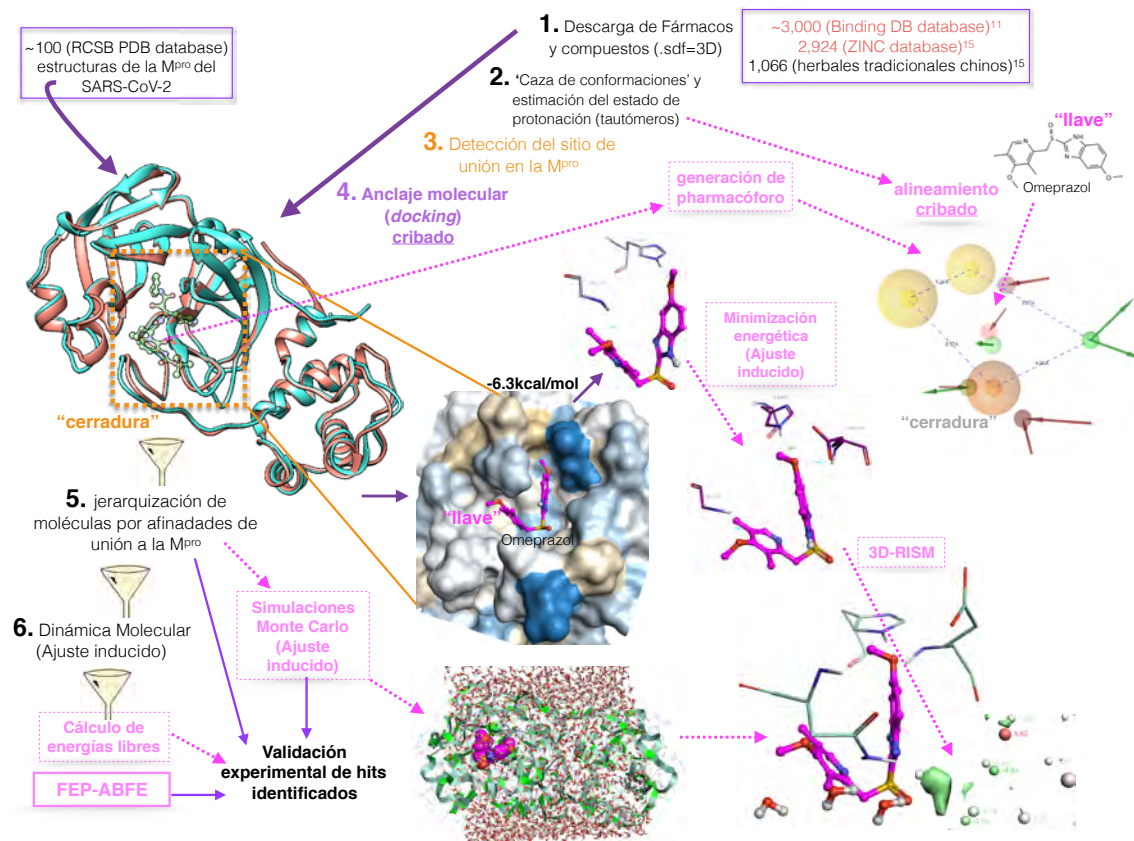


# La forma más inmediata de tratar el **COVID-19**: el reposicionamiento de fármacos.

Métodos computacionales actuales

Ángel A. Islas  
Thomas Scior

Por medio de esfuerzos sin precedentes, la comunidad científica se ha concentrado en el desarrollo de tratamientos, vacunas, medidas precautorias e instrumentos de diagnóstico para la COVID-19, cuyo agente patógeno es el coronavirus SARS-CoV-2. La investigación científica en respuesta ante esta pandemia se refleja en la publicación expedita de cerca de 23,634 artículos especializados e indexados desde el 1 de enero al 30 de junio de 2020 (Teixeira y cols., 2020) y en el número de estudios clínicos a nivel internacional en marcha, que para finales de noviembre de 2020 asciende a 3,987 según ClinicalTrials.gov de la U.S. National Library of Medicine. Aunque la manera más efectiva de proveer protección contra la COVID-19 a largo plazo es el desarrollo de una vacuna, otras medidas son necesarias para su tratamiento inmediato (Calina y cols., 2020), por lo que la reutilización o "reposicionamiento de Fármacos" ya aprobados por instituciones como la FDA (*Food and Drug Administration*) constituye la forma más rápida para desarrollar tratamientos seguros y efectivos contra el SARS-CoV-2. Tales "viejos" fármacos deberán modificar significativamente la actividad de un



**Figura 1.** Pasos del cribado virtual basado en estructura (*structure-based virtual screening*) para el reposicionamiento de fármacos para tratar la COVID-19 y métodos complementarios (en magenta). Las bases de datos públicas ZINC y bindingDB contienen medicamentos aprobados por la FDA (en rojo); en el rectángulo se encuentra el número de fármacos y compuestos naturales de cada base de datos asociados a las referencias.<sup>11,15</sup> (1) Algunas bases de datos contienen una o varias conformaciones ideales 3D que se pueden descargar en archivos de extensión “.sdf”. (2) De todas formas resulta recomendable generar varias conformaciones de baja energía potencial (“caza de conformaciones”) y de las posibles especies químicas (isómeros constitucionales interconvertibles, o tautómeros), de las cuales depende el éxito del *docking*. (3) El sitio activo en este caso se definió a partir de la estructura cristalizada con el inhibidor covalente alfa-ketoamida 13b. El ligando está en verde transparente, la estructura secundaria de dos de las 100 estructuras de la M<sup>pro</sup> del SARS-CoV-2 se ilustran superpuestas, la proteína con el ligando (en estado “holo”) en cian y la proteína sin el ligando (en estado “apo”) en color salmón. (4) El anclaje molecular de miles de fármacos conocidos resulta en la identificación de algunos *hits* (moléculas de puntaje de alta afinidad para la M<sup>pro</sup> como el omeprazol, con un puntaje de -6.3 kilocalorías por mol de soluto). El inserto ilustra la superficie molecular del sitio activo coloreado por lipofiliidad (azul=polar, beige=hidrófobo). (5) Después de clasificar las moléculas, las mejores se simulan en su sitio de unión por (6) dinámicas moleculares y el más costoso cálculo de energías libres estima con mayor precisión los valores experimentales (FEP-ABFE-Cálculo Acelerado de Energía Libre Absoluta basado en Perturbación de Energía Libre). Alternativamente, el cribado se puede llevar a cabo alineando la estructura de los compuestos a un farmacóforo. Este es un mapa abstracto de las interacciones intermoleculares (su volumen, dirección y posición relativa) del alfa-ketoamida 13b con la M<sup>pro</sup>. La simulación de ajuste inducido por minimización energética del omeprazol resultó en la formación de un puente de hidrógeno adicional con otro residuo en el sitio activo. Posterior (o anteriormente) se puede calcular la posición y estabilidad de moléculas de agua (solvente) en el complejo ligando-proteína por el Modelo de Sitio de Referencia de Interacción Tridimensional (3D-RISM) (valores de cambio de energía  $\Delta G$  asociados). La simulación de ajuste inducido semi-automática por el método Monte Carlo con solvente explícito resultó en la formación de una interacción electrostática alternativa, además de dos puentes de hidrógeno y un choque estérico con moléculas de agua.

“blanco molecular” (generalmente una proteína) del que dependa la infección o proliferación de un agente patógeno como el SARS-CoV-2, y poseerán un perfil farmacocinético, farmacodinámico y de bioseguridad suficientemente estudiados y demostrados con anterioridad (Ashburn y Thor, 2004).

#### TRUCOS NUEVOS PARA PERROS VIEJOS:

#### LAS VENTAJAS DEL REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

Las dos principales razones por las que los medicamentos fallan en la clínica son su falta de eficacia frente al placebo y su falta de seguridad (Hughes y cols., 2011); es decir, el desarrollo de daños a la salud a causa de efectos secundarios. Frente a

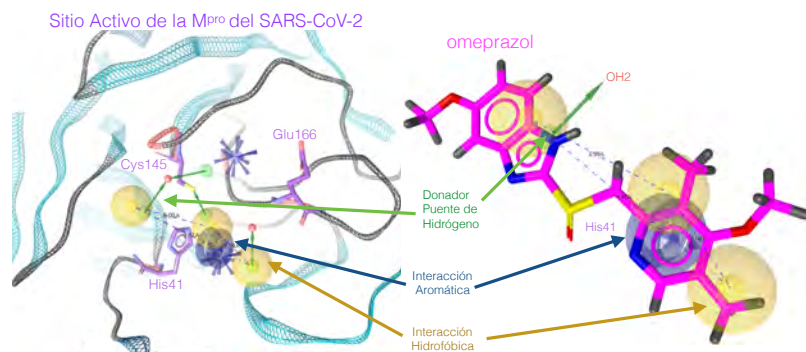
la alta tasa de fracaso, el costo sustancial, la cambiante implementación de regulaciones y el creciente tiempo requerido para el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos, el reposicionamiento de fármacos se está volviendo una estrategia cada vez más atractiva (Hughes y cols., 2011; Pushpakom y cols., 2019). Su principal ventaja es el hecho de tener menos probabilidades de fracasar desde el punto de vista de bioseguridad en ensayos de eficacia posteriores, debido al éxito anterior en modelos preclínicos, al haberse completado estudios en humanos para su aprobación o pre-aprobación. En la mayoría de los casos, para el reposicionamiento de un medicamento ya en el mercado, habrán de omitirse ensayos de: 1) optimización química, 2) toxicología, 3) desarrollo de formulación de fabricación a granel y 4) de desarrollo clínico temprano (Ashburn y Thor, 2004), por lo que la ventana de tiempo desde su descubrimiento hasta su evaluación clínica será significativamente corta y su costo de desarrollo, potencialmente bajo. Típicamente, el proceso de desarrollo de un candidato a reposicionamiento conlleva un ahorro significativo en los costos derivados de ensayos preclínicos y de fase I y II, mientras que los costos regulatorios y de fase III son más o menos los mismos que para un nuevo fármaco (Pushpakom y cols., 2019). Además, dicho proceso para la reutilización de medicamentos toma de 3 a 12 años, mientras que el descubrimiento y desarrollo de *novos* fármacos lleva aproximadamente de 10 a 17 años (Ashburn y Thor, 2004).

#### **MUCHAS LLAVES PARA UNA MISMA CERRADURA:**

##### **EL CRIBADO BASADO EN ESTRUCTURA**

La principal proteasa del SARS-CoV-2, la enzima M<sup>Pro</sup>, siendo responsable del rompimiento de enlaces proteicos de numerosas proteínas virales no estructurales en 11 diferentes sitios, resulta indispensable para la replicación de este virus. Debido al papel esencial que desempeña en el ciclo de vida viral y a su alto nivel de conservación, la M<sup>Pro</sup> constituye un blanco molecular intuitivamente atractivo para el combate del SARS-CoV-2. A raíz

de la primera publicación de la estructura cristalizada de la M<sup>Pro</sup>, el 2 de febrero del 2020 y ahora con más de 100 estructuras depositadas en la base de datos RCSB PDB (Kapusta y cols., 2020), uno de los métodos computacionales actualmente más utilizados para la identificación de fármacos candidatos a reposicionamiento para el tratamiento del COVID-19 es el llamado cribado virtual (*Virtual Screening*) basado-en-estructura. Su objetivo es el de identificar por medio de simulaciones computacionales, moléculas bioactivas de alta potencia, empleando conocimiento acerca del blanco proteico, i.e., su estructura 3D determinada experimentalmente (Scior y cols., 2012). La literatura científica abunda en estudios de cribado virtual basado-en-estructura cuyo blanco es la M<sup>Pro</sup> y en posibles fármacos y compuestos naturales candidatos a reposicionamiento para tratar el COVID-19. Dicho método consiste en la recopilación de espacios químicos por medio de experimentos virtuales de anclaje molecular (o *docking*) de largas librerías de fármacos sobre esta proteína *target* para la identificación de compuestos que posean una propiedad deseada, en este caso la actividad inhibitoria de la M<sup>Pro</sup>, la cual, al interrumpir la manufactura de copias del coronavirus dentro de las células pulmonares, podría frenar la progresión de la enfermedad. Los compuestos (o ligandos) con ese potencial, identificados por tal método se denominan *hits* y el proceso de priorización para su estudio clínico involucra su clasificación jerárquica basada en la predicción de su afinidad de unión molecular con la M<sup>Pro</sup> o su complementariedad con el sitio de unión en dicha proteína. El modelo más sencillo para explicar la unión ligando-proteína es el de “La llave y la cerradura” (o *Lock-and-key binding model*) en el que miles de llaves (los fármacos aprobados), inicialmente manufacturadas para abrir cierto tipo de cerraduras, es decir, para inducir un efecto biológico sobre proteínas humanas o de patógenos, son puestas a prueba para abrir un nuevo tipo de cerradura (la proteína viral del SARS-CoV-2). La llave correcta representa una



**Figura 2.** Farmacóforo de la M<sup>pro</sup> apo (derecha) y una molécula de omeprazol alineada a este (izquierda). Algunos de los aminoácidos que constituyen el sitio catalítico de la M<sup>pro</sup> en morado, la estructura secundaria en cian (hélices alfa y hojas beta) y en negro (las asas) en representación de serpiente. Esta conformación coincide con 5 de las 8 características químicas extraídas de la M<sup>pro</sup> apo como referencia exclusiva (a diferencia del farmacóforo de la Figura 1 de la misma proteína en estado holo).

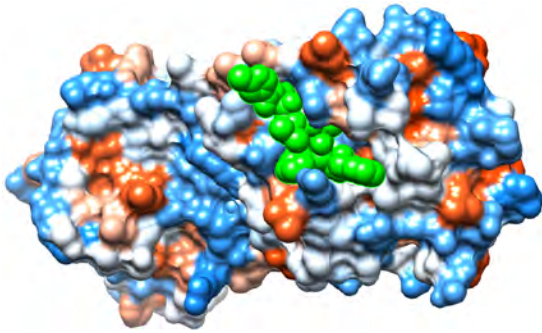
molécula activa, i.e., un *hit*, el cual por medio de difusión o movimiento de sus partículas (soluto) en solución y por la atracción electrostática de largo alcance, colisiona con la cerradura y al embonar, es decir, al llevar a cabo la unión molecular preliminar, permanece en el sitio de unión debido a la complementariedad de su forma y de su campo electrostático el tiempo suficiente para “abrir la cerradura”, o sea, para inducir una respuesta biológica que, en el caso de la M<sup>pro</sup>, sería la inhibición del rompimiento de enlaces proteicos necesarios para la maduración de proteínas del coronavirus.

#### UNO, DOS... SEIS PASOS PARA ELEGIR UN CANDIDATO, RETOS DEL CRIBADO BASADO EN ESTRUCTURA

El cribado virtual basado en estructura consiste en probar miles de medicinas conocidas sobre una o varias cerraduras (el sitio activo de una macromolécula). El sitio activo es la parte de la proteína que lleva a cabo su función y está caracterizado por uno o unos cuantos aminoácidos (o residuos). Dicho proceso computacional (Figura 1) comienza con la descarga de las estructuras químicas de la proteína y de los ligandos desde bases de datos públicas o privadas y la generación de su representación (o representaciones) tridimensional ideal calculando sus propiedades fisicoquímicas esenciales como su forma (conformación o distribución relativa de sus átomos), volumen (tamaño de sus átomos), hidrofiliidad (afinidad al agua), polaridad, estado

de protonación (ubicación de sus hidrógenos) y su carga eléctrica (generalmente a un pH fisiológico). Por lo que una molécula 3D constituye en realidad una matriz multidimensional en el espacio virtual cartesiano. Una vez identificado el sitio preferencial de unión de cada ligando ya sea escaneando computacionalmente toda la macromolécula o por conocimiento previo, se procede al experimento virtual de anclaje molecular (probar la llave en la cerradura). El número de moléculas se reduce a las que posean un cierto rango de afinidad o de puntaje de energía de unión negativo (en unidades de kilocaloría por mol), es decir, aquellas cuya unión (o formación del complejo ligando-proteína) sea termodinámicamente favorable. El desafío, en este sentido, es el de que el algoritmo de puntaje y el investigador distingan las moléculas activas de las inactivas, en este caso, aquellas que bloquearán eficientemente la acción enzimática de la M<sup>pro</sup> en ensayos *in vitro* e *in vivo* posteriores.

Con el fin de agilizar el muestreo de miles de ligandos, la simulación contempla la flexibilidad de estos pero no la de la macromolécula; sin embargo, el estado nativo de la mayoría de las proteínas es en realidad un conjunto de diferentes conformaciones estables (Du y cols., 2016), por lo que es casi indispensable el empleo de métodos *in silico a posteriori* que simulen los cambios conformacionales (locales o globales) resultantes del contacto ligando-proteína. Estas estrategias de modelaje molecular se conocen como “ajuste inducido” debido a que el objetivo es optimizar o refinar el modo de unión del ligando de manera



**Figura 3.** Representación tridimensional de la estructura M<sup>pro</sup>. En el centro se ve el sitio de unión con un ligando con alta afinidad (color verde). La superficie de la molécula viral se ha analizada con un programa de modelado molecular. Se visualizan las propiedades hidrofílicas y hidrofóbicas de los aminoácidos por un código de colores: azul (hidrofílicas) <--> blanco <--> naranja (hidrofóbicas). La cavidad constituye una hendidura no muy profunda pero extendida en la superficie (centro) y está ocupada por un inhibidor de la enzima viral M<sup>pro</sup> (Jin y cols., 2020).

automática, manual o semi-automática, encontrando conformaciones realistas ligando-proteína de menor energía, por ejemplo, al incrementar el número o la fuerza de enlaces no covalentes. Una de estas estrategias de uso cada vez más común son las simulaciones de dinámica molecular (MD) (Islas y cols., 2017). Dado que el cribado por anclaje molecular se realiza usualmente *in vacuo*, es decir sin el solvente, esta posee la ventaja de considerar la participación explícita del medio acuoso simulando tanto los procesos termodinámicamente desfavorables de deshidratación del soluto (ligando) y del sitio de unión, como la posible contribución energéticamente favorable de moléculas de agua para la unión ligando-proteína. Sin embargo, su tiempo de cómputo es significativamente mayor al del *docking*, por lo que resulta prohibitivo su uso para el muestreo preliminar o cribado.

#### MÉTODOS COMPLEMENTARIOS O ALTERNATIVOS EN EL CRIBADO BASADO EN ESTRUCTURA

A continuación se describen brevemente algunas técnicas teóricas utilizadas en el Laboratorio de Simulaciones Computacionales Moleculares de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que enriquecen los modelos de la unión ligando-proteína y hacen más robusto y confiable el cribado virtual. Una de las estrategias más sencillas y menos

costosas para simular el ajuste inducido (del ligando sobre la macromolécula) es la minimización energética, sobre la marcha o *a posteriori* del complejo ligando-proteína. Consiste en optimizar de manera automática o semi-automática la conformación del sitio activo o del ligando y el sitio activo para obtener una solución de unión molecular de menor energía libre, es decir más estable, disminuyendo el número de choques estéricos (sobreposición de volúmenes del ligando y la proteína) y aumentando el número posible de residuos a los que se una el fármaco candidato como se muestra en la Figura 1, donde una molécula de omeprazol en el sitio activo interactúa con 3 residuos *au lieu de 2* antes de la minimización energética, aumentando su afinidad. Una metodología alternativa a las dinámicas moleculares que también puede contemplar las contribuciones del solvente, evaluar y aumentar la estabilidad de los sitios de unión ligando-macromolécula, son las simulaciones tipo Monte Carlo (MC), las cuales muestrean de forma estocástica (al azar) cambios conformacionales del sistema soluto-solvente (esferas rojas = oxígeno, blancas = hidrógeno en la Figura 1), seleccionando conformaciones alternativas de manera iterativa bajo un criterio geométrico-energético. Dentro de estas, el muestreo de ángulos de enlace covalente por “saltos de Boltzmann” permite cambios de energía positiva (*upward jumps*), seguidos de minimización con el fin de explorar de manera más eficiente el paisaje conformacional del sistema. El Modelo de Sitio de Referencia de Interacción Tridimensional (3D-RISM) constituye un acercamiento moderno al proceso de solvatación como método de investigación de la localización y estabilidad de moléculas de agua en una proteína. Conceptualmente es equivalente a correr una simulación de tiempo infinito de dinámica molecular sobre el solvente, para posteriormente extraer la densidad de partículas de este. El resultado es la asignación de valores de energía por análisis termodinámico, a cada partícula de oxígeno o hidrógeno, representando la “felicidad” de cada





molécula de agua putativa en posición relativa al soluto (en escala de colores: verde = muy probable, rojo = improbable, blanco = medio, en la Figura 1).

#### EL FARMACÓFORO: LA SÍNTESIS DE INTERACCIONES QUÍMICAS PARA CRIBAR FÁRMACOS

Previa o alternativamente al *docking* un farmacóforo basado en estructura se puede utilizar para cribar o identificar fármacos y compuestos que cumplan con las características químicas de una proteína o de un ligando de referencia unido a la proteína, previamente cristalizado (cuya estructura ligando-proteína haya sido determinada por medios experimentales). Los farmacóforos constituyen una descripción simplista y abstracta de las interacciones esenciales que ocurren típicamente entre ligandos y macromoléculas *target* (Seidel y cols., 2019). La generación de farmacóforos basados-en-la estructura apo (*i.e.*, proteína sin ligando), puede dar lugar a soluciones de acoplamiento alternativas, como en este caso en el cribado de Omeprazol al farmacóforo calculado

a partir de la M<sup>pro</sup> en estado apo con aguas cristalizadas en el sitio activo (Figura 2).

#### LA ALQUIMIA: ESTADO DEL ARTE PARA COMBATIR LA COVID-19

Con el objetivo de eliminar falsos positivos (moléculas con alto puntaje de afinidad que resultan ser inactivas), es recomendable el cálculo y la jerarquización de energías libres de unión de cada molécula candidata, basado en principios de termodinámica estadística que incluye la energía potencial y la de solvatación. Estos cálculos comúnmente se basan en intensivas computaciones MD o MC y requieren de esfuerzos varios órdenes de magnitud mayores que las funciones de puntaje de *docking* tradicionales, por lo que deben de ser cuantitativamente relacionados con los valores experimentales reales. Uno de los más confiables es el cálculo de tipo “alquímico” (no-físico) implementado por la Perturbación de Energía Libre (*Free Energy Perturbation*, FEP), en donde el ligando unido a la proteína es transmutado “alquímicamente” en una especie química diferente en ciclos termodinámicos para



computar el cambio en energía libre de la transformación (Du y cols., 2016). Sin embargo, el FEP está limitado a simular cambios estructurales menores de ligandos de referencia, para dar como resultado energías libres de unión relativa (*Relative Binding Free Energies*, RBFE), por lo que resulta inadecuado para el cribado virtual de estructuras moleculares completamente diferentes. El novedoso método del Cálculo Acelerado de Energía Libre Absoluta basado en Perturbación de Energía Libre (FEP-ABFE), dado a conocer en septiembre del 2020 para el reposicionamiento de fármacos contra la COVID-19, representa una poderosa alternativa para el cribado virtual de moléculas disímiles. Publicado en la prestigiosa revista científica PNAS, el FEP-ABFE posee una tasa de *hits* validados experimentalmente sin precedente del 60 % (comparado con intentos previos con una tasa de 11.7 %), conduciendo a la identificación exitosa de 15 potentes inhibidores de la M<sup>pro</sup> del SARS-CoV-2 (Li y cols., 2020), entre ellos el omeprazol.

Resulta innegable que la pandemia de COVID-19 ha sido un motor direccional para el desarrollo de protocolos y métodos computacionales para el reposicionamiento de fármacos (para una visión más integral y completa del impacto de COVID-19 léase Salceda, 2020).

## REFERENCIAS

Ashburn TT and Thor KB. (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 3(8): 673-683.

Calina D, Hartung T, Docea AO *et al.* (2020) COVID-19 vaccines: ethical framework concerning human challenge studies. *DARU J Pharm Sci* 28(2):807-812.

Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, Ji XL and Liu SQ (2016) Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci* 17(2):144.

Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB and Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 162(6):1239-1249.

Islas A, Jorgensen C and Salinas S (2017) Drogas del siglo XXI: ketamina, drogas recreativas y dinámicas moleculares. *Elementos* 106:21-26.

Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, Zhang B, Li X, Zhang L, Peng C, Duan Y, Yu J *et al.* (2020) Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 582(7811): 289-293.

Kapusta K, Kar S, Collins JT, Franklin LM, Kolodziejczyk W, Leszczynski J and Hill GA (2020) Protein reliability analysis and virtual screening of natural inhibitors for SARS-CoV-2 main protease (Mpro) through docking, molecular mechanic & dynamic, and ADMET profiling. *J Biomol Struct Dyn* 14:1-18.

Li Z, Li X, Huang YY, Wu Y, Liu R, Zhou L, Lin Y, Wu D, Zhang L, Liu H, Xu X, Yu K, Zhang Y, Cui J, Zhan CG, Wang X and Luo HB (2020). Identify potent SARS-CoV-2 main protease inhibitors via accelerated free energy perturbation-based virtual screening of existing drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 117(44):27381-27387.

Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Williams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D and Pirmohamed M (2019) Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 18(1):41-58.

Salceda E (2020) Algunas lecciones del coronavirus. *Elementos* 120:3-9.

Scior T, Bender A, Tresadern G, Medina-Franco JL, Martínez-Mayorga K, Langer T *et al.* (2012). Recognizing pitfalls in virtual screening: a critical review. *J Chem Inf Model* 52(4):867-881.

Seidel T, Schuetz DA, Garon A and Langer T (2019) The Pharmacophore Concept and Its Applications in Computer-Aided Drug Design. *Prog Chem Org Nat Prod* 110:99-141.

Teixeira da Silva JA, Tsigaris P and Erfanmanesh M (2020) Publishing volumes in major databases related to Covid-19. *Scientometrics* 1-12.

**Ángel A. Islas**  
**Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**  
**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**[2nitrophenyl@gmail.com](mailto:2nitrophenyl@gmail.com)**

**Thomas Scior**  
**Laboratorio de Simulaciones**  
**Computacionales Moleculares**  
**Departamento de Farmacia**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**[tscior@gmail.com](mailto:tscior@gmail.com)**

