problema de las mutaciones, se propone, mediante el uso de herramientas computacionales como *docking* molecular, simulación MD y el método MM/GBSA, diseñar péptidos interferentes que se unan a sectores altamente conservados de Nsp12, los cuales serán obtenidos a partir de sitios de interacción con Nsp8 y se utilizará dicho fragmento nativo como referente para realizar mutaciones y optimizaciones con el fin de obtener un PI que tenga mejor afinidad por la proteína no estructural Nsp12.

A partir del trabajo realizado se obtuvo dos fragmentos nativos de Nsp8 con 13 y 15 aminoácidos cada uno, en base a estos dos péptidos se realizaron mutaciones, las cuales generaron dos mutantes 13 MUT1 y 13 MUT2 que fueron prometedoras, especialmente 13 MUT2, la cual mediante las distintas herramientas computacionales resultó tener un ΔG total más negativo, es decir, muestra mayor afinidad que el fragmento peptídico nativo obtenido a partir de Nsp8.

Esta tesis abre la posibilidad de continuar con esta investigación, mutando fragmentos de Nsp8 con el fin de lograr el mejor péptido interferente posible para el complejo de elongación, replicación y transcripción de SARS-CoV-2 y así generar una alternativa terapéutica efectiva para evitar una nueva pandemia a partir de algún virus de la familia *Coronaviridae.*

ABSTRACT

In 2020, began a pandemic caused by SARS-CoV-2 virus, which replicates in host cells thanks to its elongation, replication and transcription complex (Nsp7/Nsp8/Nsp12). Currently, there are many drugs that have been developed *in silico* (such as naringenin), and others that have reach *in vitro* trials (such as sofosbuvir (SOF)), which shows positive results in inhibiting the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp or Nsp12). Although there have been advancements in the field, drugs under study might not be as effective when facing virus mutations. This is because both medications and vaccines mainly target the Spike protein (prone to mutations) or show high toxicity.

To reduce viral activity and address the issue of mutations, it is proposed to use computational tools such as molecular docking, molecular dynamics simulation, and the MM/GBSA method, to design interfering peptides that bind to highly conserved regions of Nsp12. These regions will be obtained from interaction between Nsp12 and Nsp8, using native fragments of Nsp8 as reference for mutations and optimizations to obtain an interfering peptide with better affinity for the non-structural protein Nsp12.

From this work, two native fragments of Nsp8 with 13 and 15 amino acids were obtained. Based on these two peptides, mutations were made, generating two mutants, 13 MUT1 and 13 MUT2, which showed promise. Especially 13 MUT2, which, according to various computational tools, exhibited a more negative total ΔG, indicating a higher affinity than the native peptide fragment obtained from Nsp8.

This thesis opens the possibility of continuing this research, mutating Nsp8 fragments to achieve the best possible interfering peptide for the elongation, replication and transcription complex of SARS-CoV-2, thereby generating an effective therapeutic alternative to prevent a new pandemic originating from any viruses of the *Coronaviridae* family.

2. INTRODUCCIÓN

El año 2020 se produjo una pandemia a nivel mundial debido al virus SARS-CoV-2 el cual provoca la enfermedad COVID-19. Según la Universidad John Hopkins (s.d) y Orús (2023), el virus ha causado la defunción de aproximadamente 6,9 millones de personas desde el inicio de la crisis sanitaria hasta el 12 de mayo de 2023. Se han producido diversas vacunas para prevenir la enfermedad, las cuales fueron generadas por distintos métodos, como por mRNA, vectores virales y virus inactivo, dentro de las cuales destacaron: Moderna, Pfizer-BioNTech, AstraZeneca y Sinovac (Creech *et al*., 2021), es decir, tenemos formas de generar inmunidad frente al contagio y de minimizar sus consecuencias en el sistema por medio de medicamentos, pero no tenemos como evitar que prolifere dentro de nuestro sistema (Abdool-Karim y Devnarain, 2022). A partir de esto, se han generado estudios con medicamentos ya conocidos para evitar la formación del complejo de replicación y transcripción de SARS-CoV-2 (Mutlu *et al*., 2022), pero no han probado ser realmente una solución al problema, por otro lado, también se han probado antivirales basados en moléculas pequeñas, los cuales si bien han sido altamente estudiados durante la pandemia resultaron tener resultados decepcionantes, siendo el desarrollo de anticuerpos monoclonales (MAbs), que tienen como blanco la proteína espícula, la con mejores resultados (Tao *et al*., 2021), por ende se buscará generar un péptido interferente que evite la formación de dicho complejo y así evitar su función dentro de nuestro sistema.

2.1 Estructura de SARS-CoV-2

La estructura externa del virión tiene una morfología esférica con diámetro entre 60-140 nm, esta estructura está compuesta de una nucleocápside, la cual contienen el genoma del virus, y de una envoltura externa, la cual lo protege y ayuda a aumentar la capacidad infecciosa, en dicha envoltura hay proteínas

estructurales y accesorias. Dentro de las proteínas estructurales tenemos la glucoproteína S (*Spike*), proteína E, proteína M, proteína N y la proteína hemaglutinina-esterasa (HE) (Díaz-Armas *et al*., 2021). También hay proteínas no estructurales (NSPs), las cuales actúan en el complejo de replicación y transcripción de SARS-CoV-2, dentro de las cuales tenemos NSP12-NSP8, NSP13, entre otras. Por otro lado, tenemos que el genoma está formado por una cadena única de RNA monocatenario de polaridad positiva con 30.000 pb aproximadamente (Pastrian-Soto, 2020).

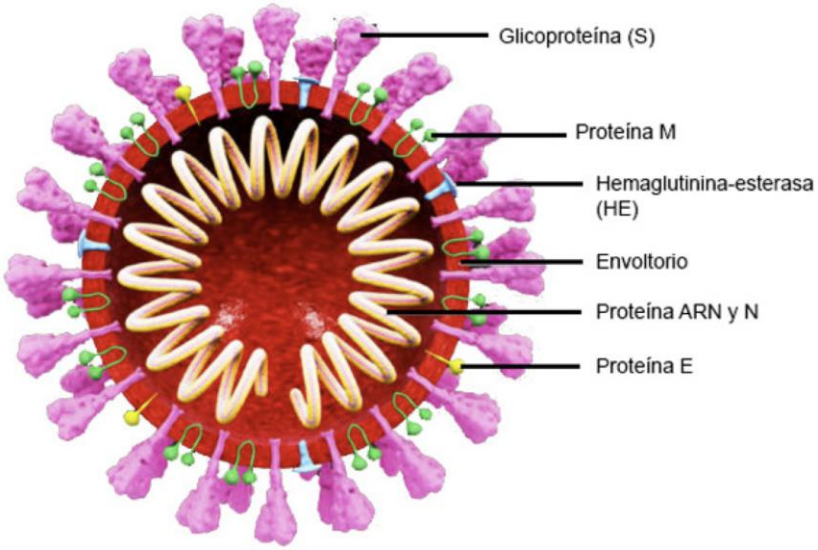


Figura 1. Estructura de SARS-CoV-2. Se puede observar una representación gráfica de la estructura del virus SARS-CoV-2, donde se representa la disposición de proteínas estructurales (S, M, HE, N y E) la envoltura y el material genético (airtècnics, s.f.).

2.2 Complejo de elongación, replicación y transcripción de SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 se replica a base de proteínas no estructurales, genes estructurales y accesorios que interactúan con la célula hospedera para iniciar el proceso de replicación (Arandia-Gúzman y Antezana-LLaveta, 2020; Newman *et al*., 2021). Dicho proceso genera el complejo de elongación, replicación y transcripción (Nsp7/Nsp8/Nsp12), el cual considera diferentes proteínas no estructurales que lo componen, dentro de éstas tenemos: Nsp12, también

llamada RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp); Nsp8; Nsp7; Nsp13, que es helicasa. Ésta última (Nsp13) se une al complejo de replicación debido a su función helicasa, la cual la hace esencial para la replicación, es decir, facilita la elongación progresiva (Chen *et al*., 2022; Mirza y Froeyen, 2020). Dentro de este complejo tenemos variadas interacciones proteína-proteína (PPIs), las cuales son fundamentales para el entendimiento de enfermedades y la generación de medicamentos.

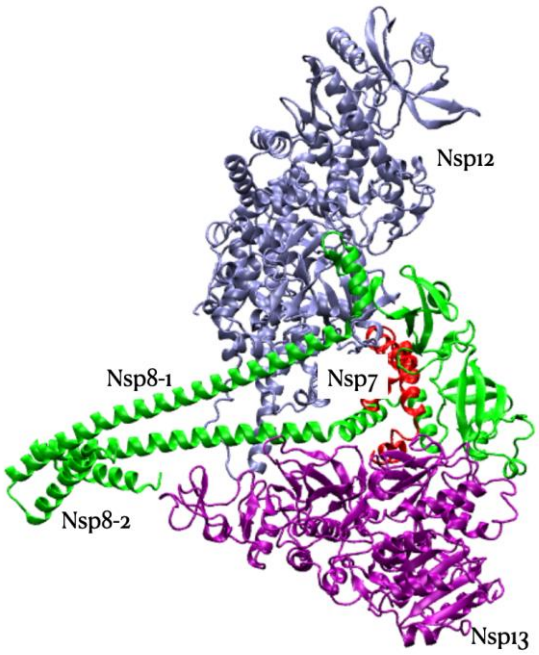


Figura 2. Estructura del complejo de elongación replicación y transcripción. En azul podemos ver la proteína no estructural Nsp12, en verde Nsp8, en rojo Nsp7 y en rosado Nsp13 (creación propia en VMD).

Actualmente, se sigue investigando en la existencia de un fármaco que inhiba la replicación del virus SARS-CoV-2. Si bien, hoy en día existen múltiples estudios *in sílico* con potenciales inhibidores de Nsp12, como naringenina (Aleebrahim-Dehkordi *et al*., 2023), los estudios *in vitro* o *in vivo* de diversos medicamentos que resultan ser inhibidores del complejo son escasos. A pesar de esto, existen dos fármacos que fueron probados *in vitro* y resultaron ser inhibidores de la reacción polimerasa efectuada por Nsp12, estos medicamentos son, daclatasvir y sofosbuvir, fármacos anti-HCV (antiviral contra hepatitis C), que inhiben NS5A

(proteína multifuncional en la replicación de HCV) y NS5B (RNA polimerasa), respectivamente, si bien no son ortólogos de Nsp12, su actividad enzimática es similar (Sacramento *et al*., 2021).

2.3 Estructura de Nsp12

RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) o Nsp12, es una proteína con dominios múltiples, entre los cuales está el dominio C-terminal/dominio polimerasa (del residuo S367 a F920) el cual consta de 3 subdominios: "*finger subdomain*" (aminoácidos L366-A581 y K621-G679); "*palm subdomain*" (aminoácidos T582-P620 y T680-Q815); "*thumb subdomain*" (aminoácidos H816-F920). Por otro lado, hay una extensión del dominio N-terminal que es específico para nidovirus, NiRAN (nidovirus RdRp-associated nucleo-tidyltransferase) que va desde el residuo D60 al R249. A su vez, en el dominio N-terminal hay un motivo horquilla-β que considera los residuos D29-K50 (localizado en una ranura entre el dominio NiRAN y el subdominio "*palm*"). Entre ambos dominios (C- y N-terminal) existe un dominio interface el cual contiene los residuos A250 al R365 (Gao *et al*., 2020).

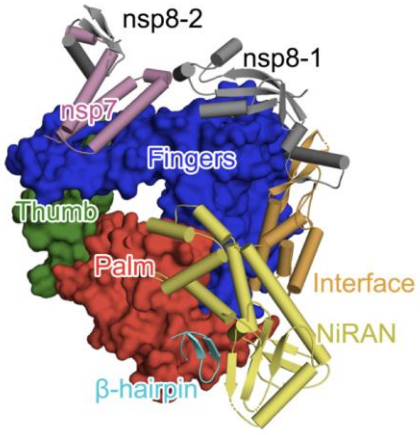


Figura 3. Estructura de Nsp12. En la representación se observa el dominio C-terminal que está compuesto por 3 subdominios (*Fingers, palm, thumb*), el dominio N-terminal y la horquilla-β (componentes de Nsp12), también se observan ambas cadenas de Nsp8 y la cadena de Nsp7 (Gao *et al*., 2023).

En el sitio activo del dominio polimerasa hay 7 motivos conservados (A-G) que participan en el reconocimiento del molde, la unión del nucleótido y la catálisis (Mirza y Froeyen, 2020; Poch *et al*., 1989).

De acuerdo con Kapoor *et al*. (2023) existen bolsillos de unión, los cuales consideran 20 residuos clave: GLN541, ASN543, LYS545, ARG555, VAL557, ALA558, GLY559, VAL560, ASP618, ASP623, THR680, SER682, GLY683, ASP684, ALA685, THR687, TYR689, ASN691, ASP760, ASP761, SER814, que son altamente conservados y son sitios de unión normales de RdRp.

2.4 Interacción proteína-proteína (PPI)

Las interacciones proteína-proteína regulan variados procesos y actividades biológicas, como interacciones entre células, la función sistémica de la célula y los canales de señalización en el cuerpo (Srinivasa-Rao *et al*., 2014). La suma de estas interacciones moleculares de una sola célula es conocido como interactoma, se ha estimado que éste en el ser humano considera entre 130.000 a 600.000 PPIs (Vidal *et al*., 2011; Bruzzoni-Giovanelli *et al*., 2018). Hay diferentes tipos de PPIs, dentro de las cuales podemos mencionar uniones entre cadenas idénticas (homo-oligómeros) o cadenas diferentes (hetero-oligómeros), las interacciones son generadas a partir de la concentración local de componentes proteicos o de uniones de afinidad (Nooren y Thornton, 2003).

El estudio de los PPI es de interés principalmente debido a que, si existe una anormalidad dentro del sistema de interacción de las proteínas, se generan enfermedades, como cáncer y enfermedades neurodegenerativas, por ende, las interacciones proteína-proteína son un blanco perfecto para la creación de medicamentos (Lu *et al.,* 2020). A pesar de que los PPIs son una diana (*target*), el desarrollo de interferentes, como moléculas pequeñas, es altamente complejo debido a cuatro razones principales:

1) El área de interacción es un dominio específico donde dos proteínas están en contacto, y esta es mayor que el área de contacto del receptor-ligando, y la interfaz es altamente hidrofóbica (Smith y Gestwicki, 2012; Cheng *et al.,* 2007).

2) La interfaz de los PPIs tiende a ser lisa, es decir, no cuenta con surcos ni bolsillos donde se puedan unir las moléculas pequeñas (Díaz-Eufracio *et al*., 2018).

3) Los residuos aminoacídicos en los PPIs son continuos o discontinuos con respecto a la estructura de la proteína, dando alta afinidad de unión entre las proteínas, dificultando la unión de una molécula pequeña.

4) Las interacciones proteína-proteína no tienen ligandos endógenos de referencia para moléculas pequeñas, en comparación con las dianas tradicionales (Ivanov *et al*., 2013).

Ya sabiendo que las interacciones proteína-proteína son un blanco para combatir diversas enfermedades, se requiere conocer los puntos de interacción más importantes dentro del PPIs, para esto es necesario identificar los denominados *hot spots*. Un *hot spot* es una zona con alta importancia energética de unión, la cual se puede predecir (Blazer y Neubig, 2009), y normalmente está compuesta por tirosina, arginina y triptófano (Moreira *et al*., 2007). Para la predicción de un *hot spot*, existen diversos métodos los cuales han probado ser efectivos en diferentes maneras y contextos (Hashemi *et al.*, 2021), cabe mencionar que dentro de los más empleados se encuentra el *Alanine Scanning Method*, el cual consiste en mutar un residuo aminoacídico por una alanina, lo que ocurre es que al ser Ala de menor tamaño que otros aminoácidos quedará un espacio el cual generará desequilibrio energético, si resulta ser que la energía del complejo desciende más de 2.0 kcal/mol, podemos considerar que el aminoácido reemplazado era un *hot spot*, por el contrario, si el cambio energético es menor, podemos decir que el residuo no era un *hot spot* (Bradshaw *et al*., 2011).

En resumen, se genera la necesidad de encontrar un compuesto que sea capaz de interferir la interacción proteína-proteína, siendo estos los péptidos interferentes o PIs (Bruzzoni-Giovanelli *et al*., 2018).

2.5 Péptidos interferentes (PIs)

Los péptidos interferentes son secuencias de aminoácidos que se pueden diseñar a partir de una secuencia o de una estructura (Lozano Jiménez *et al*., 2020), estos pueden ser de orígen sintético o natural, y unirse a superficies de diferentes tamaños (interacciones pequeñas o grandes) y porosidades (bolsillos, surcos y lisos) de la proteína diana, dado que los péptidos diseñados pueden ser de diferentes largos. Por otro lado, también tienen la capacidad de ingresar a la célula alcanzando objetivos intracelulares de la misma manera que lo hacen las moléculas pequeñas, a su vez los PIs están asociados con menor peso molecular, alta flexibilidad y toxicidad mínima (Hashemi *et al*., 2021; Sorolla *et al*., 2020).

Los PIs diseñados a partir de una secuencia, consideran las propiedades fisicoquímicas de la proteína diana (*target*) y son basados en información previa de una secuencia o estructura similar en otros organismos, se efectúa mediante alineamientos múltiples hasta encontrar la estructura con mayor similitud o porcentaje de identidad (Armiento *et al*., 2019; Jordan *et al*., 2012).

Por otro lado, los péptidos interferentes diseñados a partir de la estructura se realizan conociendo la estructura cristalizada de la proteína diana y su sitio de interacción con otra proteína (la cual llamaremos P1). A partir de la información anterior, lo que se hace es la extracción de una parte de la secuencia aminoacídica de P1, específicamente los sectores donde ésta interactúa con la proteína blanco, generando con esto un primer péptido de interferencia candidato, el cual puede ser modificado utilizando diferentes técnicas de modelado molecular (Khan *et al*., 2019; Lengyel *et al*., 2014).

El fin de crear estos péptidos es poder evitar que se lleve a cabo una función específica de la interacción de las proteínas, puesto que el péptido estará usando el sitio de unión en la proteína diana (Ellert-Miklaszewska *et al*., 2017; Shi *et al*., 2016).

Lo que se busca con los PIs es que el péptido tenga mayor afinidad por el blanco que la proteína que se une normalmente a esta, para esto se modifican aminoácidos específicos y se ve si estos generan una mayor o menor energía de afinidad (Hashemi *et al*., 2021). Para la categorización de estos cambios en los péptidos y la posición en la cual se encuentra el péptido, se utiliza un método molecular llamado acoplamiento molecular o *molecular docking* (Kitchen *et al*., 2004).

2.6 Aminoácidos, polaridad y estructura

Como se mencionó anteriormente los péptidos y proteínas están conformados por aminoácidos. Existen 22 aminoácidos, de los cuales hay 20 que son necesarios para la síntesis de proteínas en el ser humano y de éstos 9 son esenciales (F, V, Y, T, I, M, H, L, Y), es decir, exógenos al ser humano, 1 que no está presente en la síntesis proteica humana (pirrolisna) y selenocisteína que es el cambio del átomo S^- por Se (López y Mohiuddin, 2020). Los aminoácidos poseen un extremo amino ($-NH_2$) y otro extremo carboxilo (-COOH). Según las propiedades de sus cadenas laterales (R) se tiene diferentes grupos como: básicos (Lys, Arg, His), ácidos (Asp, Glu), polares (Ser, Thr, Asn, Gln), apolares hidrofóbicos (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val) y casos especiales que se componen de aminoácidos apolares hidrofílicos (Cys, Sec, Gly, Pro), también está el aminoácido 22 que es la pirrolisina, la cual no se usa en la síntesis de proteínas humanas. Dentro de los residuos presentados hay 3 que poseen anillos aromáticos (Phe, Thr y Tyr), los residuos aromáticos entregan mejor estabilidad a las PPIs, dado que crean enlaces pi-pi (entre los mismos residuos con los

anillos), pi-catión (entre un anillo aromático y un residuo básico), entre otros (Damodaran *et* al., 2008; Bastardas, 2009; Vishwanath *et al.,* 2017).

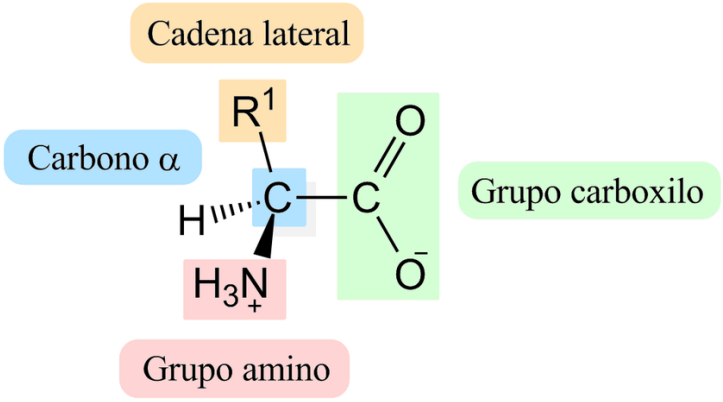


Figura 4. Estructura básica de un aminoácido. El aminoácido posee un grupo amino (NH_2), un hidrógeno, un grupo carboxilo (COOH) y un grupo radical (el cual varía dependiendo del aminoácido) unidos a un carbono alfa central (Yruela y Sebastián, 2014).

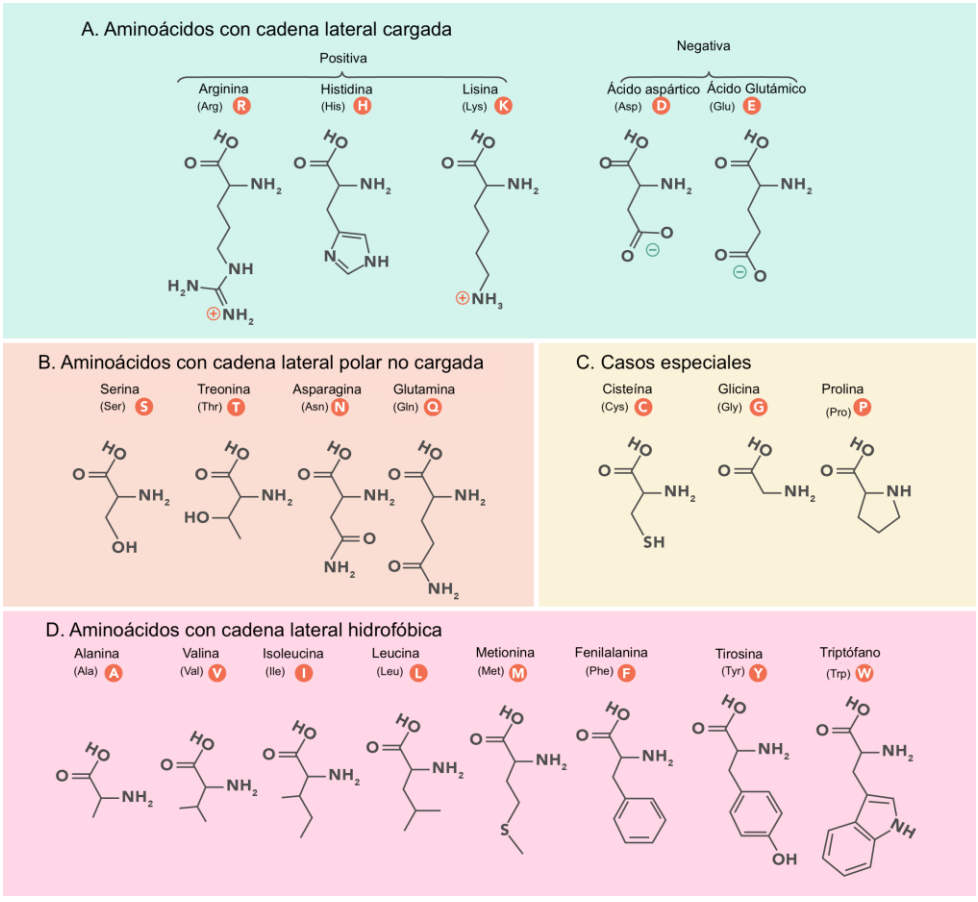


Figura 5. Estructura específica de cada aminoácido. Se puede ver el grupo radical de cada aminoácido unido al carbono alfa central, hay una separación de los grupos, en azul vemos los cargados (básico y ácido), en morado los polares, en amarillo los apolares hidrofílicos y en verde los apolares hidrofóbicos (Prieto, s.f. (editado)).

2.7 Métodos computacionales para el desarrollo de PIs

Para la creación de medicamentos existe un paso previo a la experimentación *in vitro*, esto es la parte de investigación *in sílico*, en la cual por medio de métodos computacionales como *docking* molecular, simulación de dinámica molecular, *virtual screening* y cálculos de energía podemos probar fármacos de manera virtual.

2.7.1 *Docking* molecular (Acoplamiento molecular) en diseño de PIs

En estudios previos se ha utilizado el acoplamiento molecular para poder reducir una lista de datos, por otro lado, se utilizó también para evaluar los parámetros farmacológicos y de toxicidad de compuestos mejor evaluados de la lista para la inhibición de proteínas no estructurales de SARS-CoV-2 (Patel *et al*., 2023).

Es un procedimiento de simulación computacional en el cual se puede predecir la conformación de un complejo entre receptor y ligando (Dias y de Acevedo, 2008), es decir, ayuda a explorar el comportamiento de moléculas pequeñas o PIs en el lugar de unión a la proteína blanco (Fan *et al*., 2019). Lo que realiza el acoplamiento es la generación de diferentes candidatos, los cuales serán clasificados y se les otorgará un puntaje (*score*) basado en la estabilidad de interacción en el complejo (Agarwal y Mehrotra, 2016).

Para la creación de nuevos medicamentos, como lo son los péptidos interferentes, el uso del acoplamiento molecular es de suma importancia a la hora del diseño, esto es debido a que la categorización de, en este caso péptidos, es llevada a cabo mediante el uso de esta metodología (Guedes *et al.*, 2014; Stazione *et al*., 2021; Sulimov *et al*., 2019), como se mencionó previamente se genera un puntaje, el cual está influenciado por interacciones de van der Waals, interacciones de Coulomb y la formación de puentes de hidrógeno, finalmente el

puntaje representará el potencial de unión que tiene la droga con el complejo (Pagadala *et al.*, 2017).

El acoplamiento molecular (*docking*) es muy útil cuando se estudian las interacciones moleculares a niveles atómicos. Existen diferentes tipos de *docking* molecular, cuál se utilizará dependerá completamente del problema que tengamos presente. Se puede tener la estructura de la proteína cristalizada por NMR o cristalografía de rayos X, también se puede saber en qué zona interactúa la droga con la proteína o simplemente tener solo estructuras similares a la que estamos investigando y no el complejo en sí (Porter *et al*., 2019). Existen tres acercamientos para la realización del *docking* y dependen de lo que tenemos para trabajar, estos son: *docking* global, *docking* local y *docking* basado en *template*. Un *template* es por una plantilla en la cual basarse, en los casos de proteínas sería la estructura proteica cristalizada de una proteína homóloga a la de la proteína blanco/diana/*target* a utilizar (Hashemi *et al*., 2021).

1) *Docking* global: En este tipo de docking no se conoce el sector específico ni la orientación en la cual va a interactuar la molécula (moléculas pequeñas, péptidos, otra proteína), para su realización hay 3 etapas, inicialmente se debe tener la proteína blanco y molécula que va a interactuar con ésta, luego se realiza un *docking* de cuerpos rígidos y finalmente se hace el *Scoring*/puntuación (Porter *et al.,* 2017).

2) *Docking* local: En esta aproximación, se conoce un sector en el cual se puede unir una proteína o molécula pequeña y se desea comprobar que el péptido se unirá en dicha área también, para esto el usuario define una grilla o sección de unión, mientras mejor sea la demarcación, mejores serán los resultados (Ciemny *et al.*, 2018).

3) *Docking* basado en *template*: consiste en el uso de conocimiento previo de estructuras similares a la que se va a estudiar, es decir, se utiliza una estructura *template* ya cristalizada, la cual es similar, pero no son idéntica, a la estructura de nuestra proteína blanco. A partir de ésta se verá cómo y dónde interactúan los PIs (Kundrotas *et al*., 2012).

Con la realización del acoplamiento se puede generar optimización de los péptidos obtenidos con mejores puntuaciones de unión, es decir, mejorar la eficacia mediante el empleo de herramientas de diseño de péptidos, se usan métodos determinísticos y estocásticos. Por otro lado, también se puede realizar la simulación molecular (Hashemi *et al*., 2021).

2.7.2 Simulación molecular en el desarrollo de PIs

La simulación de dinámica molecular ha sido utilizada para comprobar que la dinámica y flexibilidad de algunas proteínas no estructurales disminuye en presencia de medicamentos específicos, como Nsp3 en presencia de naringenina (Aleebrahim-Dehkordi *et al*., 2023), a su vez ésta podría ser utilizada para determinar qué ocurre con la dinámica de la proteína no estructural Nsp12 en presencia de fármacos ya probados experimentalmente y de péptidos interferentes.

La simulación de dinámica molecular (MD), de acuerdo con Frenkel y Smith (2001) es una técnica para computar el equilibrio y el transporte de propiedades en un sistema de cuerpos múltiples, es decir, ayuda a predecir cómo se moverá cada átomo en una proteína o en un complejo durante el tiempo, en un modelo con interacciones interatómicas presentes (Hollingsworth y Dror, 2018).

MD finalmente es un paso a paso de la solución de fórmulas de movimiento. Por esto antes de iniciarla se deben ajustar sistemas de campos de fuerza, los cuales incluyen, por un lado, a las interacciones enlazantes, como la extensión de los enlaces, dado por la Ley de Hooke, el ángulo de flexión, diedros (ángulo de torsión) y los impropios (ángulo fuera del plano) y, por otro lado, las interacciones no enlazantes, como las fuerzas de interacción de van der Waals (potencial Lennard-Jones) y las fuerzas electrostáticas (potencial de Coulomb) (Allen, 2004; Sprenger *et al*., 2015).

Para realizar la simulación de dinámica molecular se requiere el uso de las ecuaciones de movimiento de Newton o mejor dicho las leyes de Newton, las cuales son: Primera Ley de Newton (ley de inercia), Segunda Ley de Newton y Tercera Ley de Newton (ley de acción y reacción) (Lara-Barragán, 2011).

Mediante el uso de dichas fórmulas se van creando configuraciones del sistema de manera sucesiva, finalmente obteniendo una trayectoria, la cual brinda cómo variaron las posiciones de los átomos en el tiempo y sus velocidades de variación dentro del complejo (Leach, 1996).

En resumen, el proceso de MD consta de múltiples pasos (Li, 2005; Patodia *et al.*, 2014) se debe iniciar con un archivo PDB, a continuación, se debe determinar el campo de fuerza y ecuaciones de movimiento, luego se prepararán las condiciones iniciales y las condiciones de equilibrio, se realiza un equilibrado mediante diferentes ensambles termodinámicos, isotérmico-isobárico en este caso, se minimizará la estructura y se asignarán las condiciones periódicas de borde. A continuación, se define el tiempo de ejecución (L pasos de ejecución -*runs*-) y se corre la dinámica molecular.

2.7.3 *Molecular Mechanics/ generalized Born surface area* (MM/GBSA) en el diseño de PIs

MM/GBSA es un método utilizado para calcular la energía libre entre el ligando y la proteína, en este caso entre la proteína blanco y el péptido interferente, a partir de las trayectorias de simulación molecular obtenidas previamente. MM/GBSA es un tipo de método *end point* (punto final), el cual consta del cálculo de la energía libre de unión péptido-proteína, la cual se realiza mediante una comparación entre el estado unido y no unido (Godschalk *et al*., 2013). La energía libre obtenida a partir de una simulación de dinámica molecular entrega que tan estable es la unión del complejo, es decir, la afinidad que tiene una molécula por otra, o en este caso que tan afín es el péptido interferente por la proteína (Wang *et al.*, 2019).

Descrito por Genheden y Ryde (2010) la energía libre de unión del ligando a la proteína receptora para generar el complejo puede ser descompuesta en las contribuciones de las diferentes interacciones, dentro de éstas se tienen los cambios en la energía mecánica molecular en fase gaseosa (ΔE_{MM}), energía de solvatación (ΔG_{sol}) y entropía conformacional ($-T\Delta S$). Cada una de las interacciones anteriores está compuesta por otras interacciones, ΔE_{MM} está compuesto de cambios energéticos internos ΔE_{int} (enlaces, ángulos, diedros) y de energías electrostáticas (ΔE_{ele}) e interacciones de Van der Waals (ΔE_{vdW}); ΔG_{sol} es la suma de la energía de solvatación electrostática (ΔG_{GB}), que es la parte polar, y la parte no polar resulta de la formación de la cavidad del soluto en el solvente y las interacciones de van der Waals entre el soluto y solvente alrededor de la cavidad (ΔG_{SA}) y es estimada utilizando SASA (*solvent-accesible surface area*).

Las fórmulas bajo las cuales se determina el MM/GBSA

- $\Delta E_{MM} = \Delta E_{int} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdW}$
- $\Delta G_{sol} = \Delta G_{GB} + \Delta G_{SA}$
- $\Delta G_{SA} = \gamma \cdot SASA + \beta$
- Donde γ es la constante de tensión de superficie y β es una constante de correlación ($\gamma = 5{,}42*10^{-3}$ kcal·mol^{-1}Å^{-2} $\beta = 0{,}92$ kcal/mol).

Considerando que conocemos la interacción entre Nsp12 y Nsp8 gracias a que está disponible su estructura en el *Protein Data Bank*, surge la siguiente pregunta. ¿Es posible generar un péptido interferente de Nsp12 a partir de un fragmento de Nsp8? ¿Es posible modificar algunos aminoácidos clave de ese fragmento nativo de Nsp8 para lograr una mejor interacción con Nsp12?

3. HIPÓTESIS

La incorporación de residuos hidrofóbicos aromáticos al fragmento peptídico nativo obtenido desde Nsp8 permite la obtención de un péptido con mayor afinidad por Nsp12, como potencial interferente de la interacción Nsp12-Nsp8.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Diseñar péptidos interferentes de la interacción Nsp12-Nsp8, que sean más afines a Nsp12 de lo que es el fragmento nativo obtenido a partir de Nsp8.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Generar péptidos de diferentes tamaños a partir de la secuencia de Nsp8 que interactúa con Nsp12, utilizando la suite de Rosetta.

4.2.2 Obtener las puntuaciones de afinidad de los péptidos candidatos mediante *docking* molecular.

4.2.3 Determinar el comportamiento de los complejos Nsp12-PIs candidatos a lo largo del tiempo mediante el método de simulación molecular.

4.2.4 Obtener la energía de afinidad entre los péptidos candidatos y Nsp12 mediante cálculos de energía libre a partir de las trayectorias de simulación molecular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Generar péptidos de diferentes tamaños a partir de la secuencia de Nsp8 que interactúa con Nsp12, utilizando la suite de Rosetta.

Para la realización del péptido interferente inicial se utilizó la estructura cristalizada del complejo de elongación, replicación y transcripción de SARS-CoV-2, la cual se extrajo de "*Protein Data Bank*" bajo el código 7re2, a continuación, mediante el programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) se observó la estructura y se diferenciaron las cadenas a utilizar (cadena A, Nsp12, y cadena B, Nsp8), se observaron los sitios de interacción entre ambas y se guardó un archivo PDB con solamente las cadenas A y B. Dicho archivo fue subido al servidor en línea de Rosetta en su protocolo de *Peptiderive*, en breves palabras lo que ocurre es que se minimiza el complejo utilizando la función de energía de Rosetta, luego se establece el largo del péptido y el programa mediante aplicación de fórmulas de energía de unión, determina que péptido es el mejor energéticamente para representar la interacción (London *et al*., 2018). De acuerdo con Sedan *et al.* (2016) el largo del péptido es determinado por el usuario, por ende, se dictaminó que el programa entregase 6 péptidos de la interacción entre Nsp12 y Nsp8, los cuales fueron de diferentes largos, siendo estos 10, 11, 12, 13, 14 y 15 aminoácidos, véase tabla 1 (London *et al.,* 2010; Lyskov *et al*., 2013; Sedan *et al*., 2016).

A continuación, se registraron los resultados entregados por el servidor de *Peptiderive* y se procedió a realizar una visualización de los péptidos y una de las interacciones a 4 Å entre los mejores péptidos candidatos y la proteína *target* (Nsp12), a continuación, se realizó el *docking* molecular para encontrar la mejor pose del péptido en interacción con la proteína *target*, para eventualmente optimizarlo (mutar los residuos).

5.2 Obtener las puntuaciones de afinidad de los péptidos candidatos mediante *docking* molecular.

A partir de los péptidos candidatos generados anteriormente y con el medicamento Sofosbuvir, se realizó un *docking* molecular, dado que se conoce el sitio de interacción entre ambas cadenas del complejo (A, Nsp12 y B, Nsp8) se hizo un acoplamiento de tipo local (bolsillo entregado en la sección 2.3).

Con el fin de determinar si el sitio de unión del medicamento Sofosbuvir es el mismo que el del PI candidato, mediante el uso del programa PyMOL, sistema de visualización molecular, y un plugin dentro de éste de AutoDock vina, herramienta automatizada para la realización del acoplamiento, se llevó a cabo el *docking* molecular para el fármaco (sofosbuvir), para esto se subió el archivo de la molécula (Nsp12-Nsp8) y la estructura cristalizada del fármaco, a continuación, se determinó una grilla (una caja) con las coordenadas de interacción de ambas proteínas no estructurales (x: 168,30 y: 163,16 z: 193,73) y de tamaño 80x80x60 $Å^3$. (Eberhardt *et al*., 2021; Huey *et al*., 2012; Trott y Olson, 2010).

Por otro lado, el *docking* para los péptidos candidatos se realizó mediante el programa *FlexPepDock*, acoplamiento flexible para péptidos que modela la interacción péptido-proteína, de Rosetta (Raveh *et al.,* 2011), para esto se utilizó el servidor en línea de *FlexPepDock* de la Universidad Hebrea de Jerusalem, en el cual se subió un archivo que contenía la proteína *target* (Nsp12) y el péptido (12, 13, 14 y 15 aminoácidos), pasadas 4 horas el servidor entregó los resultados de cada uno de los *docking* realizados (London *et al*., 2011; Raveh *et al*., 2010).

Pasado el tiempo se obtuvieron tablas con la puntuación obtenida de cada PI y se procedió a usar el péptido mejor puntuado como primer candidato para ser optimizado.

Para la optimización del péptido mejor puntuado se realizaron mutaciones *in sílico,* es decir, se reemplazó los aminoácidos con mejores puntuaciones (*hot spot*, tablas presentes en resultados, tabla 3 y 4) por otros residuos de la misma categoría (hidrofóbicos por hidrofóbicos) o por aminoácidos contrarios (cargados negativos por positivos). Para la optimización de los péptidos interferentes se utilizó el software *Flexddg* de Rosetta, es un protocolo que modela y predice cambios en la energía de unión cuando se mutan los residuos (Barlow *et al*., 2018), para esto se comenzó con la mutación de todos los residuos de la cadena de 13 aminoácidos por alanina, utilizando el método de *Alanine Scanning Method*, el cual entregó si las mutaciones de cada residuo eran consideradas *hot spot* o no (Moreira *et al*., 2007), el *Alanine Scanning Method* de la cadena de 13 residuos se demoró aproximadamente 7 días, una vez pasado el tiempo se determinó los cambios que presentaban mayor energía libre de unión y se procedió a mutar cada uno de ellos por otros residuos (Bradshaw *et al*., 2011).

Se inició realizando una visualización de VMD de los residuos cercanos (4 Å) de cada aminoácido obtenido como *hot spot* en el procedimiento anterior, a continuación, se realizó la mutación de I938L, I938M, I938F, I938W, I938Y e I938V. Se obtuvo que uno de los cambios era favorable a partir de los *scores* obtenidos, ΔG WT – ΔG MUT, y se efectuaron las siguientes optimizaciones a partir de dicha mutación. Se realizaron mutaciones D931E, D931R y D931K, mediante el uso de un código de Python, por otro lado, se mutó I939 por todos los residuos hidrofóbicos (Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val) y finalmente también se mutó L936 por otros aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val).

Con un péptido con dos mutaciones se procedió a realizar nuevamente el *docking* molecular *FlexPepDock* en el servidor y se comparó (mutaciones utilizadas en resultados) los resultados obtenidos con el péptido candidato *wild type* y el péptido candidato mutado.

5.3 Determinar el comportamiento de los complejos Nsp12-PIs candidatos a lo largo del tiempo mediante el método de simulación molecular.

Basándose en los péptidos interferentes candidatos (13 WT: DGCVPLNIIPLTT, 13 MUT1: EGCVPLNFIPLTT, 13 MUT2: EGCVPLNFYPLTT y 15 WT: VPLNIIPLTTAAKLM) se realizó una simulación de dinámica molecular (MD), la cual consiste en el cálculo de la trayectoria de la unión de la proteína diana (Nsp12) y el PI candidato. Para llevar a cabo la dinámica molecular se utilizó el programa computacional AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), el cual fue descrito por Salomon-Ferrer *et al*. (2013) donde menciona que es un set de campos de fuerza de mecánica molecular y un paquete de programas para simulación de dinámica molecular (ambos fueron AMBER en esta tesis).

Se empleó el generador de sistemas moleculares CHARMM-GUI (Jo *et al*., 2008), en el cual se comenzó subiendo el archivo PDB que contiene la proteína y el péptido, a continuación, se definió las cadenas a utilizar (PROA y PROB) y se verificó los aminoácidos de cada cadena, el siguiente paso consistió en editar el pdb ya subido agregando los puentes disulfuro (296-299; 304-308; 485-644), luego se definió el margen de agua a agregar desde el último extremo de la proteína en las tres direcciones (15,0, en sentido x, y, z) y se incluyeron los iones (Na^+ y Cl^-) en concentración 0,15 M (345 Na^+ y 332 Cl^-), a continuación, se definió el tamaño del sistema (datos entregados directamente de la página) y se utilizó la opción de generación automática de la grilla. Con la grilla definida se procedió a definir el campo de fuerza (AMBER, sin editar ninguna de las opciones del campo de fuerza AMBER), el input para la generación (AMBER), el input de equilibrado (ensamble NVT) y el input para la dinámica (ensamble NPT con temperatura de 310 K), con el sistema preparado se procedió a descargar en formato .tgz (archivo comprimido) de los cuales se visualizó el pdb y psf en VMD, se observó la caja de agua generada y se dejó corriendo en los servidores del

CBIB durante aproximadamente 2 semanas, generando 500 ns de simulación (Brooks *et* al., 2009; Lee *et al*., 2016; Lee *et al.,* 2020).

Se realizó el mismo procedimiento para PI mutado de 13 aa y para el PI *wild type* de 15 aa.

5.4 Obtener la energía de afinidad entre los péptidos candidatos y Nsp12 mediante cálculos de energía libre a partir de las trayectorias de simulación molecular.

Con respecto a los resultados obtenidos de la simulación de dinámica molecular fue posible calcular la energía libre entre el ligando y la proteína, por medio del método *end point* MM/GBSA.

La realización del cálculo de energía libre de las simulaciones se realizó a partir del método descrito por Wang *et al.* (2019), donde describe que (1) se inicia con una simulación de dinámica molecular de un complejo ligando-proteína que es realizado usando un solvente específico, (2) se borran todas las moléculas solventes y iones cargados de cada MD y se utiliza modelo solvente GBSA para evaluar la energía de solvatación, (3) a continuación, se obtendrá la energía final de unión sumando los componentes energéticos.

Reemplazando la metodología anterior con lo realizado de forma práctica se obtuvo que:

(1) Se comenzó con los resultados de la simulación de la dinámica molecular del péptido de 13 aminoácidos *wild type* (DGCVPLNIIPLTT), para esto se utilizó herramientas de Amber (*AmberTools*), a continuación, (2) se eliminó las moléculas solventes (agua) y los iones cargados (Na^+ y Cl^-), para esto mediante el programa de visualización molecular VMD se abrió la simulación y se escogió solamente los residuos del complejo (1-927 y 931-943) y se guardaron las coordenadas del complejo, luego se realizó lo mismo para el *target* (proteína, 1-

927) y para el ligando (péptido, 931-943), por otro lado, también se guardó los últimos 50 ns (500 *frames*) de la trayectoria del complejo entero (proteína + péptido). (3) Con todos los archivos anteriores se editó 3 *scripts* donde uno convertía los archivos pdb a prmtop (creación de fichero, se generaron 3 ficheros, complejo, receptor y ligando), otro era donde se colocaron los residuos que conformaban el receptor y el ligando por separado y el último ejecutaba el MM/GBSA calculando todas las fórmulas expuestas anteriormente (introducción punto 2.7.3) y entregando un resultado numérico.

El mismo proceso se siguió para 13 MUT1 (EGCVPLNFIPLTT), 13 MUT2 (EGCVPLNFYPLTT) y 15 WT (VPLNIIPLTTAAKLM), cambiando los datos utilizados con sus simulaciones correspondientes.

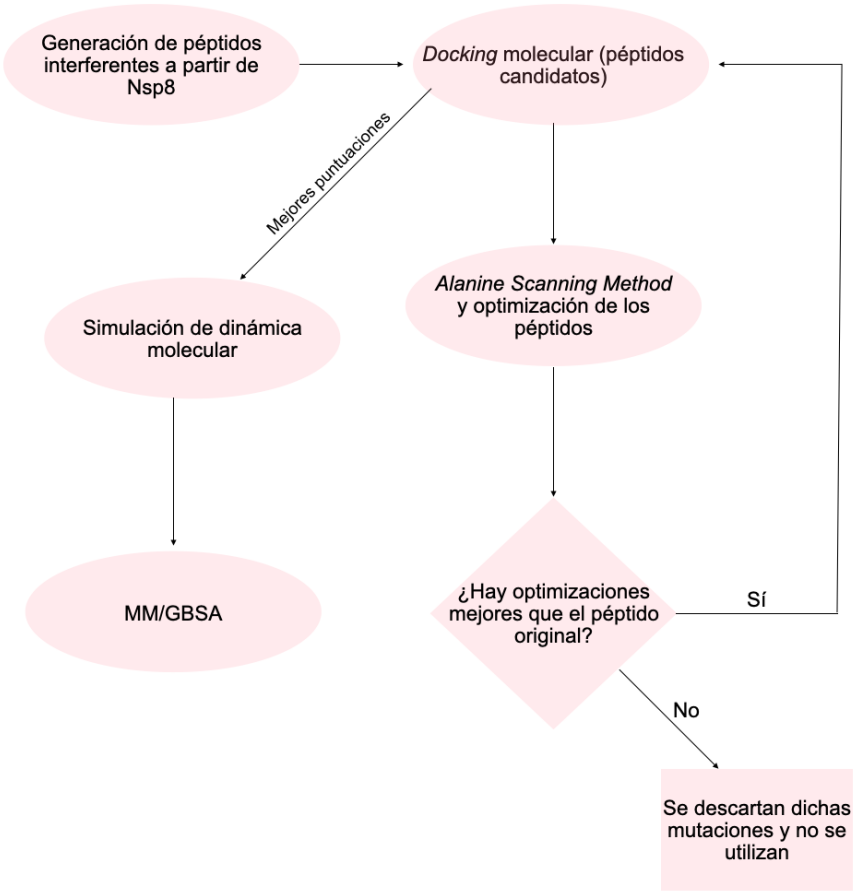


Figura 6. Diagrama de flujo de metodología. Se representan en óvalos los 5 ejes principales realizados, en un rombo se presenta la pregunta que se realizó cada vez que se obtuvo una mutación y en un rectángulo el fin cuando las optimizaciones no resultaban ser mejoras.

6. RESULTADOS

6.1 Péptido interferente inicial

Se obtuvo 6 candidatos para el péptido interferente inicial, los cuales son presentados en la tabla 1. Se presentaron 3 sectores de Nsp8 que resultaban tener mayor interacción y/o ser más adecuados para la obtención del péptido, siendo estos D107, N104 y V110, los cuales representan el aminoácido de la cadena B (Nsp8) en al cual inicia el péptido candidato. El residuo de inicio para la mayoría de los candidatos entregados por el servidor de *Peptiderive* fue el de la posición D107, al cual solamente se iba tomando un residuo más para alargar el PI, iniciando con DGCVPLNIIP (10 residuos), al cual se le agregó leucina DGCVPLNIIPL(11), DGCVPLNIIPLT (12) y DGCVPLNIIPLTT(13). Por otro lado, el péptido de 14 aminoácidos inicio en la posición N104 y presentó 11 aminoácidos (NARDGCVPLNIIPL) iguales a las PI comenzados en el residuo 107, a su vez el PI de 15 residuos comenzó en la posición 110 (valina) y tiene 10 aminoácidos iguales a los péptidos iniciados en 107.

Se puede observar que la composición de los péptidos en su mayoría fue por residuos apolares (75,1% ponderando la hidrofobicidad de cada cadena), donde de menor a mayor porcentaje de hidrofobicidad se tiene: 13 (69,2%) < 14 (71,4%) < 15 (73,3%) < 12 (75%) < 10 (80%) < 11 (81,8%), dentro de los residuos apolares se tienen hidrofóbicos (Ala, Leu, Ile, Val y Met,) y apolares hidrofílicos (Cys, Gly y Pro), por otro lado, también se tiene que las cadenas tienen residuos polares no cargados (Thr y Asn), polares cargados positivos (Arg y Lys) y negativos (Asp) (figura 7).

Tabla 1. Péptidos candidatos iniciales

Receptor	Ligando	Largo	Posición	*Score* (kcal/mol)	Secuencia
A	B	10	D107	-30,2	DGCVPLNIIP
A	B	11	D107	-32,9	DGCVPLNIIPL
A	B	12	D107	-33,5	DGCVPLNIIPLT
A	B	13	D107	-33,4	DGCVPLNIIPLTT
A	B	14	N104	-34,3	NARDGCVPLNIIPL
A	B	15	V110	-36,3	VPLNIIPLTTAAKLM

Como se mencionó previamente la tabla 1 contiene los candidatos iniciales generados por *Peptiderive*, donde se tiene el receptor que es la cadena A, que representa la proteína *target* (Nsp12), también se tiene el ligando que en este caso sería la cadena B o mejor dicho Nsp8. Se entrega el largo de los péptidos generados (10, 11, 12, 13, 14 y 15) el sitio en el cual comienza la cadena del péptido (correspondiente al aminoácido de Nsp8 en el cual inicia la secuencia), el puntaje de dicho péptido en la interacción con Nsp12 en kcal/mol y finalmente la secuencia completa de cada uno de los péptidos candidatos.

Los péptidos candidatos 10, 11, 12 y 13 comienzan con el ácido aspártico y simplemente va aumentando un aminoácido cada péptido, terminando el de 10 en prolina (figura 7A), el de 11 en leucina (figura 7B), el de 12 en treonina al igual que el de 13 (figura 7C y 7D). Por otro lado, el candidato de 14 aminoácidos comenzó en una posición diferente con un residuo de asparagina finalizando en un residuo de leucina (figura 7E), de igual manera el candidato de 15 aa inició en una posición totalmente distinta con valina y finalizando en metionina (figura 7F). Hay diferencias de tipos de residuos dentro de los candidatos, las principales diferencias son: falta de residuo polar cargado en candidato de 14 y 15 aminoácidos; falta de residuos polares no cargados en candidatos 10, 11, 12 y 13.

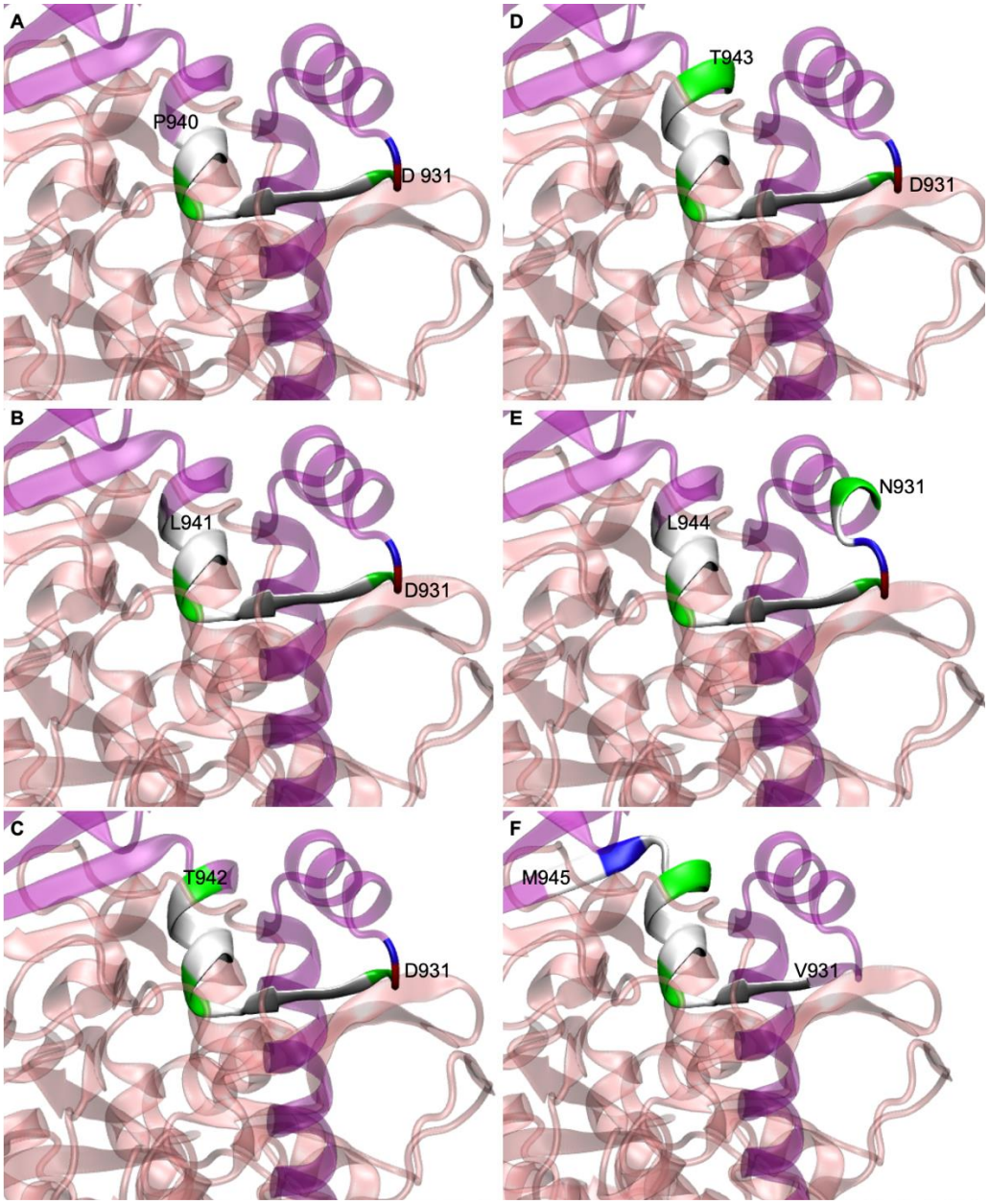


Figura 7. Péptidos candidatos para el complejo de elongación, replicación y transcripción de SARS-CoV-2. Mediante una visualización en VMD se observa en rosado Nsp12 y en morado Nsp8, también se pueden observar los fragmentos de Nsp8 que representan los péptidos candidatos de 10, 11, 12, 13, 14 y 15 aminoácidos de largo. Los péptidos fueron visualizados en *ResType*, es decir, el color representa el tipo de residuo que hay, donde blanco es apolar, azul es básico, verde es polar y rojo es ácido. Se inicia con un residuo ácido (Asp) en A, B, C y D, candidatos de 10, 11, 12 y 13 aminoácidos respectivamente. A y B finalizan en residuos apolares, C y D en residuos polares. E) Candidato de 14 aminoácidos que comienza con un residuo polar y finaliza en uno apolar. F) Candidato de 15 aminoácidos que empieza y finaliza en residuos apolares.

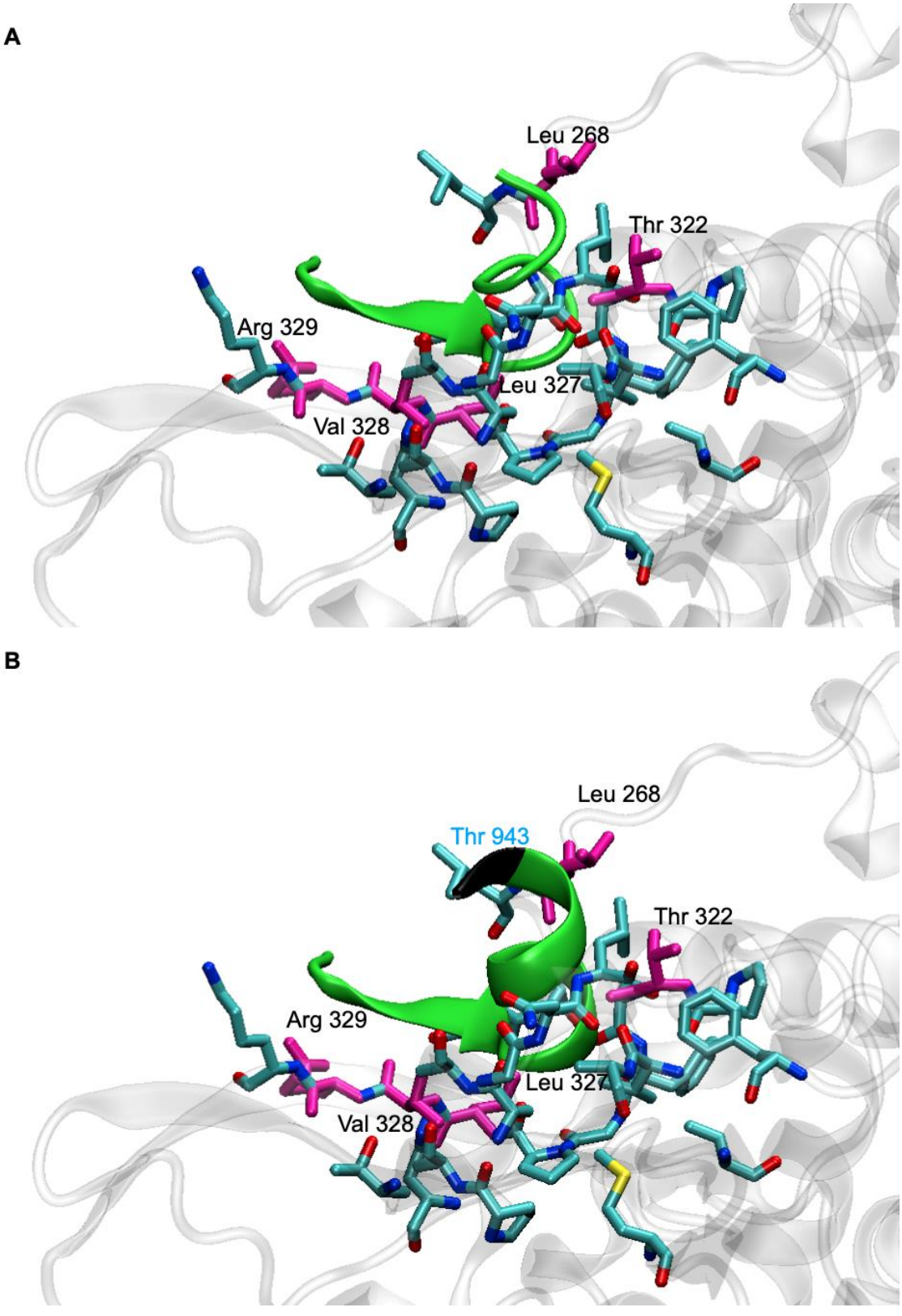
Con los péptidos de mejor puntuación (12, 13, 14 y 15) se realizó una visualización de las interacciones de dichos péptidos con la proteína *target* (Nsp12), de esto se determinó que ciertos residuos de la proteína interactuaban

con más secciones del péptido que otros. Hay residuos que se encuentran cercanos a todos los residuos del candidato como Thr 322 (interactúa directamente con N y T presentes en los candidatos) y Val 328 (que interactúa con G, V, C, P, L, I, M y A presentes en los candidatos). Por otro lado, hay residuos que interactúan con los candidatos 12, 13 y 14, estos son Leu 327 (G, V, L, I y P) y Arg 329 que interactúa con D generando enlaces cargados, también hay aminoácidos que interactúan con los candidatos 12, 13 y 15, siendo este Leu 268 (V, P, L e I), generando enlaces covalentes. De lo anterior se puede desprender que los péptidos de 12 y 13 aminoácidos comparten todas sus mayores interacciones con alguno de los otros dos péptidos candidatos.

De manera contraria los péptidos de 14 y 15 aminoácidos tienen interacciones únicas (propias) e interacciones mayores con otros residuos con los cuales los péptidos de 12 y 13 aminoácidos interactúan de menor manera.

Desglosando lo anterior, las interacciones únicas para el candidato de 14 aa son, Lys 270 y Asp 272, y las mayores interacciones (aparte de las que comparte) son Leu 269 y Tyr 271. Por otro lado, las interacciones propias del péptido de 15 aminoácidos son Leu 386, Leu 387, Thr 400, Asn 401 y Asn 402 y las mayores interacciones no compartidas con los otros candidatos son Asn 384 y Leu 385.

Hay residuos de los péptidos de 13 y 15 aminoácidos que no están interactuando con la proteína *target* (al menos no a 4 Å de distancia que fue lo calculado). En el candidato de 13 aminoácidos, el último residuo de Thr 943 y en el péptido de 15 aa los residuos de Thr 940 y Ala 942 no están interactuando con Nsp12.


A
Leu 268
Thr 322
Arg 329
Leu 327
Val 328
B
Leu 268
Thr 943
Thr 322
Arg 329
Leu 327
Val 328

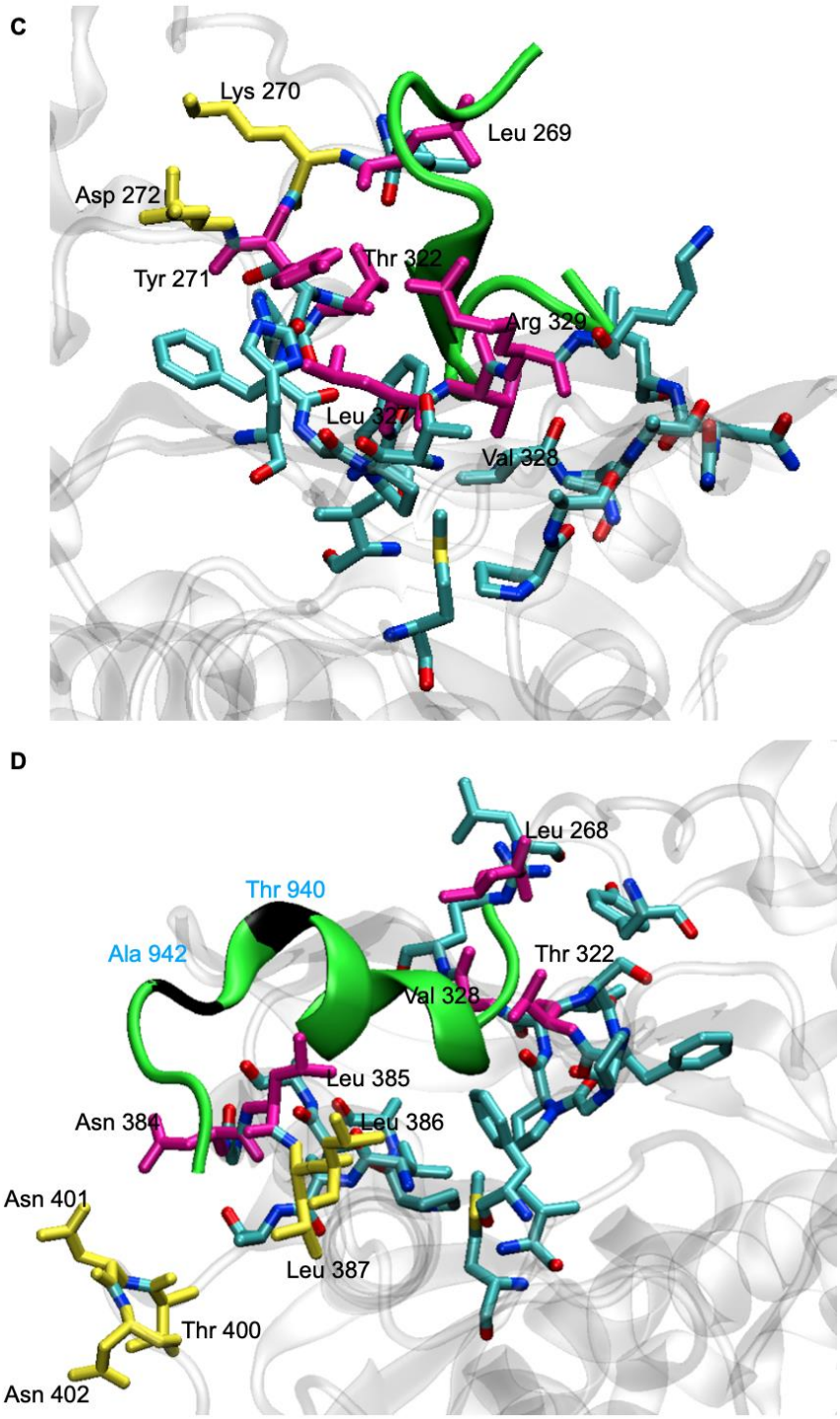


Figura 8. Interacción Nsp12-PIs candidatos de 12, 13, 14 y 15 aminoácidos. Mediante visualización en VMD se observó las interacciones entre los péptidos candidatos de 12, 13, 14 y 15 aminoácidos con los residuos a 4 Å de la cadena A (Nsp12), de color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target* y en azul los aminoácidos del péptido, en verde vemos el péptido candidato, en rosado los residuos de la proteína que tienen mayor interacción con el péptido y en amarillo los aminoácidos de la proteína que solo interactúan con ese péptido candidato. A) Interacciones entre Nsp12 y el péptido de 12 aminoácidos. B) Interacciones de Nsp12-PI de 13 residuos. C) Interacciones de Nsp12-PI de 14 residuos. D) Interacciones de Nsp12-PI de 15 residuos.

6.2 *Docking* Molecular

6.2.1 Pymol Autodock Vina Sofosbuvir

Se realizó el *docking* molecular del medicamento Sofosbuvir y Nsp12. El sitio donde se encontró la mejor pose no corresponde a un sitio de interacción entre Nsp12 y Nsp8 (-5,5 kcal/mol), ya que el fármaco mostró una mayor afinidad por el bolsillo catalítico de Nsp12 (-7,5 kcal/mol), como se ve graficado en la figura 9. Por ende, no será incluido en la comparación con los péptidos interferentes.

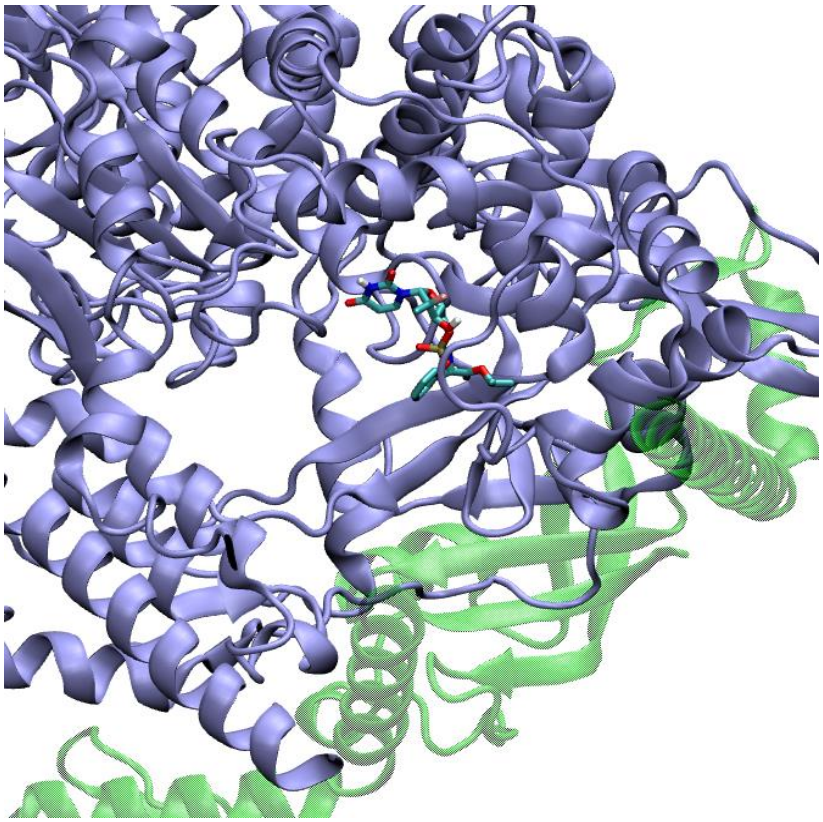


Figura 9. Sitio de interacción entre el medicamento Sofosbuvir y Nsp12. Mediante el programa de visualización molecular VMD se puede observar las proteínas no estructurales Nsp12 en azul y Nsp8 (ambas cadenas) en verde, también se puede observar en el centro la estructura del fármaco Sofosbuvir en formato *Licorice*. También se observa que la interacción del fármaco y Nsp12 es distinta a la de Nsp12 y Nsp8.

6.2.2 *FlexPepDock* péptidos candidatos

Se realizó este tipo de *docking* solamente con los péptidos de 12, 13, 14 y 15 aminoácidos, los cuales presentaron mejor puntuación según *Peptiderive* (-33,5 kcal/mol; -33,4 kcal/mol; -34,3 kcal/mol; -36,3 kcal/mol respectivamente), a partir de esto se obtuvo la tabla 2, donde se puede ver la puntuación de Rosetta (mediante el servidor de *FlexPepDock*) arroja un *score* para cada uno de los candidatos, siendo el mejor *score* para el péptido de 15 aminoácidos (-1808,8 kcal/mol), seguido del de 13 aa (-1806,9 kcal/mol), pasando ya a puntuaciones menores se obtuvo la de 14 aminoácidos (-1801,5 kcal/mol) y la de 12 aa, las cuales fueron descartadas. En la figura 10 se pueden ver las mejores posiciones de cada uno de los candidatos (A: 12 aa, B: 13 aa, C: 14 aa y D: 15 aa).

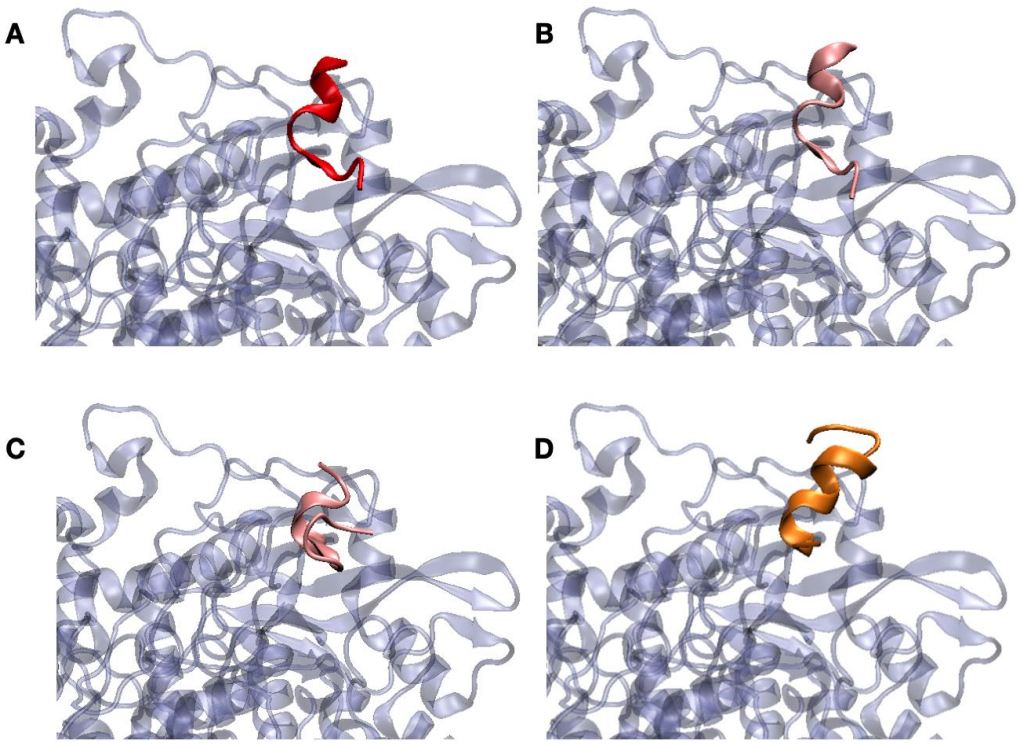


Figura 10. Proteína *target* y las mejores posiciones desde *FlexPepDock* de los candidatos de 12, 13, 14 y 15 aminoácidos. Mediante una representación visual en VMD se obtuvo A) En rojo se puede observar el péptido con 12 aa y en azul la proteína *target*. B) En rosado se puede observar el péptido de 13 aa interactuando con el *target* en azul. C) se puede ver el péptido de 14 aa en rosado y su interacción con la proteína *target* en azul. D) En naranjo se observa el péptido compuesto por 15 aa y su sitio de mejor unión con la proteína *target* en azul.

Tabla 2. Mejores puntuaciones del *FlexPepDock*

Tamaño péptido (aa)	*Score* (kcal/mol)	Secuencia
12	-1796,8	DGCVPLNIIPLT
13	-1806,9	DGCVPLNIIPLTT
14	-1801,5	NARDGCVPLNIIPL
15	-1808,8	VPLNIIPLTTAAKLM

6.3 *Alanine Scanning Method* para determinar posibles optimizaciones de los fragmentos nativos de 13 y 15 aa

A partir de la mutación de todos los residuos del péptido candidato de 13 WT (secuencia: DGCVPLNIIPLTT) por alanina, se obtuvo que 4 aminoácidos eran más relevantes para la interacción del péptido con la proteína *target*, siendo estos D931, L936, I938 e I939. A su vez, se determinó la interacción de residuos de Nsp12 con los 4 aminoácidos más importantes del péptido, resultando en que las interacciones obtenidas previamente (figura 8B) se mantuvieron en su mayoría (L327, V328 y R329), pero se perdieron las interacciones entre el residuo T322-N937 y T322- T942, es decir, no interactúa con ninguno de los aminoácidos a estudiar. Por otro lado, se encontró que hay dos residuos que presentan una mayor interacción con el péptido candidato (interactúan con más aminoácidos del péptido), estos son L385 y P326, a su vez se visualizó que Arg 329 es el único residuo a 4 Å que está interactuando con D931 (figura 11A). De los 4 residuos a utilizar, 3 son de naturaleza apolar hidrofóbica (L936 e I938-939) y uno de naturaleza ácida (D931) que también resulta ser el primer aminoácido de la cadena peptídica (figura 11B).

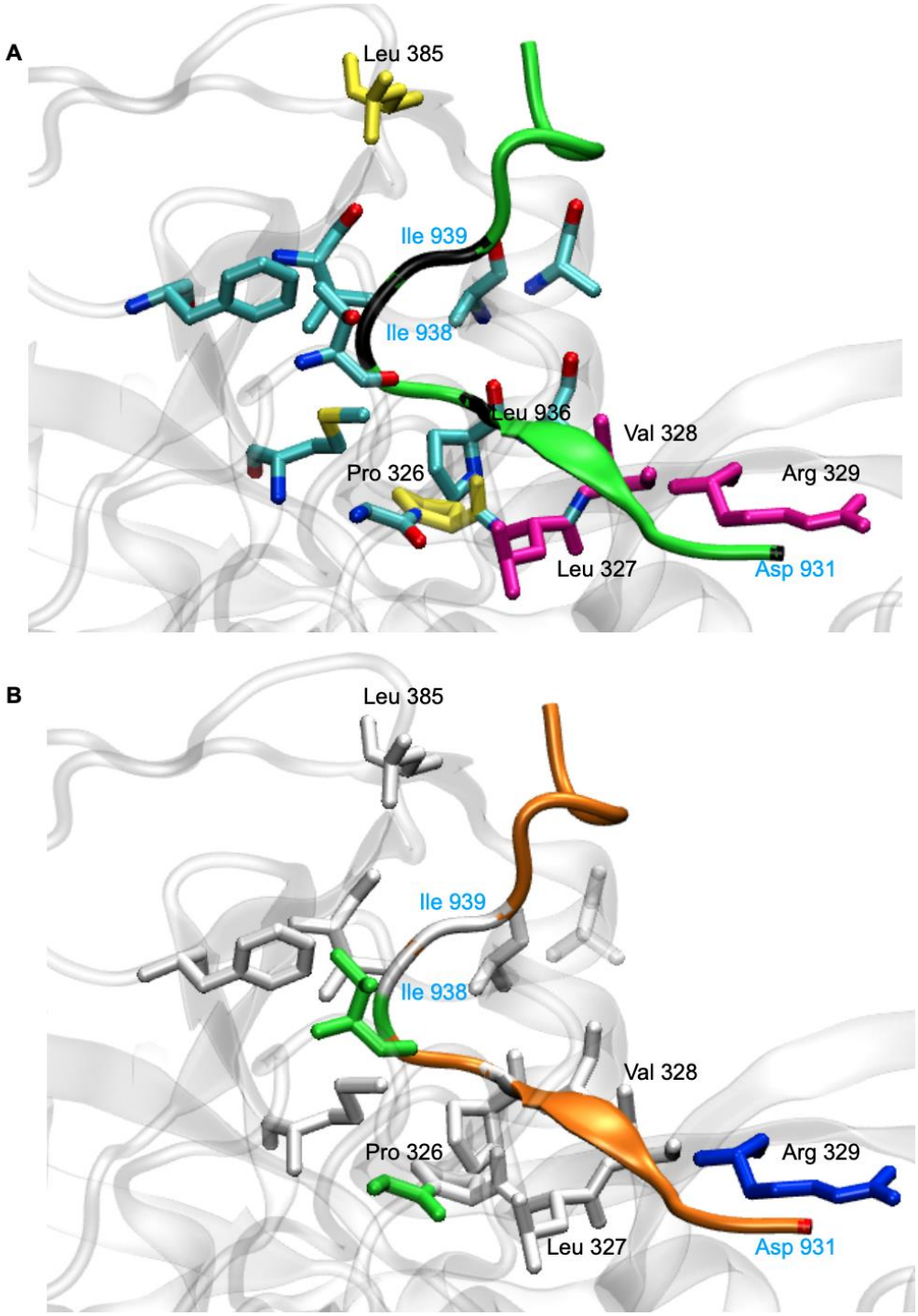


Figura 11. Interacciones entre residuos más relevantes del péptido candidato de 13 WT y la proteína *target*. Mediante VMD se visualizan las interacciones de los cuatro residuos obtenidos del *Alanine Scanning Method* (D 931, L 936, I 938 e I 939) y los aminoácidos de Nsp12. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target* y en azul los aminoácidos del péptido. A) En rosado encontramos los residuos de la proteína *target* que tiene mayor interacción con el péptido de 13 WT (representado en verde), en amarillo se observan las nuevas interacciones obtenidas luego del *docking* molecular y los aminoácidos más relevantes los podemos ver de color negro. B) Se ve el tipo de residuos que están interactuando, siendo los blancos apolares, los verdes básicos, los azules básicos y los rojos ácidos.

Tabla 3. *Alanine Scanning Method* 13 WT

Nombre del residuo	Secuencia	*Score* (kcal/mol)
Isoleucina	DGCVPLNIIPLTT	-1,7
Ácido aspártico	DGCVPLNIIPLTT	-1,5
Isoleucina	DGCVPLNIIPLTT	-1,3
Leucina	DGCVPLNIIPLTT	-0,9

En la tabla 3 tenemos los resultados del *Alanine Scanning Method* del péptido candidato de 13 aminoácidos, la forma de determinar si un residuo es un posible *hot spot* es viendo que haya una diferencia de al menos 2 kcal con la afinidad original, se puede apreciar que ningún residuo de la cadena tuvo un aumento de energía de 2 kcal, por ende, se escogieron los 4 residuos con una diferencia negativa mayor, estos se encuentran en las posiciones D931, L936, I938 y I939.

En el caso de la mutación de todos los residuos del péptido candidato de 15 WT (secuencia: VPLNIIPLTTAAKLM) por alanina, resultó también que hay 4 aminoácidos más relevantes para la interacción del péptido con Nsp12, siendo estos: L933, I935, L938 y M945. Por otra parte, se determinó la interacción de residuos de la proteína *target* con los 4 aminoácidos del péptido, a partir de esto se obtuvo que las interacciones obtenidas en la figura 8F siguen siendo las mismas luego del *docking*, con la única diferencia que hay un residuo que antes no presentaba gran número de interacciones y ahora si las presenta, siendo este Ala 381 (figura 12A). La naturaleza de los residuos es apolar hidrofóbica para los 4 residuos obtenidos (L933, I935, L938 y M945).

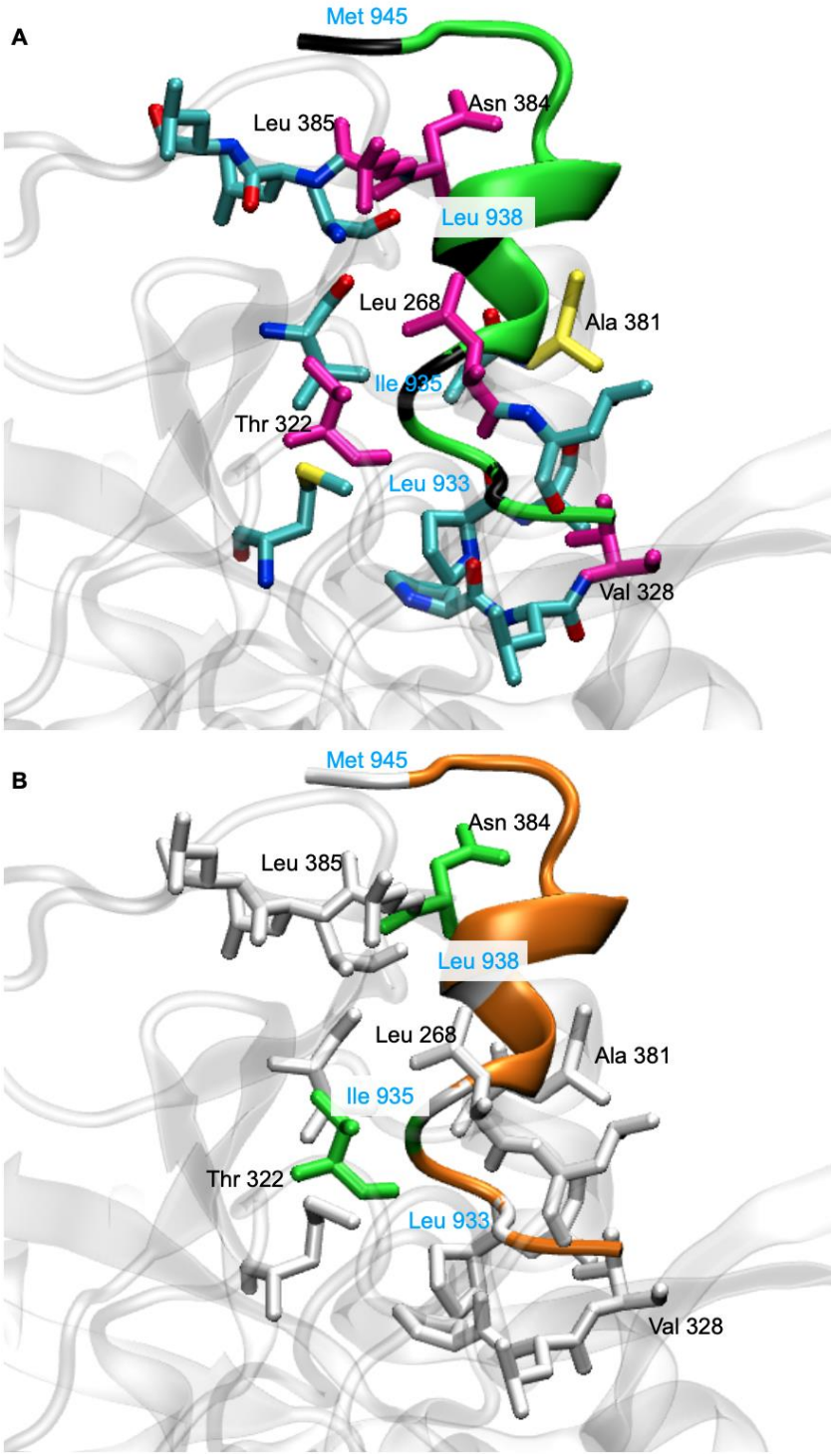


Figura 12. Interacciones entre residuos más relevantes del péptido candidato de 15 WT y la proteína *target*. Mediante VMD se visualizan las interacciones de los cuatro residuos obtenidos del *Alanine Scanning Method* (L 933, I 935, L 938 y Met 945) y los aminoácidos de Nsp12. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target* y en azul los aminoácidos del péptido. A) En rosado encontramos los residuos de la proteína *target* que tiene mayor interacción con el péptido de 15 WT (representado en verde), los aminoácidos más importantes los podemos ver de color negro. B) Se ve el tipo de residuos que están interactuando, siendo los blancos apolares, los verdes básicos, los azules básicos y los rojos ácidos.

Tabla 4. *Alanine Scanning Method* 15 WT

Nombre del residuo	Posición	*Score* (kcal/mol)
Leucina	933	-4,1
Isoleucina	935	-1,8
Metionina	945	-1,7

A diferencia de la tabla 3, en la tabla 4 si se obtuvo que un residuo es un *hot spot* (L933), por ende, dicho residuo fue el primero en ser mutado (mutaciones en tabla 8), además se escogió los 2 siguientes residuos con mayor cambio de afinidad, es decir, los residuos I935 y M945 (representados en negro en la figura 6A). A partir de los resultados del *Alanine Scanning Method* se determinó que había que modificar (optimizar) los péptidos para obtener *scores* más negativos (mientras más negativo, mayor afinidad). Para esto, los residuos D931, L936, I938 y I939 del péptido de 13 aminoácidos fueron mutados (como se verá en el punto 6.4.1). Por otro lado, los residuos L933, I935 y M945 del péptido 15 WT fueron modificados (revisado en el punto 6.4.2).

6.4 Mutaciones de fragmentos nativos de 13 y 15 aminoácidos

Con el fin de obtener el péptido interferente más afín que los segmentos de Nsp8 que se obtuvieron a partir de *Peptiderive* y *FlexPepDock*, con cadenas: DGCVPLNIIPLTT (PI: 13 aminoácidos) y VPLNIIPLTTAAKLM (PI: 15 aminoácidos) se optimizó el péptido mediante mutaciones con el *software Flexddg* de Rosetta. Para determinar los residuos a mutar se utilizaron los datos presentados en la sección 6.3 (tabla 3 y 4). La determinación de si una mutación es mejor que el residuo que estaba previamente en dicha posición se vio a través del *score*, el cual presenta la energía de unión luego de la mutación (se realiza una resta entre la energía de unión *wild type* y la energía de unión de la mutación).

6.4.1 Mutaciones péptido *wild type* 13 aminoácidos (13 WT)

Las mutaciones para el candidato de 13 aa fueron determinadas de manera racional (a partir de la tabla 3), mutando apolares hidrofóbicos por otros residuos del mismo grupo y el residuo ácido por otros residuos cargados (ácidos y básicos).

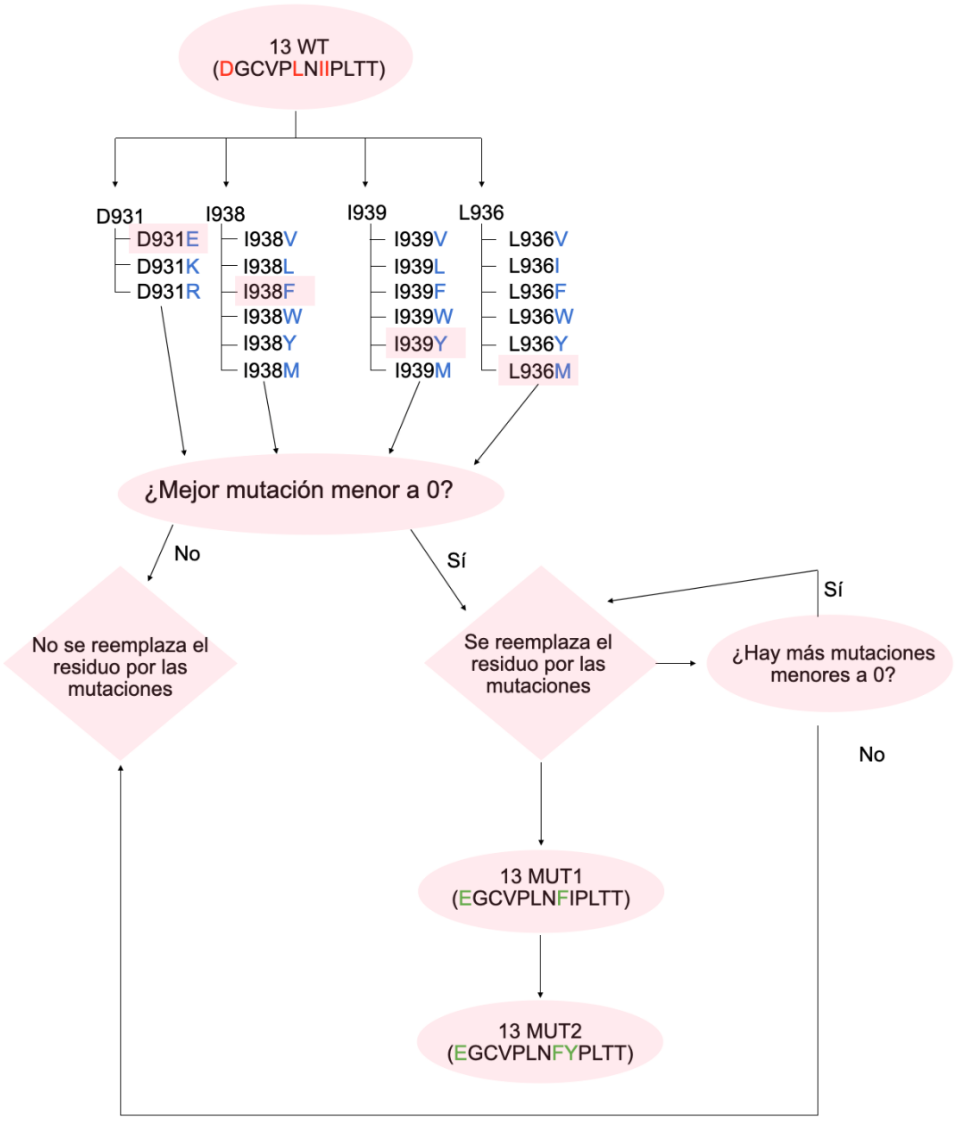


Figura 13. Diagrama de mutaciones de 13 WT. Se observan todas las mutaciones realizadas a los 4 residuos *hot spot* (representados con letra roja en el primer óvalo) obtenidos a partir del *Alanine Scanning Method* (D931, L936, I938 e I939). En letras azules se representó las mutaciones generadas y los rectángulos rosados hacen referencia a la mejor mutación de dicho *hot spot*. Finalmente en los últimos dos óvalos se tienen las cadenas con las mejores optimizaciones (representados los aminoácidos obtenidos en color verde).

En la figura 13 se representan todas las mutaciones generadas para los residuos *hot spot* obtenidos en la tabla 3, donde los residuos mutados que presentaron un cambio energético mayor fueron D931E, I938F e I939Y, con scores de -0,6 kcal/mol, -2,2 kcal/mol y -0,4 kcal/mol, respectivamente (para información más detallada dirigirse al anexo 1).

6.4.1.1 Docking molecular de las cadenas mutadas

En la tabla 5 podemos las puntuaciones del péptido candidato y sus mutaciones, donde se refirió el péptido sin mutaciones como 13 WT (*wild type*), el péptido con dos mutaciones (Phe y Glu) como 13 MUT1 (mutante 1) y el péptido con tres mutaciones (fenilalanina, ácido glutámico y tirosina) como 13 MUT2 (mutante 2). A partir de esto se puede ver que se hizo una mutación solo por fenilalanina, luego 13 MUT1, donde se mutó tanto por fenilalanina como por ácido glutámico. Finalmente, en 13 MUT2 se realizó la mutación que presentó el *score* más negativo (-1886,3 kcal/mol), donde aparte de los reemplazos de residuos en 13 MUT1 se agregó la mutación de isoleucina por tirosina.

Tabla 5. Puntuación de *FlexPepDock* de PI 13 aa mutado

Péptido	Nombre	*Score* (kcal/mol)	Cadena
13, sin mutaciones	13 WT	-1806,9	DGCVPLNIIPLTT
13, una mutación	-	-1853,5	DGCVPLNFIPLTT
13, dos mutaciones	13 MUT1	-1871,0	EGCVPLNFIPLTT
13, tres mutaciones	13 MUT2	-1886,3	EGCVPLNFYPLTT

6.4.2 Mutaciones péptido *wild type* de 15 aminoácidos (15 WT)

Los péptidos fueron mutados de forma racional utilizando los resultados obtenidos en la tabla 4, mutando los residuos apolares por los otros residuos apolares.

Lo que ocurrió fue que ninguna mutación realizada en los residuos *hot spot* (L933, I935 y M945) entregaron puntuaciones menores (más negativas), por ende, se decidió no seguir mutándolo y continuar solo con el péptido de 13 residuos. En la tabla 8 se puede observar un resumen de puntuaciones obtenidas a partir de las mutaciones del PI candidato de 15 aminoácidos.

Tabla 6. Mutaciones de *hot spots* en PI candidato 15 WT

Residuo	Mutación	*Score* (kcal/mol)	Cadena original	Cadena mutada
L 933	I	1,9	VPLNIIPLTTAAKLM	VPINIIPLTTAAKLM
I 935	V	0,4	VPLNIIPLTTAAKLM	VPLNVIPLTTAAKLM
M 945	F	0,6	VPLNIIPLTTAAKLM	VPLNIIPLTTAAKLM

Tabla 7. Péptidos mutados a trabajar

Péptido	Simbología	Cadena original	Cadena mutada
13 aa	13 WT	DGCVPLNIIPLTT	DGCVPLNIIPLTT
13 aa	13 MUT1	DGCVPLNIIPLTT	EGCVPLNFIPLTT
13 aa	13 MUT2	DGCVPLNIIPLTT	EGCVPLNFYPLTT
15 aa	15 WT	VPLNIIPLTTAAKLM	VPLNIIPLTTAAKLM

En la tabla 7 se puede observar la simbología que se utilizará a continuación para hacer referencia a las mutantes y los *wild type*, con sus cadenas correspondientes y los residuos mutados en rojo.

6.5 Simulación de dinámica molecular para describir el comportamiento péptido-*target* a través del tiempo.

La simulación de dinámica molecular nos entrega las interacciones durante un periodo de tiempo entre los aminoácidos de la proteína *target* y el péptido candidato (13 o 15 aminoácidos, *wild type* y mutado). Durante esta sección se presentarán visualizaciones de las cajas utilizadas y de las interacciones en los primeros 50 ns (500 *frames*) y últimos 50 ns (500 *frames*), y a su vez gráficos comparativos entre las interacciones en ambos tiempos.

6.5.1 Simulación MD 13 aminoácidos *wild type*

Se realizó cajas de simulación molecular para el complejo de Nsp12-PI 13 WT (DGCVPLNIIPLTT); Nsp12-PI 13 MUT1 (EGCVPLNFIPLTT); Nsp12-PI 13 MUT2 (EGCVPLNFYPLTT); Nsp12-PI 15 WT (VPLNIIPLTTAAKLM). Si bien son 4 cajas distintas se componen de la misma manera (figura 13), donde se tiene la proteína no estructural 12 (RdRp), el péptido interferente (13 WT, 13 MUT1, 13 MUT2 y 15 WT), los contraiones (sodio y cloro) y las moléculas de agua (H_2O).

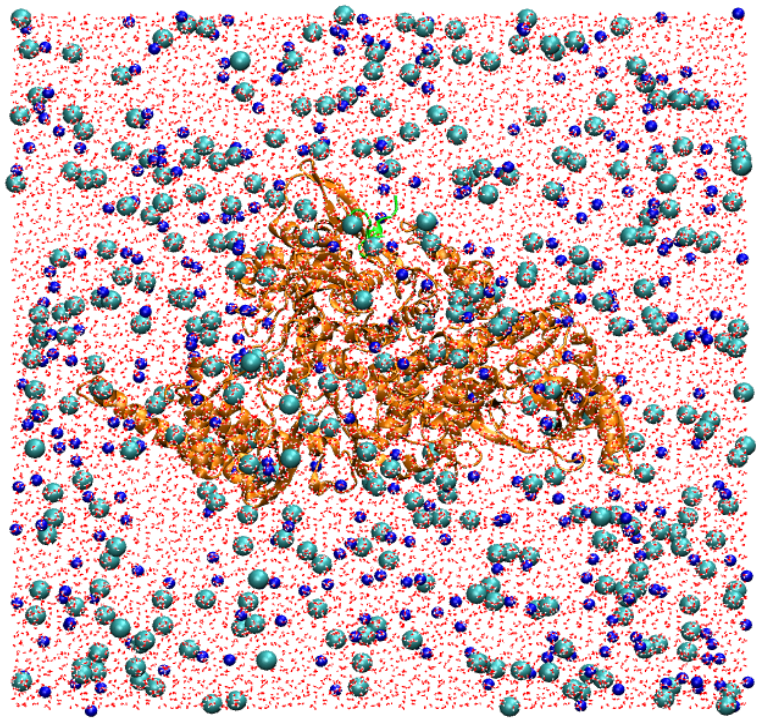


Figura 14. Representación de las cajas de agua para simulación MD, con la caja del péptido candidato de 13 aa WT. Se puede observar en visualización *Lines* las moléculas de agua (H_2O) de color rojo, en visualización van der Waals los contraiones de cloro (Cl^-) en celeste y los contraiones de sodio (Na^+) en azul, también se observa la proteína Nsp12 de color naranjo y el péptido de color verde, ambas visualizaciones en *New Cartoon*.

La figura 15 presenta las interacciones y cercanías en un inicio (primeros 50 nanosegundos) donde se presenta una mayor interacción (superior al 90% del tiempo) con 14 residuos, los cuales son: L268, L269, Y271, T322, S323, P326, L327, V328, R329, P376, A377, A380, V396 y M664.

Dichos residuos generan principalmente interacciones entre dos residuos apolares con los aminoácidos V934, P935, L936 e I938. También se puede ver que varios de estos residuos son los mismos que presentan un mayor contacto con diferentes residuos del péptido candidato (figura 8), la mayoría de los residuos que están interactuando son de tipo hidrofóbicos (L, P, V, A, M, Y) y polares (T y S).

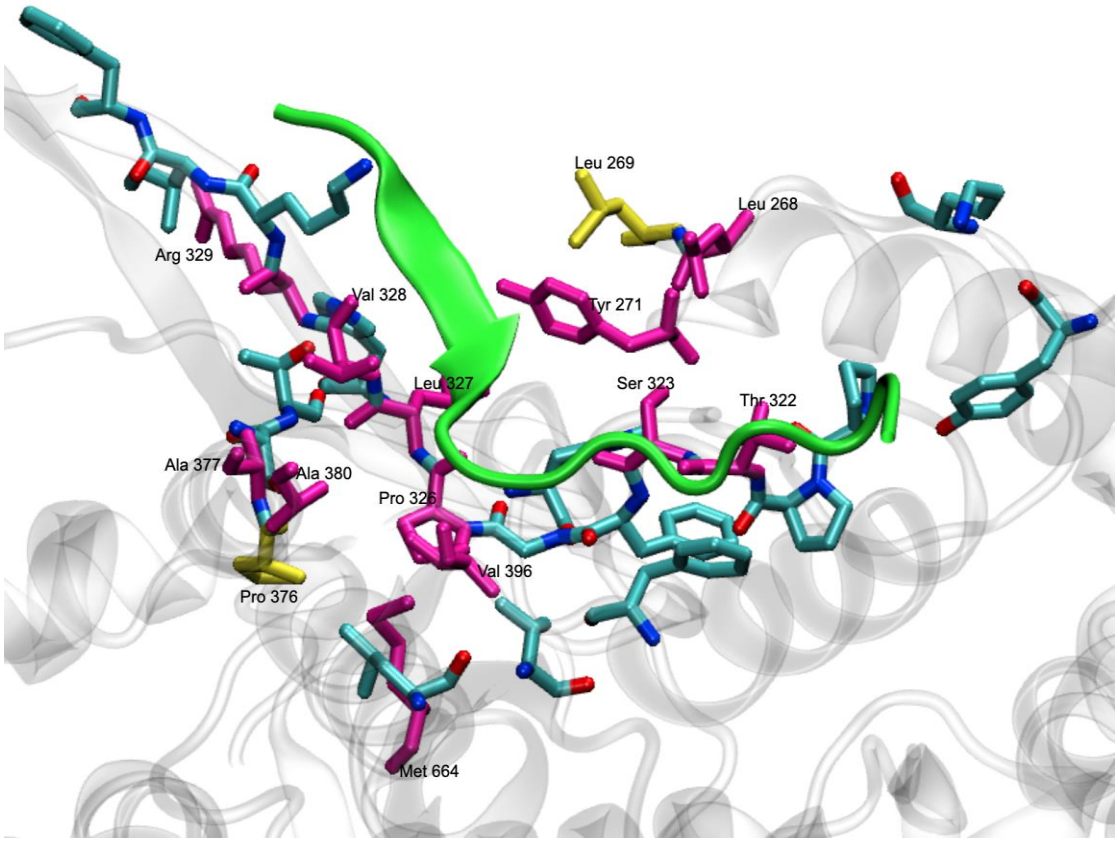


Figura 15. Interacciones entre Nsp12 y PI 13 aa WT los primeros 50 ns. Mediante visualización de VMD se establecieron las interacciones a 4 Å del péptido candidato. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target* y en azul los aminoácidos del péptido. Los residuos de la proteína *target* con mayor porcentaje de interacción con el péptido candidato se encuentran representados en rosado, las interacciones que solo ocurren al inicio están de color amarillo y el PI se representa en verde.

Por otro lado, en la figura 16 se encuentran las interacciones y cercanías los últimos 50 nanosegundos de la simulación, donde se encuentran al igual que en la figura 9 hay 14 residuos de la proteína *target* que presentan una mayor interacción (superior a 90% del tiempo) con el péptido, los residuos del *target* son: L268, Y271, T322, S323, P326, L327, V328, R329, H345, A377, A380, T394, V396 y M664 e interactúan en su mayoría con los residuos C933, V934, P935, L936, N937, I938 e I939. Generando interacciones entre aminoácidos apolares (Leu 268 - Ile 938), otras entre residuos polares (S323-N937) y entre apolares hidrofóbicos con apolares hidrofílicos (L327-C933).

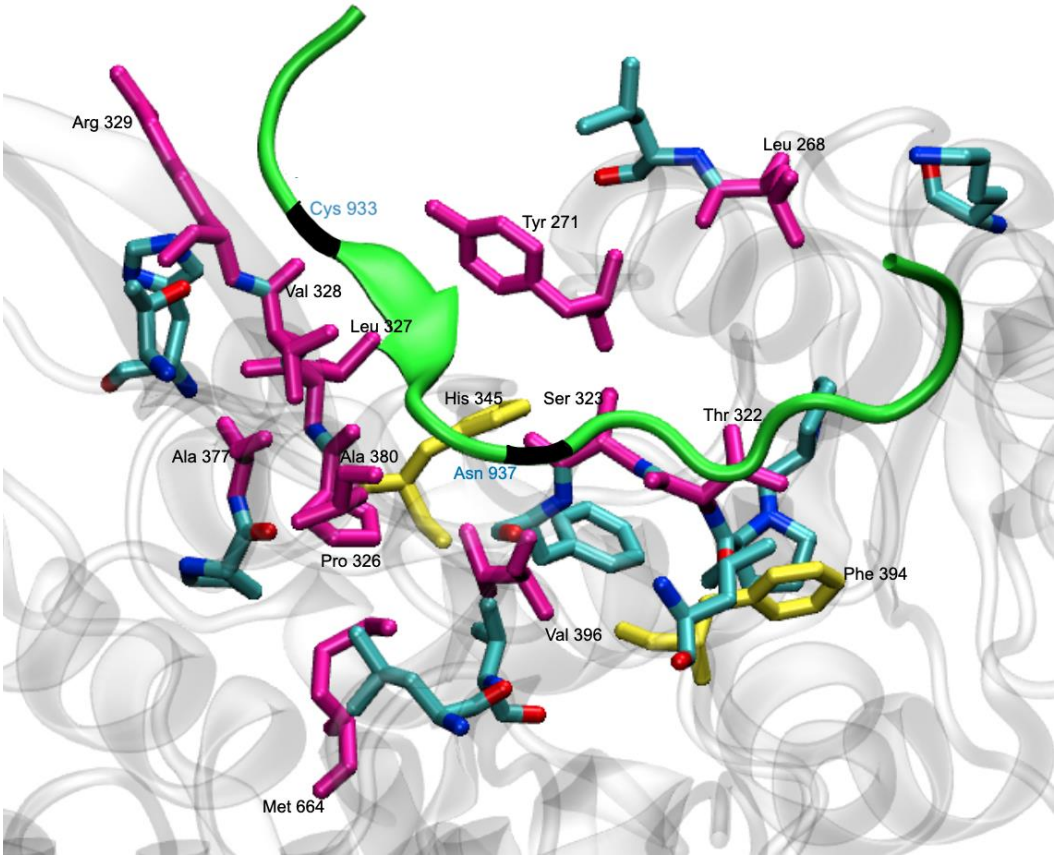


Figura 16. Interacciones entre Nsp12 y PI 13 WT los últimos 50 ns. Mediante visualización de VMD se establecieron las interacciones a 4 Å del péptido candidato. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target*. Los residuos de la proteína *target* con mayor porcentaje de interacción con el péptido candidato se encuentran representados en rosado, las interacciones que solo ocurren al final están de color amarillo y el PI se representa en verde.

Comparando ambas figuras se tiene que ambas tienen 14 residuos que interactúan más de 90% del tiempo (más de 45 ns), dentro de los cuales hay residuos que presentan interacciones fuertes tanto al inicio como al final, las cuales se mencionaron previamente. Por otro lado, hay residuos que tienen un alto porcentaje de interacción solamente en los primeros o últimos ns, como L269 y P276 en los primeros 50 ns y H345 y F394 en los últimos 50 ns. A su vez hay residuos que tienen un mayor número de contactos con diferentes aminoácidos del péptido, para esto se utilizó los residuos de Nsp12 que interactúan con al menos 3 aminoácidos de PI de 13 aa WT y durante (como mínimo) un 80% del tiempo (véase anexo 2).

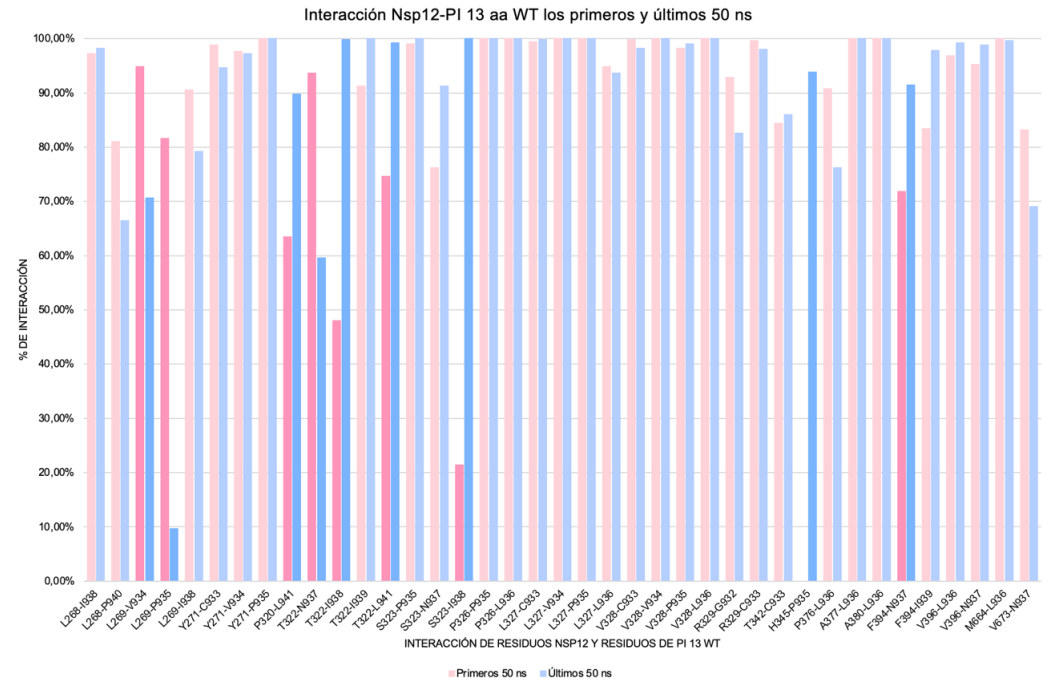


Figura 17. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y PI 13 WT en los primeros y últimos 50 ns. En el eje x vemos representada la interacción entre residuos de Nsp12 y residuos del péptido 13 WT, en el eje y se encuentra el porcentaje de interacción de los aminoácidos. Las columnas rosadas (claro y oscuro) representan la interacción los primeros 50 ns y las columnas azules (claro y oscuro) la interacción los últimos 50 ns. Las columnas representadas con colores claros son las interacciones donde el porcentaje de variación entre los primeros 50 ns y los últimos 50 ns fue menor a un 20%, por otro lado, las columnas de colores más oscuros son las interacciones que presentaron más de un 20% de diferencia entre ambos tiempos.

Con la figura 17 es posible apreciar la diferencia entre las interacciones y cercanías más frecuentes los primeros 50 ns y los últimos 50 ns, donde vemos que hay residuos que en ambos periodos de tiempo interactúan un 100% del tiempo, estos son: Y273-P935, L327-V934, L327-P935, V328-L936, A377-L936 y A380-L936. Por otro lado, hay residuos que interactúan un tiempo reducido en los primeros 50 ns y en los últimos la interacción aumenta considerablemente, como en: Y274-I938, S323-I938, S323-I939, H345-P935 y F934-P940. También se puede observar en los colores más oscuros las interacciones que tuvieron una diferencia porcentual mayor al 20% (entre la interacción inicial y final), siendo estas: L269-V934, L269-P935, P320-L941, T322-N937, S323-I938 y H345-P935 (véase anexo 2). Los colores más claros del gráfico hacen referencia a todas las interacciones que ocurrieron sobre un 80% del tiempo en los primeros o últimos 50 ns de la simulación.

6.5.2 Simulación MD 13 aminoácidos MUT1

Al igual que en la dinámica de simulación molecular de 13 aminoácidos en la figura 14, en la figura 18 se tienen las interacciones entre la proteína *target* y el PI mayores a un 90% del tiempo, durante los primeros 50 ns de la trayectoria, donde hay residuos que están interactuando que también se presentaron en los primeros 50 ns de la simulación 13 WT, por otro lado, hay tres residuos que no están presentes en la interacción entre la proteína *target* y el fragmento del péptido de 13 aminoácidos, siendo estos residuos Val 339- Ile 939, Thr 342- Cys 933 y Ala 381- Ile 339 (interacciones representadas en gris) las cuales en su mayoría están relacionadas con el residuo que se mutó en la sección 6.5.3, también se encontraron 3 residuos que interactúan gran parte del tiempo en un inicio y al final se reduce la interacción más de un 20% (K330-P940 77,6%; A377-I939 46,2%; F394-N937 74,4%, reducción en cercanía) representados en amarillo (figura 18).

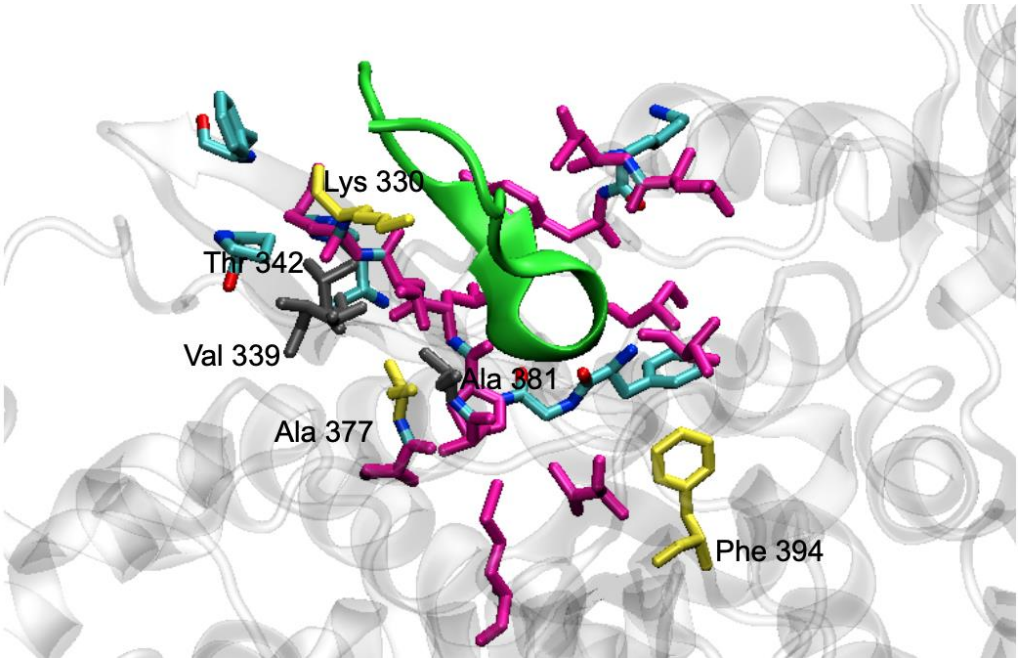


Figura 18. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT1 los primeros 50 ns. Mediante visualización de VMD se establecieron las interacciones a 4 Å del péptido candidato. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target*. Los residuos de la proteína *target* con mayor porcentaje de interacción con el péptido candidato se encuentran representados en rosado, las interacciones que solo ocurren al inicio están de color amarillo y el PI se representa en verde.

En la figura 19 se presentan las interacciones que ocurren sobre el 90% del tiempo en los últimos 50 ns de la simulación, se puede ver que hay residuos que al igual que en los primeros nanosegundos se encuentran interactuando gran parte del tiempo como L268-F938, Y271-P935, T322-N937, S323-P935, P326-L936, L327-P935, V328-I939, R329-E931, P376-L936, A380-L936, A381-I939, V396-L936 y M664-L936. Por otro lado, hay 4 residuos que presentan una interacción alta, la cual no es presentada en los últimos 50 ns de 13 WT, siendo estas L269-F938, V339-I939, T342-C933, y A381-I939 (representadas en color gris).

Las interacciones son las mismas que durante los primeros 50 ns, exceptuando que hay residuos que solo interactúan al principio de la simulación, siendo estos: K330-P940 que en un inicio interactúa 99,2% del tiempo y al final solamente 21,6% del tiempo, también se tiene F394-N937 que al comienzo tienen una cercanía un 90,8% del tiempo y al final solamente un 43,0%. Estas interacciones específicas son observables en la figura 20, donde tenemos un gráfico, las interacciones que presentan una diferencia porcentual mayor a 20% se encuentran de colores más oscuros (Lys 270- Pro 935; Thr 322- Pro 935; Lys 330- Pro 940; Ala 377- Ile 939; Ala 380- Leu 941) y los más claros representan todas las interacciones ocurridas sobre un 80% del tiempo (véase anexo 2).

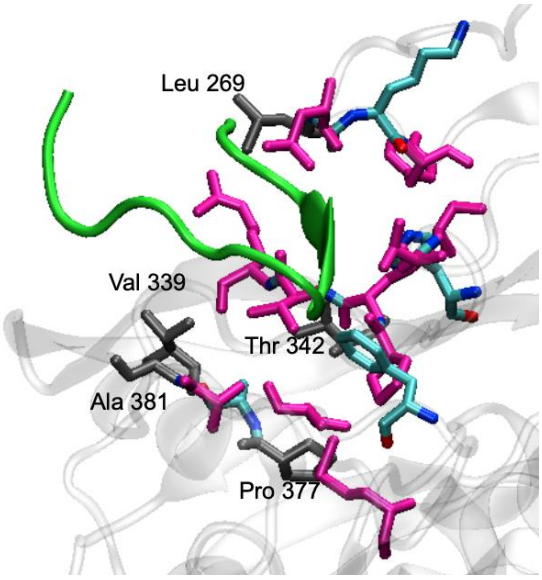


Figura 19. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT1 los últimos 50 ns. Mediante visualización de VMD se establecieron las interacciones a 4 Å del péptido candidato. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target*. Los residuos de la proteína *target* con mayor porcentaje de interacción con el péptido candidato se encuentran representados en rosado, las interacciones que solo ocurren al final están de color amarillo y el PI se representa en verde.

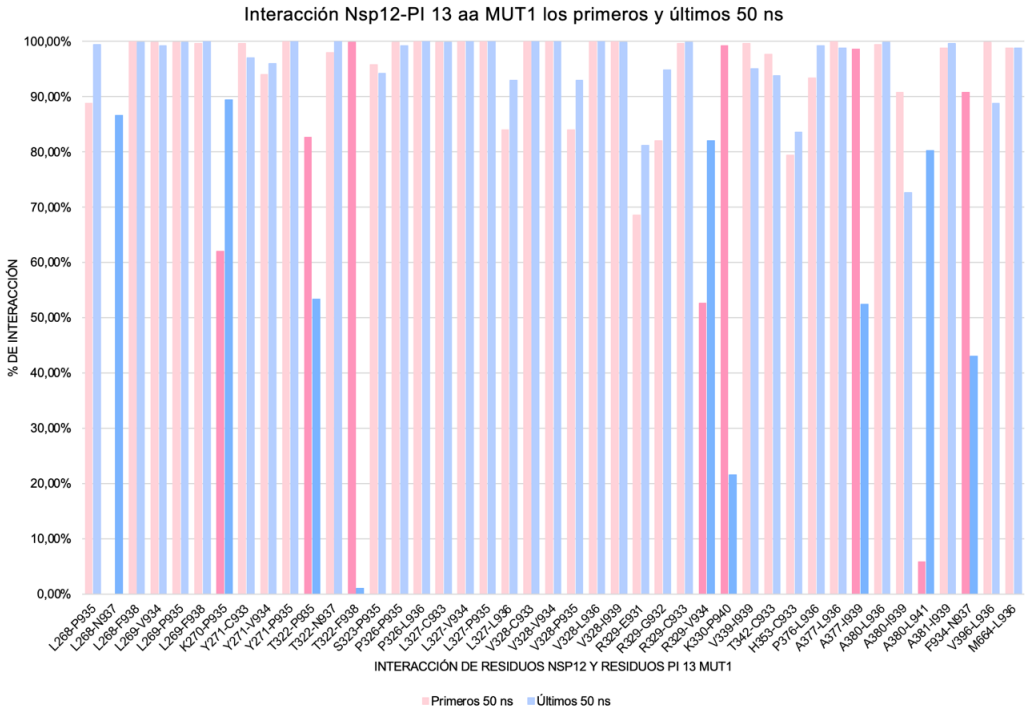


Figura 20. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y 13 MUT1 en los primeros y últimos 50 ns. En el eje x vemos representada la interacción entre residuos de Nsp12 y residuos del péptido 13 MUT1, en el eje y se encuentra el porcentaje de interacción de los aminoácidos. Las columnas rosadas (claro y oscuro) representan la interacción los primeros 50 ns y las columnas azules (claro y oscuro) la interacción los últimos 50 ns. Las columnas representadas con colores claros son las interacciones donde el porcentaje de variación entre los primeros 50 ns y los últimos 50 ns fue menor a un 20%, por otro lado, las columnas de colores más oscuros son las interacciones que presentaron más de un 20% de diferencia entre ambos tiempos.

Se puede observar brevemente en la tabla 8 que el porcentaje de interacción entre R329-D931 es mayor cuando se reemplaza el aminoácido Asp por Glu, subiendo un 12,6% cuando la interacción es R329-E931. Por otro lado, existen dos interacciones (L268-I938 y L269-I938) las cuales aumentan porcentualmente cuando el residuo de isoleucina 938 es mutado por el residuo aromático fenilalanina 938 (L268-F938 y L269-F938), en cambio ocurre también que se reducen altamente las cercanías entre T322-I938 y S323-I938, cuando se modifica Ile 938 por Phe 938. A su vez, la mutación de I938F genera que haya más interacciones con la Ile 939 (residuo a mutar en 13 MUT2).

Tabla 8. Porcentaje de interacción y cercanía de residuos mutados en 13 WT y 13 MUT1

Interacción/cercanía 13 WT	% inicio	% fin	Interacción/cercanía 13 MUT1	% inicio	% fin
L268-I938	97,2	98,2	L268-F938	100,0	99,8
L269-I938	90,6	79,2	L269-F938	99,6	100,0
T322-I938	48,0	99,8	T322-F938	99,8	1,0
S323-I938	21,4	100,0	S323-F938	0	0
R329-D931	75,4	68,6	R329-E931	68,6	81,2

6.5.3 Simulación MD 13 aminoácidos 13 MUT2

Al igual que en las simulaciones anteriores se tiene representando en la figura 21 las interacciones mayores a un 90% del tiempo durante los primeros 50 ns de la trayectoria en la simulación de 13 MUT2 (EGCVPLNFYPLTT). En la figura 21 se pueden observar residuos marcados de color amarillo (único de esta simulación, primeros 50 ns 13 MUT2), gris (presentes en 13 MUT2, pero no en

13 WT) y rosado (residuos con porcentaje de interacción mayor o igual a 90%). Como mencioné previamente la interacción entre S323-P935 es única de este fragmento de la simulación, pero también se encuentra presente en 13 WT. Por otro lado, las interacciones más relevantes las vemos en gris y estas son: K330-Y939, V339-Y939, T342-C933, A381-Y939 y F394-R937, se puede ver que la mayor parte de las interacciones son con el aminoácido I939Y.

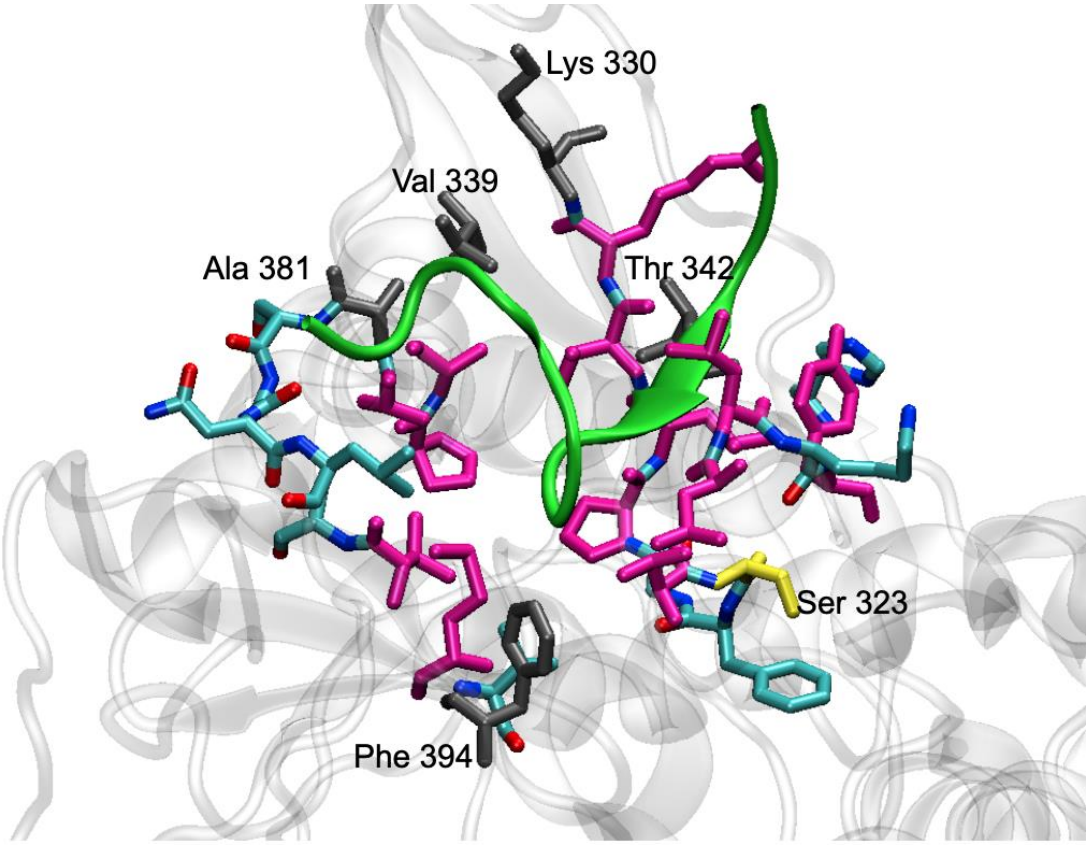


Figura 21. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT2 los primeros 50 ns. Mediante visualización de VMD se establecieron las interacciones entre la proteína *target* y péptido candidato a 4 Å. De color verde podemos ver representado el péptido 13 MUT2, en amarillo las interacciones únicas de esta parte de la interacción, finalmente en gris se observan las interacciones que no están presentes en los mismos 50 ns de 13 WT.

En la figura 22 se presentan las interacciones que ocurren sobre el 90% del tiempo en los últimos 50 ns de la simulación, se observa que hay interacciones y cercanías que no están presentes durante los primeros 50 ns: G383-L941, A397-L941; N384-L941, se puede ver que todas las interacciones nuevas son con leucina 941. Por otro lado, hay también interacciones que están presentes en los

primeros nanosegundos de esta simulación, pero no en 13 WT: L269-F938, K330-Y939, V339-Y939, T342-C933, P376-L936 y A381-Y939, nuevamente se puede observar que la mayor parte de las interacciones que no ocurren en 13 WT son generadas en 13 MUT2 debido a las mutantes, Phe 938 y Tyr 939. El resto de las interacciones son las mismas que ocurren en 13 WT.

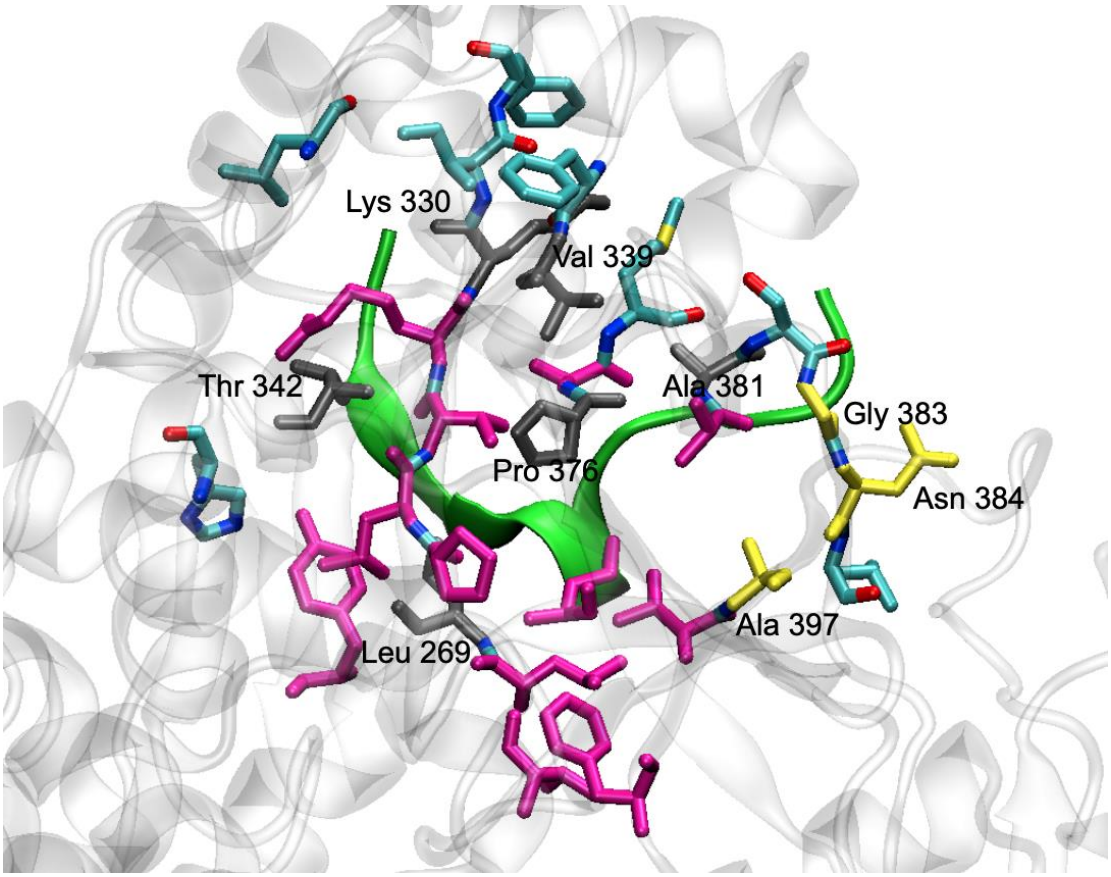


Figura 22. Interacciones entre Nsp12 y 13 MUT2 los últimos 50 ns. Mediante visualización de VMD se establecieron las interacciones entre la proteína *target* y péptido candidato a 4 Å. De color verde podemos ver representado el péptido 13 MUT2, en amarillo las interacciones únicas de esta parte de la interacción, finalmente en gris se observan las interacciones que no están presentes en los mismos 50 ns de 13 WT.

En la figura 23 se puede apreciar gráficamente las interacciones mostradas con anterioridad, también se puede ver en las columnas con colores más oscuros cuando se presenta una diferencia porcentual entre las interacciones de un inicio y final mayor al 20%, estas interacciones son: T322-F938, S323-P935, A380-L941, A381-T942, G383-L941, N384-L941, L385-L941, V936-L941 y A397-L941,

donde se puede ver que la mayoría de las interacciones que más varían son entre residuos polares y apolares, y entre residuos apolares (véase anexo 2).

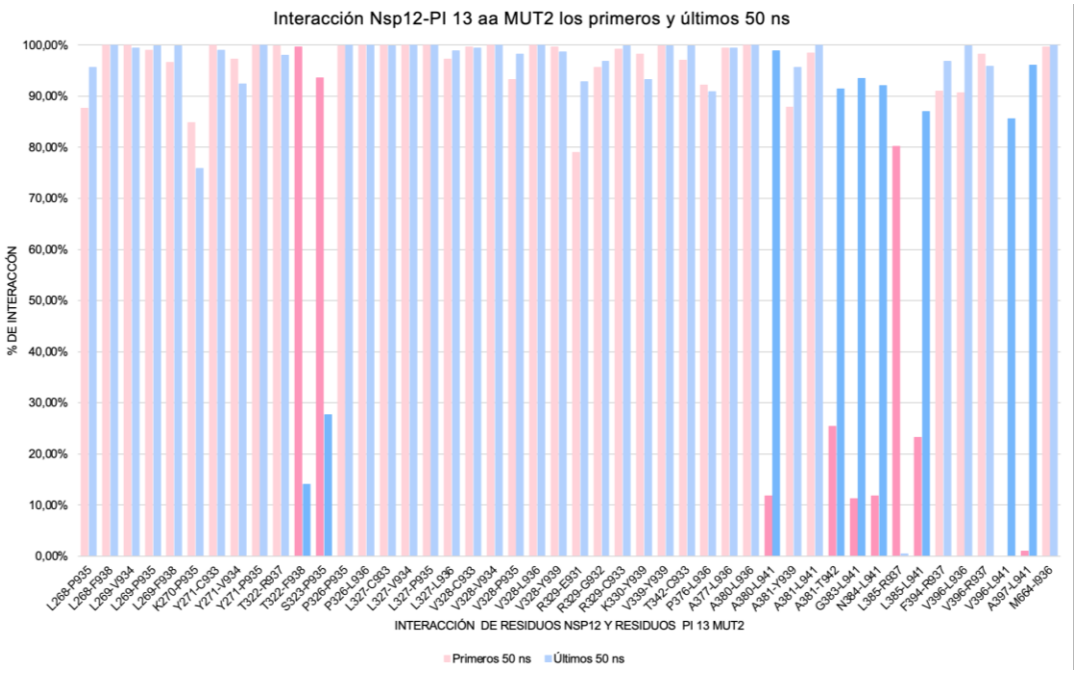


Figura 23. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y 13 MUT2 en los primeros y últimos 50 ns. En el eje x vemos representada la interacción entre residuos de Nsp12 y residuos del péptido 13 MUT2, en el eje y se encuentra el porcentaje de interacción de los aminoácidos. Las columnas rosadas (claro y oscuro) representan la interacción los primeros 50 ns y las columnas azules (claro y oscuro) la interacción los últimos 50 ns. Las columnas representadas con colores claros son las interacciones donde el porcentaje de variación entre los primeros 50 ns y los últimos 50 ns fue menor a un 20%, por otro lado, las columnas de colores más oscuros son las interacciones que presentaron más de un 20% de diferencia entre ambos tiempos.

Se puede observar brevemente en la tabla 9 las diferencias porcentuales finales de las interacciones de los residuos mutados entre 13 WT, 13 MUT1 y 13 MUT2. Se puede ver primero que el porcentaje de interacción de la mutación Glu 931 sigue aumentando la cantidad de tiempo que interactúan. Por otro lado, la interacción con fenilalanina es prácticamente igual a como es en 13 MUT1, hay menor cercanía entre S323-F938 y es ligeramente mayor la cercanía T322-F938 en comparación con 13 MUT1, pero es bastante menor que en 13 WT. Finalmente, la cercanía T322-I939 y la interacción F934-I939 están solo presentes en 13 WT y en ninguna mutante (ni cuando se mantiene isoleucina 939, ni cuando se muta por tirosina 939), por otro lado, la mayoría de las interacciones presentes en 13 MUT1 (V328-I939, V339-I939, A377-I939, A380-

I939, A381-I939) se mantienen con porcentajes altos de interacción a excepción de A377-Y939 y A380-Y939 las cuales no están presenten en 13 MUT2, en cambio K330-Y939 está presente y generando un enlace pi-catión.

Tabla 9. Porcentaje de interacción de residuos mutados en 13 WT, 13 MUT1 y 13 MUT2

13 WT	%	13 MUT1	%	13 MUT2	%
R329-D931	68,6	R329-E931	81,2	R392-E931	92,8
T322-I938	99,8	T322- F938	1,0	T322-F938	14
S323-I938	100,0	S323-F938	0,0	S323-F938	0,0
L268-I938	0,0	L268-F938	99,8	L268-F938	100,0
L269-I938	0,0	L269-F938	100,0	L269-F938	99,8
T322-I939	100,0	T322-I939	0,0	T322-Y939	0,0
F394-I939	97,8	T322-I939	0,0	T322-Y939	0,0
V328-I939	0,0	V328-I939	99,8	V328-Y939	98,6
K330-I939	0,0	K330-I939	0,0	K330-Y939	93,2
V339-I939	0,0	V339-I939	99,6	V339-Y939	99,8
A377-I939	0,0	A377-I939	98,6	A377-Y939	0,0
A380-I939	0,0	A380-I939	90,8	A380-Y939	0,0
A381-I939	0,0	A381-I939	99,6	A381-Y939	95,6

6.5.4 Simulación MD *wild type* de 15 aminoácidos (15 WT)

Bajo el mismo procedimiento que en las simulaciones anteriores se obtuvo que el péptido 15 WT (VPLNIIPLTTAAKLM) presenta interacciones y cercanías que se mantienen durante todo el periodo de la simulación, siendo estas: L268-I935, Y271-P932, P326-L933, V328-V931, V328-L933, V328-I936, A380-L933 y V396-P937 (representadas en rosado), por otro lado, hay interacciones y cercanías que

presentan interacción el 100% del tiempo solamente al inicio o al final (representado en amarillo en figura 24 A y B), dentro de estas tenemos: L327-V931, L327-P932, L385-L944, M664-L933 en los primeros 50 ns y T322-N934 en los últimos 50 ns. Por otro lado, hay cercanías que presentan un cambio porcentual sobre 20% entre los primeros y últimos 50 ns, dentro de estas están: L268-T939, T322-I935, F324-N934, N384-M945, V396-N934, T400-M945, N401-M945 y V673-N934 (mayor porcentaje de cercanía los primeros 50 ns) e interacciones que se presentan mayormente al inicio como: G325-N934, L385-L943, L385-L944, L385-M945, L387-L938, V396-N934, A398-M945, T400-M945, N401-M945 y V673-N934 (interacciones presentes mayormente los primeros 50 ns) y por otro lado, hay una cercanía (A381-T940) presente más en los últimos 50 ns y dos interacciones (A377-I936 y A380-I936) que se encuentran mayormente al final de la simulación (últimos 50 ns), los resultados expuestos anteriormente se puede observar en la figura 25 de manera gráfica en las columnas azul y rosado oscuro las interacciones con mayor diferencia significativa y en las columnas más claras todas las interacciones entre la proteína *target* y el péptido interferente 15 WT (para información más detallada dirigirse a anexo 2).

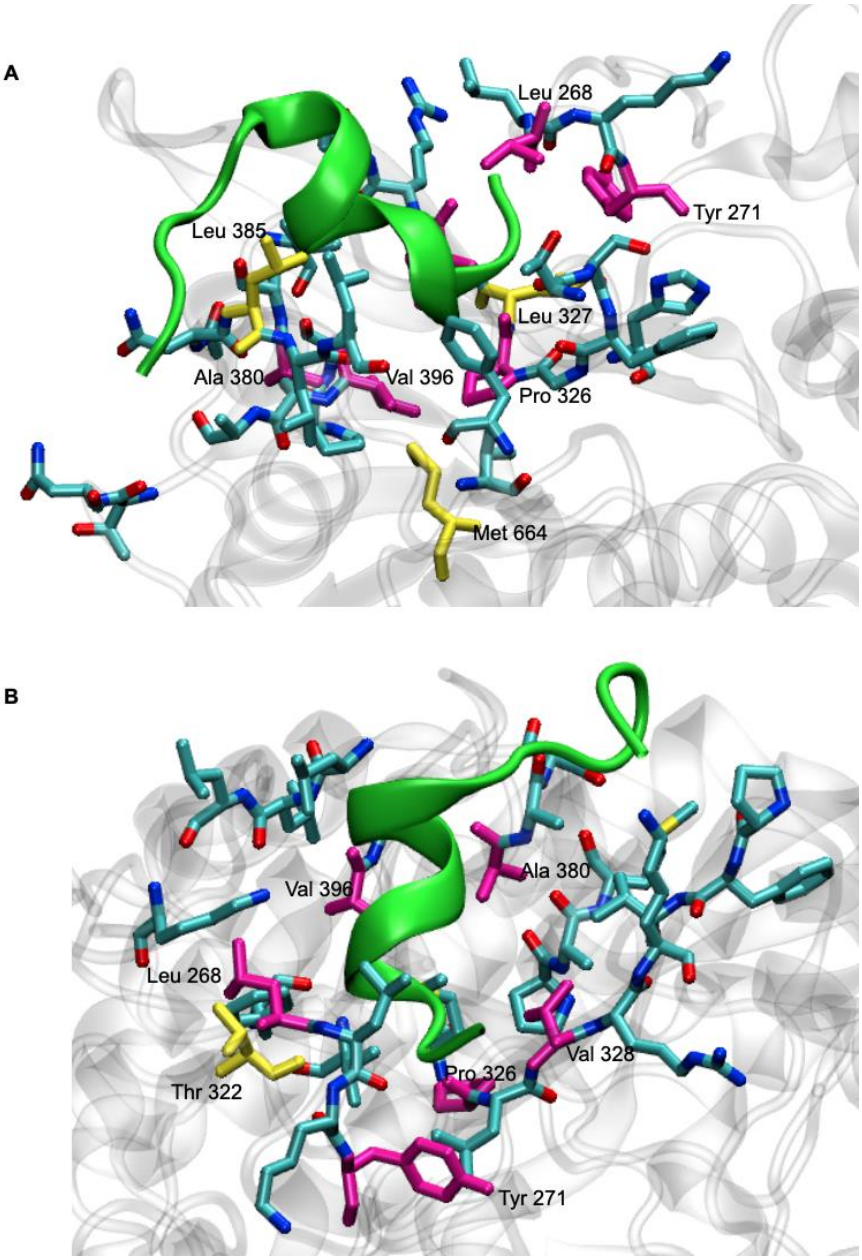


Figura 24. Interacciones entre Nsp12 y 15 WT los primeros y últimos 50 ns. Mediante visualización de VMD se establecieron las interacciones a 4 Å del péptido candidato. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target*. Los residuos de la proteína *target* que están presentes 100% del tiempo tanto al inicio como al final se representan en rosado y los que solo están un 100% del tiempo en el inicio o en el final se representan en amarillo. A) Primeros 50 ns de la simulación. B) Últimos 50 ns de la simulación.

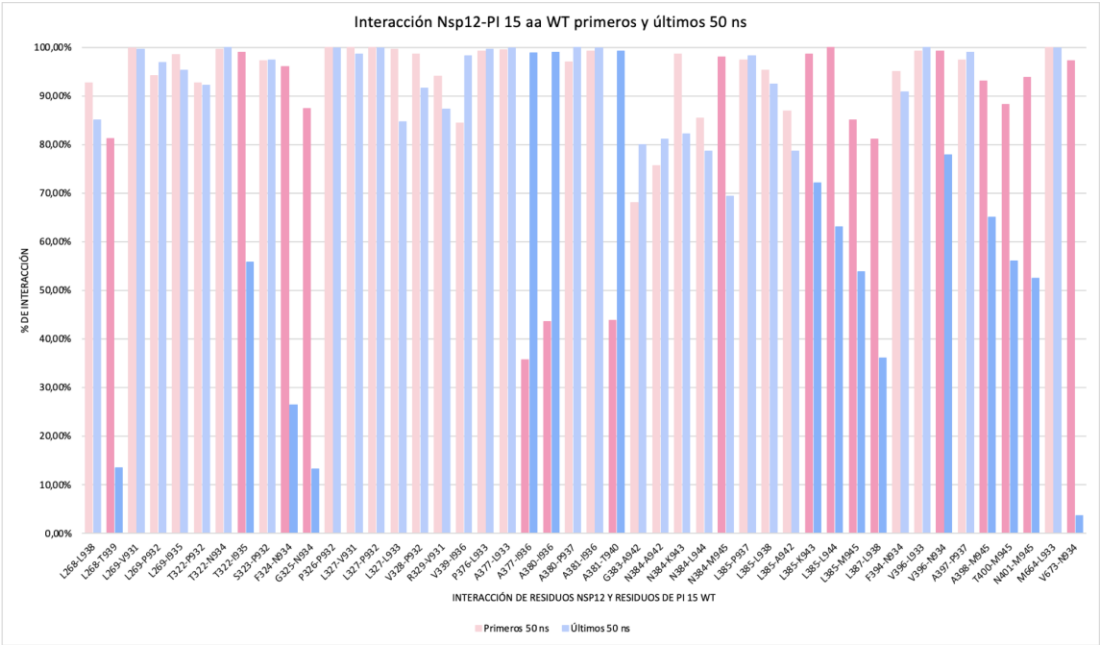


Figura 25. Gráfico de interacciones entre residuos de Nsp12 y 15 WT en los primeros y últimos 50 ns. En el eje x vemos representada la interacción entre residuos de Nsp12 y residuos del péptido 15 WT, en el eje y se encuentra el porcentaje de interacción de los aminoácidos. Las columnas rosadas (claro y oscuro) representan la interacción los primeros 50 ns y las columnas azules (claro y oscuro) la interacción los últimos 50 ns. Las columnas representadas con colores claros son las interacciones donde el porcentaje de variación entre los primeros 50 ns y los últimos 50 ns fue menor a un 20%, por otro lado, las columnas de colores más oscuros son las interacciones que presentaron más de un 20% de diferencia entre ambos tiempos.

6.6 MM/GBSA

A partir de los resultados obtenidos de las dinámicas de simulación moleculares se realizó el método de cálculo de energía *end point*, donde se obtuvo lo dispuesto en la tabla 17, donde podemos ver los estados energéticos finales tanto de los complejos, receptores (proteína *target*) y ligandos (péptido interferente), también se puede ver el ΔG total, con el cual podemos determinar que el candidato con mejor afinidad es 13 MUT2 (-59,6), por otro lado, se puede ver que la diferencia entre 13 WT y 13 MUT1 es extremadamente baja (-0,2 de diferencia), finalmente se ve que todos los ΔG son mayores que el de 15 WT.

Tabla 10. Puntuaciones MM/GBSA de 13 WT, 13 MUT1, 13 MUT2 y 15 WT

MM/GBSA	*Score* complejo	*Score* receptor	*Score* ligando	ΔG total
13 WT	-27505	-27150	-301	-53,5
13 MUT1	-17070	-27158	-304	-53,7
13 MUT2	-27559	-21170	-329	-59,6
15 WT	-27424	-27117	-261	-46,4

7. DISCUSIÓN

El virus SARS-CoV-2 generó una pandemia en el año 2020, la cual duró aproximadamente 2 años. Actualmente los tratamientos contra SARS-CoV-2 son vacunas que afectan directamente las proteínas estructurales (*Spike*, proteína E, proteína M, proteína N y la proteína hemaglutinina-esterasa), principalmente dirigidas a la proteína *Spike*. En contraste, en el presente trabajo propusimos estudiar un mecanismo de interferencia de la interacción entre proteínas no estructurales (Nsp) producidas en el citoplasma de las células huésped una vez que ha ocurrido la infección por el virus. Las Nsps son secuencias altamente conservadas y muy similares entre todos los virus de la familia *Coronaviridae* (Pastrian-soto, 2020). Comparativamente, la proteína *Spike* presenta una tasa de mutación entre 1,05 x 10^{-3} a 1,26 x 10^{-3}, la cual es mayor que la de las proteínas no estructurales, siendo esta 1 x 10^{-4} a 1 x 10^{-6} (Amicone *et al*., 2022; John Hopkins, 2020; Olazabal Mancilla, 2023; Pérez-Abeledo y Sanz Moreno, 2021). De esta manera, acá proponemos la generación de péptidos interferentes (PI) para evitar la interacción entre Nsps involucradas en la generación del complejo de elongación, transcripción y replicación de SARS-CoV-2. Al enfocarnos en las Nsps más que en la *Spike*, generaríamos una alternativa terapéutica más duradera y menos frágil ante las mutaciones.

Según los resultados del medicamento Sofosbuvir, podemos decir que el sitio de interacción de péptido nativo (*wild type*) es completamente distinto al de los medicamentos reportados previamente. Según nuestros análisis, el fármaco se une al bolsillo catalítico de Nsp12 (proteína *target*), mientras que la interacción Nsp12-Nsp8 ocurre en un lugar totalmente alejado de esto, por ende, Sofosbuvir no es un buen referente de comparación con el PI que se busca realizar. Por otro lado, según Aleebrahim-Dehkordi *et al.* (2023) la Naringenina es un inhibidor de interacción de Nsp12, pero no se une al sitio de interacción que se estudió durante esta investigación, es más, éste medicamente esta inhibiendo la unión

entre Nsp12 y Nsp3 (sitios completamente distintos a la interacción entre Nsp12-Nsp8).

De esta manera, generamos péptidos interferentes de la interacción entre Nsp12 y Nsp8. Los péptidos candidatos realizados fueron de 10 a 15 residuos aminoacídicos, los resultados obtenidos a partir de esto, muestran que mientras más aminoácidos contiene el péptido interferente más negativo resulta ser su puntuación (entregada por el servidor de Peptiderive), lo cual hace referencia a que existe un mayor número de interacciones con la proteína *target*, los *scores* más negativos son mejores, ya que presentan una mayor energía de afinidad del péptido con la proteína *target* (Ballón y Grados, 2019), por otro lado, se tiene la composición de los PI, compuestos principalmente por residuos apolares, polares, básicos y ácidos (en ese orden de cantidad porcentual). Si bien con *Peptiderive* podemos obtener diferentes péptidos y podemos obtener un *score* para revisar que tan bien se unen a un *target*, no podemos con exactitud que pose muestran en su unión a la proteína *target*, con esto comprobamos la necesidad de utilizar *docking* molecular.

Tabla 11. Secuencias de los PI candidatos

Largo (aa) PI candidatos	Secuencia
10	DGCVPLNIIP
11	DGCVPLNIIPL
12	DGCVPLNIIPLT
13	DGCVPLNIIPLTT
14	**NAR**DGCVPLNIIPL
15	VPLNIIPLTT**AAKLM**

A partir del acoplamiento molecular realizado por *Flexpepdock,* se obtuvo que los mejores dos candidatos fueron el de 13 y 15 aminoácidos, a pesar de que en la realización de péptidos se tenía que los mejores dos eran el de 14 y 15, con esto se entiende que, el largo del péptido no es lo más relevante, sino que es más

importante la composición de este. Todos los residuos están compuestos por prácticamente la misma secuencia, menos el de 14 y 15 aminoácidos, lo cual otorga al PI de 15 aa a ser mucho más hidrofóbico y por ende, un mejor candidato, por otro lado, esta diferencia da un residuo polar y otro básico a la secuencia de 14 aminoácidos, haciendo que esta no se una tan bien como las otras al sector de intersección con la proteína *target.*

Gracias al *docking* molecular, se obtuvo dos péptidos candidatos, de 13 y 15 residuos, si bien se mutó ambos péptidos para encontrar una posible mutación que entregara una mejor interacción con la proteína que el péptido original, mediante *Alanine Scanning Method* las optimizaciones realizadas en el PI 15 WT fueron perjudiciales para el péptido debido al alto porcentaje de residuos hidrofóbicos (se hablara más adelante), por otro lado, las mutaciones del PI de 13 aminoácidos presentaron mejoras en la interacción y afinidad con la proteína.

Inicialmente se encontró mejoras con la mutación de ácido aspártico por ácido glutámico, se entiende que haya más interacciones debido a que Glu tiene una composición más larga que Asp (dicha mejora ocurre tanto en 13 MUT1 como en 13 MUT2). Por otro lado, el reemplazo de la primera isoleucina del péptido (DGCVPLNIIPLTT —> EGCVPLNFIPLTT) por fenilalanina genera nuevas interacciones y la pérdida de otras ya existentes. Finalmente se realizó la mutación del segundo residuo de isoleucina del péptido (EGCVPLNFIPLTT —> EGCVPLNFYPLTT) lo cual genera enlaces mucho más estables entre residuos que previamente no interactúan.

La razón que se encontró detrás de esta mejora en la afinidad fue el reemplazo de residuos apolares de cadena simple (isoleucina) por dos aminoácidos apolares hidrofóbicos con un anillo aromático (fenilalanina y tirosina), el anillo aromático brinda mejores y más interacciones posibles, lo que se puede ver con la obtención de un enlace pi-catión entre Lys 330 (proteína) y Tyr 939 (péptido), el cual junto con otras interacciones entre dos residuos hidrofóbicos generan una

energía de afinidad más negativa, es decir, mejor con respecto a 13 WT y 13 MUT1 (DGCVPLNIIPLTT y EGCVPLNFIPLTT, respectivamente). La tirosina es un residuo altamente relevante, ya que sus propiedades fisicoquímicas hacen que sea el aminoácido más efectivo para mediar reconocimiento molecular (Koide y Sidhu, 2009).

En cambio, el proceso de optimización del PI de 15 WT no genera una mejor afinidad por el *target*. Esto se debe a que el candidato de 15 residuos (VPLNIIPLTTAAKLM) tiene un porcentaje de residuos hidrofóbicos mayor que el de 13 aminoácidos (DGCVPLNIIPLTT), siendo un 73,3% de su composición hidrofóbica en comparación con un 69,2% de PI 13 WT. Generalmente los péptidos con mayor cantidad de residuos hidrofóbicos son más estables que los con una menor cantidad (Malleshappa Gowder *et al*., 2014).

Los resultados progresivos de *docking* molecular muestran interacciones entre target y PIs, las cuales con la simulación de dinámica molecular ya no están presentes. Este es el caso de las interacciones entre los residuos de la proteína *target* y el PI Leu 385- Phe 938, Ser 382- Thr 942 y Pro 321- Asn 937, presente cuando en el *docking* molecular, pero luego se pierden en la simulación de dinámica molecular, por otro lado, hay interacciones que aparecen luego de realizar como es el caso de la interacción entre His 345- Pro 935 y Pro 320- Phe 938. Lo anterior entrega la relevancia de utilizar la simulación de dinámica molecular para complementar y obtener resultados más fidedignos.

Finalmente, con los resultados de MM/GBSA queda claro que existe tendencia en el péptido de 13 aminoácidos a que mientras más residuos hidrofóbicos y aromáticos hay en el péptido interferente mejor será su interacción con la proteína *target*. En cambio, el fragmento nativo de 15 aminoácidos muestra una energía de afinidad menor, es decir, menos negativa que el fragmento nativo de 13 aminoácidos, lo se debe a que hay gran cantidad de interacciones que se van perdiendo, podemos ver que en 13 WT hay solo 4 interacciones que tienen un

alto porcentaje de unión en un inicio el cual se ve reducido significativamente (más de 20%) en los últimos 50 ns de la simulación, en cambio en 15 WT hay 11 interacciones que tienen alto nivel de interacción entre proteína y péptido, las cuales se reducen notablemente en los últimos 50 ns de la simulación. Es decir, hay una menor perdida de interacciones en 13 WT, 13 MUT1 y 13 MUT2 que en 15 WT y se generan más interacciones con enlaces más estables, entre residuos apolares hidrofóbicos y enlaces pi-catión entre residuos básicos de la proteína *target* y los residuos mutados aromáticos de péptido 13 MUT2.

Finalmente, con los resultados de MM/GBSA se demostró que una mayor longitud y grado de hidrofobicidad del péptido interferente no garantiza una mejor afinidad por *target*, como se comprobó para el péptido de 15 WT, que era más largo e hidrofóbico pero resultó tener menor afinidad que el péptido 13 MUT2.
Se entiende que lo anterior se debe a que el péptido de 15 WT aminoácidos, que no se logró mutar debido a que su cantidad de residuos hidrofóbicos hacía que fuese altamente estable, presenta una pérdida de interacciones alta (11), como se observó al final de los 500 ns de simulación molecular, dejando de tener interacciones entre residuos apolares principalmente con Met 945 (Leu 385- Met 945 y Ala 398- Met 945).
Por otro lado, el péptido interferente 13 MUT2 mostró la pérdida de muy pocas interacciones (3) durante la simulación, promoviendo nuevas interacciones mucho más estables debido a la incorporación de las mutaciones antes señaladas (Asp por Glu, Ile por Phe, Ile por Tyr), siendo estas interacciones cargadas Lys 330- Tyr 939, Arg 329- Glu 931 e interacciones entre residuos apolares (Leu 268- Phe 938 y Ala 381- Tyr 939). Además, el péptido 13 MUT2 es más hidrofílico que el 15 WT y por tanto más fácil de sintetizar pensando en una futura aplicación experimental.

8. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados presentados anteriormente, se puede decir que la hipótesis se comprueba dado que el péptido de 13 aminoácidos nativo si mejora su afinidad cuando se realizaron mutaciones por residuos con anillos aromáticos, por otro lado, no existe esta correlación en el péptido nativo de 15 aminoácidos.

Por ende, en un futuro se espera replicar la metodología propuesta en este trabajo con una gama más amplia de péptidos. Con el fin de demostrar que la extensión e hidrofobicidad de un péptido no necesariamente lo convertirán en la opción óptima para ser un interferente, sino que es esencial evaluar también las interacciones entre el mismo péptido y la proteína *target*. A partir de dicha evaluación se podría avanzar de las técnicas *in sílico* hacia pruebas *in vitro*, con el objetivo de desarrollar eventualmente una terapia alternativa.

Aún es necesario enfrentar numerosos desafíos en la búsqueda de un mecanismo innovador y efectivo contra los virus pertenecientes a la familia *Coronaviridae*. En nuestra propuesta, sugerimos utilizar como blanco las proteínas no estructurales del virus, dado que poseen menores tasas de mutación en comparación con las proteínas estructurales, que requieren actualizaciones constantes debido a sus mutaciones. El trabajo realizado podría marcar el comienzo de un proceso para diseñar nuevos péptidos interferentes dirigidos a blancos terapéuticos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdool-Karim, S.S. y Devnarain, N. (2022). Time to Stop Using Ineffective Covid-19 Drugs. *The New England Journal of Medicine* 387: 654-655. [doi: 10.1056/NEJMe2209017]

Agarwal, S. y Mehrota, R. (2016). An overview of Molecular Docking. *JSM Chemistry* 4(2): 1024. [Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/303897563_Mini_Review_An_overview_of_Molecular_Docking]

Airtècnics (s.f.) Wellisair vs Coronavirus - COVID-19. [Recuperado de: https://www.airtecnics.com/es/tecnologia/wellisair-vs-coronavirus-covid-19]

Aleebrahim-Dehkordi, E., Ghoshouni, H., Koochaki, P., Esmaili-Dehkordi, M., Aleebrahim, E., Chichagi, F., Jafari, A., Hanaei, S., Heidari-Soureshjani, E. y Rezaei, N. (2023). Targeting the vital non-structural proteins (NSP12, NSP7, NSP8 and NSP3) from SARS-CoV-2 and inhibition of RNA polymerase by natural bioactive compound naringenin as a promising drug candidate against COVID-19. *Journal of Molecular Structure* 1287(135642): 1-14. [doi: https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135642]

Allen, M.P. (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins* 23(1): 1-28. [Recuperado de: https://dasher.wustl.edu/chem430/readings/md-intro-2.pdf]

Amicone, M., Borges, V., Alves, M.J., Isidro, J., Zé-Zé, L., Duarte, S., Vieira, L., Guiomar, R., Gomes, J.P. y Gordo, I. (2022). Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evolution, Medicine, and Public Health* 10(1): 142-155. [doi: https://doi.org/10.1093/emph/eoac010]

Arandia-Guzmán, J. y Antezana-Llaveta, G. (2020). SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gaceta Médica Boliviana* 43(2): 170-178. [Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662020000200009]

Armiento, V., Spanopoulou, A. y Kapurniotu, A. (2019). Peptide-Based Molecular Strategies to Interfere with Protein Misfolding, Aggregation, and Cell Degeneration. *Angewandte Chemie International Edition* 59: 3372-3384. [doi: https://doi.org/10.1002/anie.201906908]

Ballón Paucara, W.G. y Grados Torres, R.E. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA* 7(2): 55-72. [Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006]

Barlow, K.A., Conchúir, S.Ó., Thompson, S., Suresh, P., Lucas, J.E., Heinonen, M. y Kortemme, T. (2018). Flez ddG: Rosetta Ensamble-Based Estimation of Changes in Protein-Protein Binding Affinity Upon Mutation. *The Journal of Physical Chemistry B* 122(21): 5389-5399. [doi: 10.1021/acs.jpcb.7b11367]

Bastardas, M.R. (2009). *Estructura y función de los transportadores de aminoácidos* (Tesis de grado). Universidad de Barcelona. Barcelona.

Blazer, L.L. y Neubig, R.R. (2009). Small molecule protein-protein interaction inhibitors as CNS therapeutic agents: current progress and future hurdles. *Neuropsychopharmacology* 34: 126-141. [doi: https://doi.org/10.1038/npp.2008.151]

Bradshaw, R.T., Patel, B.H., Tate, E.W., Leatherbarrow, R.J. y Gould, I.R. (2011). Comparing experimental and computational alanine scanning techniques for probing a prototypical protein–protein interaction. *Protein Engineering, Design and Selection* 24(1-2): 197-207. [doi: https://doi.org/10.1093/protein/gzq047]

Brooks, B.R., Brooks III C.L.,MacKerell, A.D., Nilsson, Jr.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., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R.W., Post, C.B., Pu, J.Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R.M., Woodcock, H.L., Wu, X., Yang, W., York, D.M. y Karplus, M. (2009). CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry* 30(10): 1545-1614. [doi: https://doi.org/10.1002/jcc.21287]

Bruzzoni-Giovanelli, H., Alezra, V., Wolff, N., Dong, C.Z., Tuffery, P. y Rebollo, A. (2018). Interfering peptides targeting protein–protein interactions: the next generation of drugs?. *Drug Discovery Today* 23(2): 272-285. [doi: https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.10.016]

Ciemny, M., Kurcinski, M., Kamel, K., Kolinski, A., Alam, N., Schueler-Furman, O. y Kmiecik, S. (2018). Protein-peptide docking: opportunities and challenges. *Drug Discovery Today* 23(8): 1530-1537. [doi: https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006]

Chen, J., Wang, Q., Malone, B., Llewellyn, E*.,* Pechersky, Y., Maruthi, K., Eng, E.T., Perry, J.K., Campbell, E.A., Shaw, D.E. y Darst, S.A. (2022). Ensemble cryo-EM reveals conformational states of the nsp13 helicase in the SARS-CoV-2 helicase replication–transcription complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 29: 250-260. [doi: https://doi.org/10.1038/s41594-022-00734-6]

Cheng, A.C., Coleman, R.G., Smyth, K.T., Cao, Q., Soulard, P., Caffrey, D.R., Salzberg, A.C. y Huang, E.S. (2007) Structure-based maximal affinity model predicts small- molecule druggability. *Nature Biotechnology* 25: 71-75. [doi: https://doi.org/10.1038/nbt1273]

Creech, C.B., Walker, S.C. y Samuels, R.J. (2021). SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA* 325(13): 1318-1320. [doi: 10.1001/jama.2021.3199]

Damodaran, S., Parkin, K. y Fennema, O.R. (2008). Amino Acids, Peptides, and Proteins. En ***Fennema's*** *Food Chemistry* (Fourth edition). pp 219-323. CRC Press. [*Recuperado de*: https://books.google.cl/books?hl=en&lr=&id=tEfMBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA217&dq=types+of+bonds+between+amino+acids&ots=0ZgEvS0mEG&sig=vmlP1obIbNAx2PtjG5PqSKmTu24&redir_esc=y#v=onepage&q=types%20of%20bonds%20between%20amino%20acids&f=false]

Dias, R. y de Acevedo Jr, W.F. (2008). Molecular Docking Algorithms, Current Drug Targets. *Current Drug Targets* 9(12): 1040-1047. [doi: https://dx.doi.org/10.2174/138945008786949432]

Díaz-Armas, M.T., Sánchez-Artigas, R., Matute-Crespo, T.Z. y Llumiquinga-Achi, R.A. (2021). Proteína de la espícula del virus SARS-CoV-2 y su relación con la enzima convertidor de angiotensina-2. *Revista Información Científica* 100(5): 1-14. [Recuperado de: https://revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/3633]

Díaz-Eufracio, B.I., Naveja, J.J. y Medina-Franco, J.L. (2018). Protein-protein interaction modulators for epigenetic therapies. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 110: 65-84. [doi: https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.06.002]

Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A.F. y Forli, F. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling* 61(8): 3891-3898. [doi: https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203]

Ellert-Miklaszewska, A., Poleszak, K. y Kaminska, B. (2017). Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. *Future Medicinal Chemistry* 9(2): 199-221. [doi: https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0189]

Fan, J., Fu, A. y Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology* 7: 83-89. [*Recuperado de*: https://link.springer.com/article/10.1007/s40484-019-0172-y#citeas]

Frenkel, D. y Smith, B. (2001). Molecular Dynamics Simulation. En *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications* (Academic Press). pp 63-107. Elsevier Science. [*Recuperado de:* https://www.google.cl/books/edition/Understanding_Molecular_Simulation/5qTzldS9ROIC?hl=en&gbpv=1]

Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T.,

Hua, T., Zhang, B., Yang, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Xu, W., Guddat, L.K., Wang, Q., Lou, Z. y Rao, Z. (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID.19 virus. *Science* 368(6492): 779-782. [doi: 10.1126/science.abb7498]

Genheden, S. y Ryde, U. (2010). How to obtain statistically coverged MM/GBSA results. *Journal of Computational Chemistry* 31(4): 837-846. [doi: 10.1002/jcc.21366]

Godschalk, F., Genheden, S., Söderhjelm, P. y Ryde, U. (2013). Comparison of MM/GBSA calculations based on explicit and implicit solvent simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15(20): 7731-7739. [doi: https://doi.org/10.1039/C3CP00116D]

Guedes, I.A., de Magalhães, C.S. y Dardenne, L.E. (2014). Receptor-Ligand Molecular Docking. *Biophysical Reviews* 6(1): 75-87. [doi: 10.1007/s12551-013-0130-2]

Hashemi, Z.S., Zarei, M., Fath, M.K., Ganji, M., Farahani, M.S., Afsharnouri, F., Pourzardosht, N., Khalesi, B., Jahangiri, A., Rahbar, M.R. y Khalili, S. (2021). *In silico* Approaches for the Design and Optimization of Interfering Peptides Against Protein-Protein Interactions. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8: 1-25. [doi: https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.669431]

Hollingsworth, S.A. y Dror, R.O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* 99(6): 1129-1143. [doi: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011]

Huey, R., Morris, G.M. y Forli, S. (2012). Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory. pp 7-18. California. Estados Unidos.

Ivanov, A.A., Khuri, F.R. y Fu, H. (2013). Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends in Pharmacological Science* 34(7): 393-400. [doi: 10.1016/j.tips.2013.04.007]

Jo, S., Kim, T., Iyer, V.G. y Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry* 29(11): 1859-1865. [doi: https://doi.org/10.1002/jcc.20945]

John Hopkins Center for Health Security. (2020). Genética del SARS-CoV-2. Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Buenos Aires. [Recuperado de: http://colbiosa.com.ar/wp-content/uploads/2020/05/Documento-72-GENETICA-DEL-SARS-COV-2.pdf]

John Hopkins University. (n.d.). Coronavirus (COVID-19)- Última Situación. TRT. [Recuperado de: https://www.trt.net.tr/espanol/covid19]

Jordan, R.A., El-Manzalawy, Y., Dobbs, D. y Honavar, V. (2012). Predicting protein-protein interface residues using local surface structural similarity. *BMC Bioinformatics* 13(41): 1-14. [doi: https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-41]

Kapoor, S., Singh, A. y Gupta, V. (2023). *In silico* evaluation of potencial intervention against SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 129(103350): 1-8. [doi: https://doi.org/10.1016/j.pce.2022.103350]

Khan, Z., Terrien, E., Delhommel, F., Lefebvre-Omar, C., Bohl, D., Vitry, S., Bernard, C., Ramirez, J., Chaffotte, A., Ricquier, K., Vincentelli, R., Buc, H., Prehaud, C., Wolff, N. y Lafon, M. (2019). Structure-based optimization of a PDZ-binding motif within a viral peptide stimulates neurite outgrowth. *Journal of Biological Chemistry* 294(37): 13755-13768. [doi: https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008238]

Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R. y Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 935-949. [doi: https://doi.org/10.1038/nrd1549]

Koide, S. Sidhu, S.S. (2009). The Importance of Being Tyrosine: Lessons in Molecular Recognition from Minimalist Synthetic Binding Proteins. *ACS Chemical Biology* 4(5): 325-334. [doi: https://doi.org/10.1021/cb800314v]

Kundrotas, P.J., Zhu, Z., Janin, J. y Vasker, I.A. (2012). Templates are available to model nearly all complexes of structurally characterized proteins. *PNAS* 109(24): 9438-9441. [doi: https://doi.org/10.1073/pnas.1200678109]

Lara-Barragán Gómez, A. (2011). Un modelo de enseñanza neuropedagógico de las Leyes de Newton para la Net Gen. *Latin American Journal of Physics Education* 5(2): 526-536. [Recuperado de: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3696086]

Leach, A.R. (1996). Molecular dynamics simulation methods. En Molecular Modelling: Principles and Applications. pp: 313-370. Longman.

Lee, J., Cheng, X., Swails, J.M., Yeom, M.S., Eastman, P.K., Lemkul, J.A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J.C., Qi, Y., Jo, S., Pande, VS., Case, D.A., Brooks III, C.L., MacKerell A.D., Klauda, Jr.J.B. y Im, W. (2016). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation* 12(1): 405-413. [doi: https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935]

Lee, J., Hitzenberger, M., Rieger, M., Kern, N.R., Zacharias, M. y Im, W. (2020). CHARMM-GUI supports the Amber force fields. *Journal of Chemical Physics* 153: 1-9. [doi: https://doi.org/10.1063/5.0012280]

Lengyel, J., Hnath, E., Storms, M. y Wohlfarth, T. (2014). Towards an integrative structural biology approach: combining Cryo-TEM, X-ray crystallography, and NMR. *Journal of Structural and Functional Genomics* 15: 117-124. [doi: https://doi.org/10.1007/s10969-014-9179-9]

Li, J. (2005). Basic Molecular Dynamics. En *Handbook of Materials Modeling* (Yip, S., eds). pp 565-588. Ohio. Estados Unidos.

López, M.J. y Mohiuddin, S.S. (2023). Biochemistry, Essential Amino Acids. En *StatPearls* (StatPearls Publishing). [Recuperado de: https://europepmc.org/article/NBK/nbk557845#free-full-text]

London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G. y Schueler-Furman, O. (2011). Rosetta FlexPepDock web server - high resolution modeling of peptide-protein interaction. *Nucleic Acids* 39: 249-253. [doi: https://doi.org/10.1093/nar/gkr431]

London, N., Raveh, B., Movshovitz-Attias, D., Sadan, Y., Marcu, O. y Schueler-Furman, O. (2018). PeptiDerive application. Rosettacommons. [Recuperado de: https://www.rosettacommons.org/docs/latest/application_documentation/analysis/PeptiDerive]

London, N., Raveh, B., Movshovitz-Attiaz, D. y Schueler-Furman, O. (2010). Can self-inhibitory peptides be derived from the interfaces of globular protein-protein interactions?. *Proteins* 78(15): 3140-3149. [doi: 10.1002/prot.22785]

Lozano Jiménez, Y.Y., Sánchez Mora, R.M. y Giraldo Quintero, S.E. (2020). Potenciales estrategias terapéuticas basadas en péptidos para mitigar la infección por SARS-CoV-2. *Nova* 18(35): 59-64. [doi: https://doi.org/10.22490/24629448.4187]

Lu, H., Zhou, Q., He, J., Jiang, Z., Peng, C., Tong, R. y Shi, J. (2020). Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5: 1-23. [doi: https://doi.org/10.1038/s41392-020-00315-3]

Lyskov, S., Chou, F.C., Conchúir S.Ó., Der, B.S., Drew, K., Kuroda, D., Xu, J., Weitzner, B.D., Renfrew, P.D., Sripakdeevong, P., Borgo, B., Havranek, J.J., Kuhlman, B., Kortemme, T., Bonneau, R., Gray, J.J. y Das, R. (2013). Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE). *PLoS One* 8(5): 1-11. [doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063906]

Malleshappa Gowder, S., Chatterjee, J., Chaudhuri, T. y Paul, K. (2014). Prediction and Analysis of Surface Hydrophobic Residues in Tertiary Structure of Proteins. *The Scientific World Journal* 2014(971258): 1-7. [doi: https://doi.org/10.1155/2014/971258]

Mirza, M.U. y Froeyen, M. (2020). Structural elucidation of SARS-CoV-2 vital proteins: Computational methods reveal potential drug candidates against main

protease, Nsp12 polymerase and Nsp13 helicase. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 10(4): 320-328. [doi: https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.04.008]

Moreira, I.S., Fernandes, P.A. y Ramos, M.J. (2007). Computational alanine scanning mutagenesis — an improved methodological approach. *Journal of Computational Chemistry* 28(3): 644-654. [doi: https://doi.org/10.1002/jcc.20566]

Moreira, I.S., Fernandes, P.A. y Ramos, M.J. (2007). Hot spots— A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* 68(4): 803-812. [doi: https://doi.org/10.1002/prot.21396]

Mutlu, O., Uğurel, O.M., Sariyer, E., Ata, O., Inci, T.G., Uğurel, E., Kocer, S. y Turgut-Balik, D. (2022). Targeting SARS-CoV-2 Nsp12/Nsp8 interaction interface with approved and investigational drugs: an in silico structure-based approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 40(2): 918-930. [doi: 10.1080/07391102.2020.1819882]

Newman, J.A., Douangamath, A., Yadzani, S., Yosaatmadja, Y., Aimon, A., Brandão-Neto, J., Dunnett, L., Gorrie-Stone, T., Skyner, R., Fearon, D., Schapira, M., von Delft, F. y Gileadi, O. (2021). Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase. *Nature Communication* 12: 1-11. [doi: https://doi.org/10.1038/s41467-021-25166-6]

Nooren, I.M.A. y Thornton, J.M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal* 22(14): 3486-3492. [doi: https://doi.org/10.1093/emboj/cdg359]

Olazabal Mancilla, K. (2023). *Variaciones de aminoácidos de la proteína spike de SARS-CoV-2 secuenciados en América del Sur* (Tesis de grado). Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo. Chiclayo.

Orús, A. (2023). COVID-19: número de muertes por país en 2023. Statista. [Recuperado de: https://es.statista.com/estadisticas/1095779/numero-de-muertes-causadas-por-el-coronavirus-de-wuhan-por-pais/]

Pagadala, N.S., Syed, K. y Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Review* 9: 91-102. [doi: 10.1007/s12551-016-0247-1]

Pastrian-Soto, G. (2020). Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2): mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune. *International Journal of Odontostomatology* 14(3): 331-337. [doi: http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331]

Patel, S., Hasan, H., Umraliya, D., Reddy Sanapalli, B.K. y Yele, V. (2023). Marine drugs as putative inhibitors against non-structural proteins of SARS-CoV-2: an *in silico* study. *Journal of Molecular Modeling* 29(176): 1-16. [doi: https://doi.org/10.1007/s00894-023-05574-9]

Patodia, S., Bagaria, A. y Chopra, D. (2014). Molecular Dynamics Simulation of Proteins: A Brief Overview. *Journal of Physical Chemistry and Biophysics* 4(6): 1-4. [doi: 10.4172/2161-0398.1000166]

Pérez-Abeledo, M. y Sanz Moreno, J.C. (2021). Variantes de SARS-CoV-2, una historia todavía inacabada. *Vacunas* 22(3): 173-179. [doi: 10.1016/j.vacun.2021.06.003]

Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. y Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal* 8(12): 3874-3874. [doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08565.x]

Porter, K.A., Desta, I., Kozakov, D. y Vajda, S. (2019). What method to use for protein-protein docking?. *Current Opinion in Structural Biology* 55: 1-7. [doi: https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.010]

Porter, K.A., Xia, B., Beglov, D., Bohnuud, T., Alam, N., Schueler-Furman, O. y Kozakov, D. (2017). ClusPro PeptiDock: efficient global docking of peptide recognition motifs using FFT. *Bioinformatics* 33(20): 3299-3301. [doi: 10.1093/bioinformatics/btx216]

Prieto, P.B. (s.f.) Los 10 tipos de aminoácidos (y sus características). médico+. [Recuperado de: https://medicoplus.com/medicina-general/tipos-aminoacidos]

Raveh, B., London, N. y Schueler-Furman, O. (2010). Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins. *Proteins* 78: 2029-2040. [doi: 10.1002/prot.22716]

Raveh, B., London, N., Zimmerman, L. y Schueler-Furman, O. (2011). Rosetta FlexPepDock ab-initio: Simultaneous Folding, Docking and Refinement of Peptides onto Their Receptors. *PLoS ONE* 6(4): 1-10. [doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018934]

Sacramento, C.Q., Fintelman-Rodrigues, N., Temerozo, J.R., Dias Da Silva, A.P., Gomes Dias, S.S., dos Santos da Silva, C., Ferreira, A.C., Mattos, M., Pão, C.R.R., de Freitas, C.S., Cardoso Soares, V., Hoelz, L.V.B., Amorim Fernandes, T.V., Castelo Branco, F.S., Macedo Bastos, M., Boechat, N., Saraiva, F.B., Alves Ferreira, M., Jockusch, S., Wang, X., Tao, C., Chien, M., Xie, W., Patel, D., Garzia, A., Tuschl, T., Russo, J.J., Rajoli, R.K.R., Pedrosa, C.S.G., Vitória, G., Souza, L.R.Q., Goto-Silva, L., Zaluar Guimarães, M., Rehen, S.K., Owen, A., Bozza, F.A., Bou-Habib, D.C., Ju, J., Bozza, P.T. y Souza, T.M.L. (2021). *In vitro* antiviral activity of the anti-HVC drugs daclastasvir and sofosbuvir against SARS-CoV-2, the aetiological agent of COVID-19. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 76(7): 1874-1886. [doi: https://doi.org/10.1093/jac/dkab072]

Salomon-Ferrer, R., Case, D.A. y Walker, R.C. (2013). An overview of the Amber bimolecular simulation package. *WIREs Computational Molecular Science* 3(2): 198-210. [doi: https://doi.org/10.1002/wcms.1121]

Sedan, Y., Marcu, O., Lyskov, S. y Schueler-Furman, O. (2016). Peptiderive server: derive peptide inhibitors from protein-protein interactions. *Nucleic Acids Research* 44(1): 536-541. [doi: 10.1093/nar/gkw385]

Shi, X.D., Sun, K., Hu, R., Liu, X.Y., Hu, Q.M., Sun, X.Y., Yao, B., Sun, N., Hao, J.R., Wei, P., Han, Y. y Gao, C. (2016). Blocking the interaction between EphB2 and ADDLs by a small peptide rescues impaired synaptic plasticity and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 36(47): 11959-11973. [doi: 10.1523/JNEUROSCI.1327-16.2016]

Smith, M.C. y Gestwicki, J.E. (2012). Features of protein-protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 14(16). 1-20. [doi: https://doi.org/10.1017/erm.2012.10]

Sorolla, A., Wang, E., Golden, E., Duffy, C., Henriques, S.T., Redfern, A.D. y Blancafort, P. (2020). Precision medicine by designer interference peptides: applications in oncology and molecular therapeutics. *Oncogene* 39: 1167-1184. [doi: https://doi.org/10.1038/s41388-019-1056-3]

Sprenger, K.G., Jaeger, V.W. y Pfaendtner, J. (2015). The General AMBER Force Field (GAFF) Can Accurately Predict Thermodynamic and Transport Properties of Many Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry B* 119(18): 5882-5895. [doi: doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b00689]

Srinivasa-Rao, V., Sujini, G.N. y Sunand-Kumar, G.N. (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics* 2014: 1-12. [doi: https://doi.org/10.1155/2014/147648]

Stazione, F., Giangreco, I. y Cole, J.C. (2021). Chapter Four- Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry* 60: 273-343. [doi: https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004]

Sulimov, V.B., Kutov, D.C. y Sulimov, A.V. (2019). Advaces in Docking. *Current Medicinal Chemistry* 26(42): 7555-7580. [doi: https://doi.org/10.2174/0929867325666180904115000]

Tao, K., Tzou, P.L., Nouhin, J., Bonilla, H. y Jagannathan, P. (2021). SARS-CoV-2 Antiviral Therapy. *Clinical Microbiology Reviews* 34(4): 1-35. [doi: https://doi.org/10.1128/CMR.00109-21]

Trott, O. y Olson, J.A. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31(2): 455-461. [doi: 10.1002/jcc.21334]

Vidal, M., Cusick, M.E. y Barabási, A.L. (2011). Interactome Networks and Human Disease. *Cell* 144(6): 986-998. [doi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.016]

Vishwanath, S., Sukhwal, A., Sowdhamini, R. Srinivasan, N. (2017). Specificity and stability of transient protein-protein interactions. *Science Direct* 44:77-86. [doi: https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.010]

Wang, E., Sun, H., Wang, J., Wang, Z., Liu, H., Zhang, J.Z.H. y Hou, T. (2019). End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: strategies and applications in drug design. *Chemical Reviews* 119(16): 9478-9508. [doi: https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055]

Yruela, I. y Sebastian, A. (2014). Macromoléculas biológicas: proteínas, DNA y RNA (Biological macromolecules: proteins, DNA and RNA). En *Bioinformática con* Ñ. (Sebastían, A. y A. Pascual García, eds). pp 185-209. [*Recuperado de:* https://digital.csic.es/handle/10261/110165]

10. ANEXO 1

10.1 Mutaciones I938

Se mutó la isoleucina por todos los residuos apolares hidrofóbicos, es decir, valina, leucina, fenilalanina, metionina, tirosina y triptófano. A partir de dichas mutaciones se encontró que la mejor mutación (mayor diferencia en afinidad) era cuando se intercambió el residuo por una fenilalanina (-2,2 kcal/mol), se hace referencia al residuo de isoleucina como el 8 del péptido.

Tabla 12. Mutaciones de I938

Mutación	*Score* (kcal/mol)	Cadena original	Cadena mutada
V	0,6	DGCVPLNIIPLTT	DGCVPLNVIPLTT
L	-0,9	DGCVPLNIIPLTT	DGCVPLNLIPLTT
F	-2,2	DGCVPLNIIPLTT	DGCVPLNFIPLTT
M	-0,2	DGCVPLNIIPLTT	DGCVPLNMIPLTT
Y	-1,3	DGCVPLNIIPLTT	DGCVPLNYIPLTT
W	-1,4	DGCVPLNIIPLTT	DGCVPLNWIPLTT

10.2 Mutaciones en base a I938F

Se mutaron los aminoácidos previamente establecidos como los más relevantes, pero con base en la mutación del aminoácido I938F. Los cambios del aminoácido L936 por los hidrofóbicos correspondientes no presentaron una mejor afinidad, por ende, fue descartada. Por otro lado, la mutación de D931E resultó ser ligeramente más afín que cuando no se encontraba presente la mutación por Phe, por ende, será utilizada para continuar con las mutaciones. Finalmente, el

residuo I939 presentó un cambio en el *score* mayor cuando se reemplazaba de manera I939Y (en presencia de la mutación de fenilalanina), por lo tanto, la mutación de D931E y I939Y serán utilizadas para continuar con la optimización del PI.

En la tabla 6 se puede visualizar el cambio de los otros tres residuos más importantes (D, L e I), donde el intercambio de la I939Y era la mejor opción de mutación con *score* de -0,4 kcal/mol, la optimización de D931E resulto en un *score* de -0,6 kcal/mol y finalmente todos los cambios del residuo de L936X (entiéndase X como todos los residuos hidrofóbicos) resultaron con puntuaciones de afinidad más positivas, siendo la más baja 1,0 kcal/mol. A su vez se observó en la tabla 7 que cuando se mutan los tres residuos (Asp, Ile e Ile), la mejor mutación es la generada por Glu, Phe y Tyr.

Tabla 13. Mutaciones en base a I938F

Residuo	Mutación	*Score* (kcal/mol)	Cadena original	Cadena mutada
D	E	-0,6	DGCVPLNFIPLTT	EGCVPLNFIPLTT
L	M	1,0	DGCVPLNFIPLTT	DGCVPMNFIPLTT
I	Y	-0,4	DGCVPLNFIPLTT	DGCVPLNFYPLTT

Por otro lado, se observa en la figura 26 una visualización de la interacción de residuos de la proteína *target* con el péptido mutado (con F y E), donde se observó que al cambiar los aminoácidos hay interacciones que se mantienen como Leu 385 y Arg 329, por otro, lado se ve que se perdieron las interacciones con Leu 327 y Val 328 y se generaron nuevas interacciones con Leu 387 y Leu 268 (encontrada antes el *docking*), a su vez hay una fuerte interacción con 3 residuos, el ácido glutámico tiene una gran interacción con Arg 329, siendo esta

también su única interacción con la proteína *target*, y también una mayor interacción del residuo de fenilalanina con Leu 385 y Leu 268.

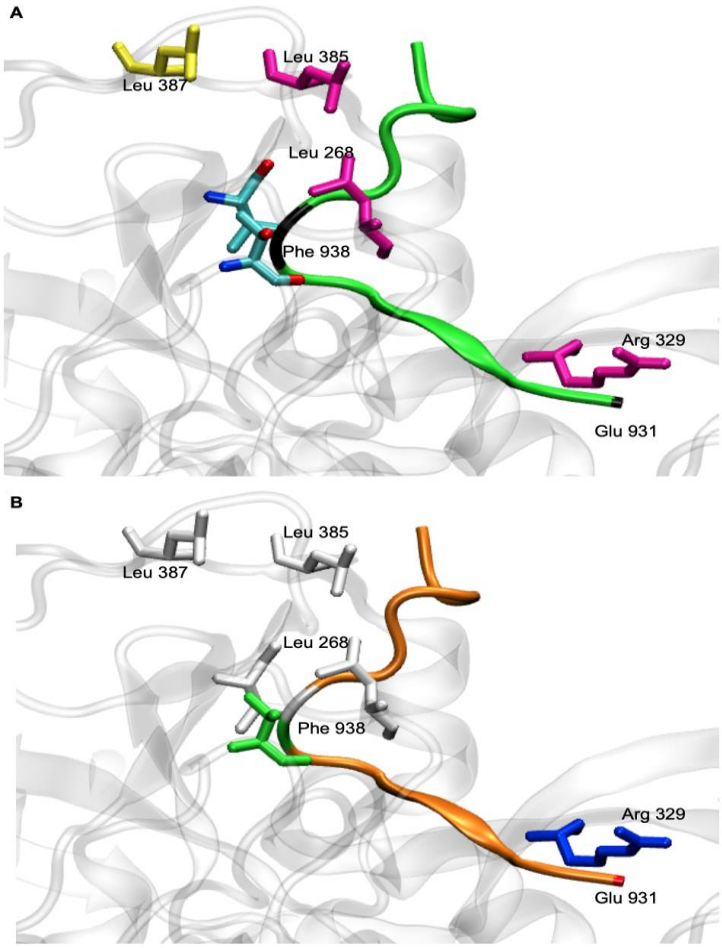


Figura 26. Interacciones entre 13 MUT1 (mutante de dos residuos de 13 WT) y la proteína *target*. Mediante VMD se puede observar las interacciones entre los residuos mutados y Nsp12. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target* y en azul los aminoácidos del péptido. A) En rosado podemos ver los residuos con mayor interacción con el péptido, en amarillo una interacción que no había participado anteriormente, en verde el péptido y en negro los residuos mutados. B) Se pueden observar las mismas interacciones que en A que determinando el tipo de aminoácidos presentes, donde verde es polar, blanco es apolar, azul es básico y rojo es ácido.

A su vez, se puede ver en la figura 27 las interacciones obtenidas con la optimización de los tres residuos (D931E; I939F; I938Y) donde se genera una nueva interacción con el aminoácido Lys 330, el cual es un aminoácido de tipo polar y también que existe una gran interacción a 4 Å de distancia (4 o más residuos del péptido interactúan con ellos) en 3 residuos de la proteína *target* (P326, L327 y V328), los tres residuos son de tipo apolar.

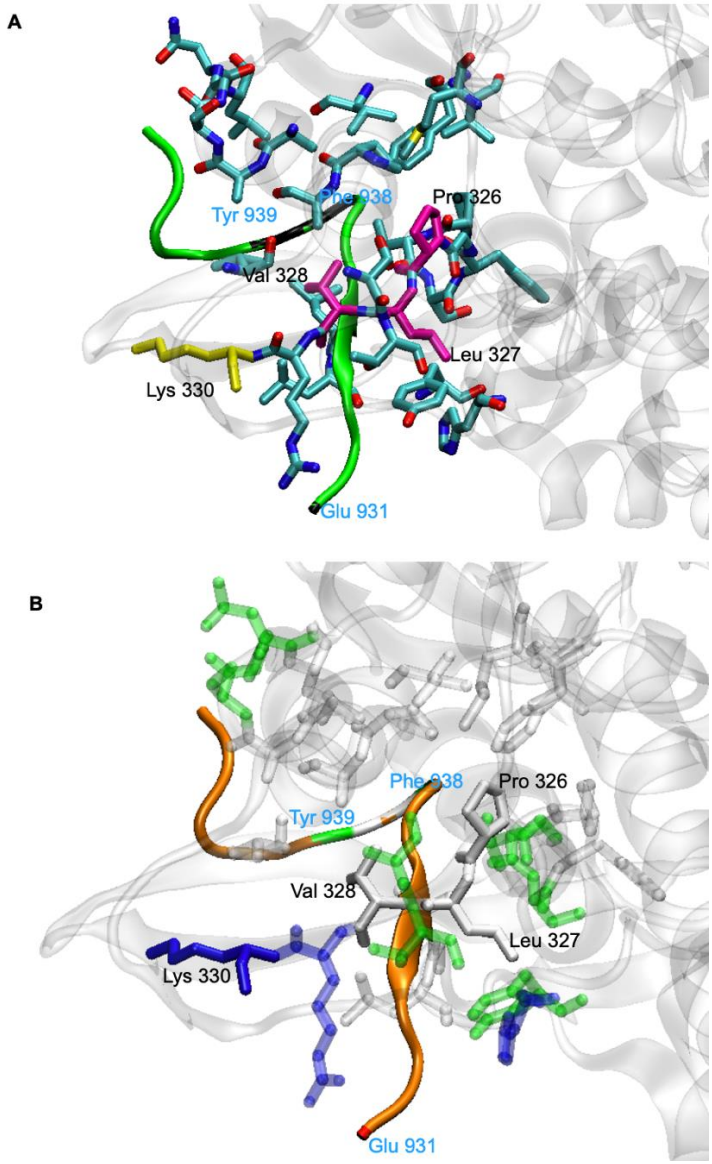


Figura 27. Interacciones entre 13 MUT2 (mutante de 3 residuos 13 WT) y la proteína *target*. Mediante VMD se puede observar las interacciones entre los residuos mutados y Nsp12. De color negro podemos encontrar los residuos pertenecientes a la proteína *target* y en azul los aminoácidos del péptido. A) En rosado podemos ver los residuos con mayor interacción con el péptido, en amarillo una interacción que no había participado anteriormente, en verde el péptido y en negro los residuos mutados. B) Se pueden observar las mismas interacciones que en A que determinando el tipo de aminoácidos presentes, donde verde es polar, blanco es apolar, azul es básico y rojo es ácido.

11. ANEXO 2

En las siguientes tablas se entrega de manera ordenada y detallada la información más relevante obtenida desde los gráficos presentes en la sección 6. Resultados, compilando datos de cercanía e interacción de la proteína *target* Nsp12 y los PI, siendo estos 13 WT, 13 MUT1, 13MUT2 y 15 WT.

11.1 Cercanía e interacción Nsp12- 13 WT

Tabla 14. Cercanía e interacción residuos Nsp12- 13 WT primeros y últimos 50 ns

Residuos Nsp12	Residuos PI primeros 50 ns	Residuos PI últimos 50 ns
L269	Val 934, Pro 935, Ile 938	-
Y271	Cys 933, Val 934, Pro 935	Cys 933, Val 934, Pro 935, Ile 938
T322	Asn 937, Ile 939, Leu 941	Asn 937, Ile 939, Leu 941
S323	Pro 935	Pro 935, Asn 937, Ile 938, Ile 939
L327	Cys 933, Val 934, Pro 935, Leu 936	Cys 933, Val 934, Pro 935, Leu 936
V328	Cys 933, Val 934, Pro 935, Leu 936	Cys 933, Val 934, Pro 935, Leu 936

Se describen las interacciones y cercanías de los 6 residuos de la proteína *target* que más se están relacionando con el péptido candidato 13 WT. Donde se presentan interacciones que generan enlaces covalentes en un inicio y que después no están presentes como L269- V934, L269- P935 y L269- I938, también hay interacciones que generan un enlace covalente que sólo están presentes al final de la simulación (Y271- I938), por otro lado, se ven varías cercanías entre T322 con residuos apolares y S323 con residuos apolares.

Tabla 15. Cercanías e interacciones con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 13 WT

Interacción	Residuo *target*	Residuo péptido	Primeros 50 ns (%)	Últimos 50 ns (%)
L269-V934	L269	V934	94,8	70,6
L269-P935	L269	P935	81,6	9,6
P320-L941	P320	L941	63,4	89,8
T322-N937	T322	N937	93,6	59,6
T322-L941	T322	L941	74,6	99,2
S323-I938	S323	I938	21,4	100,0
H345-P935	H345	P935	0,0	93,8
F394-N937	F394	N937	71,8	91,4

Se ven representadas las columnas más oscuras del gráfico xx (figura x), donde se observan las interacciones con mayor diferencia porcentual entre un inicio y fin, también se observan dos cercanías (T322- L941 y F394- N937) que aumentan el tiempo que está cerca el residuo de la proteína *target* de los residuos del PI.

11.2 Cercanía e interacción Nsp12-13 MUT1

Tabla 16. Cercanías con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 13 MUT1

Interacción	Residuo *target*	Residuo péptido	Primeros 50 ns (%)	Últimos 50 ns (%)
L268-N937	L268	N937	0,0	86,6
T322-F938	T322	F938	99,8	1,0
K330-P940	K330	P940	99,2	21,6
A380-L941	A380	L941	5,8	80,2

Al igual que anteriormente se representan las interacciones y cercanías con mayor diferencia porcentual, observando que la cercanía L268- N937 aumenta drásticamente al final de la simulación, siendo completamente contrario a la cercanía T322- F938 la cual disminuye en gran medida. Por otro lado, se observa que una de las interacciones aumenta (K330- P940), mientras la otra disminuye (A380- L941).

11.3 Cercanía e interacción Nsp12-13 MUT2

Tabla 17. Interacciones con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 13 MUT2

Interacción	Residuo *target*	Residuo péptido	Primeros 50 ns (%)	Últimos 50 ns (%)
T322-F938	T322	F938	99,6	14,0
A380-L941	A380	L941	11,8	98,8
G383-L941	G383	L941	11,2	93,4
N384-L941	N384	L941	11,8	92,0
V396-L941	V396	L941	0,0	85,6
A397-L941	A397	L941	1,0	96,0

La tabla representa nuevamente cercanías e interacciones, pero esta vez del gráfico entre Nsp12 y 13 MUT2, esta vez se puede observar nuevamente que la cercanía entre T322- F938 también ha disminuido drásticamente y, por otro lado, la cercanía de N384- L941 ha aumentado en gran medida. Las interacciones son de tipo apolar, es decir, generan enlaces covalentes los cuales se presentan en mayor medida al final de la simulación.

11.4 Cercanía e interacción Nsp12-15 WT

Tabla 18. Cercanías e interacciones con mayor diferencia porcentual en los primeros y últimos 50 ns en 15 WT

Interacción	Residuo *target*	Residuo péptido	Primeros 50 ns (%)	Últimos 50 ns (%)
L268-T939	L268	T939	81,2	13,4
F324-N934	F324	N934	96,0	26,4
G325-N934	G325	N934	87,4	0,0
A377-I936	A377	I936	35,6	98,8
V673-N934	V673	N934	97,2	3,6

Finalmente se tiene la tabla de cercanías e interacciones entre la proteína *target* y el péptido interferente 15 WT, se aprecia que la mayor parte de estas diferencias porcentuales tan elevadas ocurre en las cercanías de residuos apolares con residuos polares (L268- T939, F324- N934 y V673- N934), por otro lado, se observa que la interacción entre G325 y N934 se pierde al final de la simulación y que se genera una interacción hidrofóbica (A377- I936) que está presente en mayor medida al final de la simulación.