

Marco teórico.

La proteína Nsp9 (non-structural protein 9) es una de las varias proteínas no estructurales codificadas por el virus SARS-CoV-2. Esta proteína, junto con otras, es esencial para la replicación y transcripción del ARN viral. Ya que se encarga de la unión a ARN de una sola hebra y desempeña un papel importante en la síntesis de ARN viral. Forma parte del complejo de replicación viral, que es una maquinaria molecular que el virus utiliza para replicar su ARN genómico. La Nsp9 se une al ARN viral y lo ayuda a orientarse para que pueda ser utilizado por las enzimas de la replicación. La Nsp9 también puede tener otros papeles en el ciclo de vida del coronavirus. Algunos estudios han demostrado que la Nsp9 puede suprimir la respuesta inmunitaria del huésped. La Nsp9 es un objetivo potencial para el desarrollo de nuevos antivirales. Las moléculas que se dirigen a la Nsp9 podrían impedir la replicación del virus y ayudar a tratar las infecciones por coronavirus. [1]

Características de la Nsp9: [1]

- Ubicación: La Nsp9 se codifica en el ORF1a del genoma del coronavirus.
- Tamaño: La Nsp9 es una proteína relativamente pequeña, con un tamaño de entre 100 y 120 aminoácidos.
- Estructura: La Nsp9 es una proteína “dimérica”, lo que significa que está formada por dos subunidades idénticas.
- Interacciones: La Nsp9 interactúa con varias otras proteínas virales, así como con algunas proteínas del huésped.

ZINC20 es una base de datos química a gran escala y de acceso gratuito que se utiliza para el descubrimiento de ligandos. Es una de las mayores bases de datos de este tipo, con más de 230 millones de compuestos adquiribles. Estos compuestos proceden de 310 catálogos de 150 empresas. ZINC20 se actualiza continuamente con nuevos compuestos y datos, y ofrece una serie de características que la convierten en una herramienta valiosa para los investigadores que trabajan en el descubrimiento de fármacos y el diseño de materiales. [2]

Algunas de estas características son:

- Búsqueda potente: ZINC20 ofrece una interfaz de búsqueda que permite a los usuarios buscar compuestos por medio de una variedad de criterios, incluyendo la estructura molecular, las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica.
- Visualización de moléculas: ZINC20 proporciona una variedad de herramientas para visualizar moléculas, incluyendo estructuras 2D y 3D, así como mapas de densidad de electrones.
- Descarga de datos: Los usuarios pueden descargar compuestos y datos de ZINC20 en una variedad de formatos, incluyendo SDF, SMILES y PubChem CID.
- API: ZINC20 proporciona una API que permite a los desarrolladores integrar sus aplicaciones con la base de datos.

SwissDock es una plataforma de acoplamiento de proteínas en línea que permite a los usuarios predecir la estructura de complejos proteína-ligando. Es una herramienta valiosa para los investigadores que trabajan en el descubrimiento de fármacos, el diseño de materiales y la biología estructural. SwissDock se basa en el método de acoplamiento por similitud, que predice la estructura de un complejo proteína-ligando, basándose en la estructura de complejos proteína-ligando conocidos. SwissDock utiliza una base de datos de estructuras de complejos proteína-ligando conocida como SuPDock para identificar complejos similares. Para utilizar SwissDock, los usuarios deben proporcionar la estructura de la proteína diana y el ligando que quieren estudiar. SwissDock buscará en la base de datos SuPDock complejos similares y utilizará esta información para predecir la estructura del nuevo complejo. SwissDock también proporciona una serie de herramientas para visualizar y analizar los resultados del acoplamiento. SwissDock es una herramienta fácil de usar y potente que puede ser utilizada por investigadores de todos los niveles de experiencia. Es una herramienta valiosa para una amplia gama de aplicaciones, incluyendo el descubrimiento de fármacos, el diseño de materiales y la biología estructural. [3]

Material y equipo.

Para esta práctica se utilizaron los siguientes materiales y recursos:

- Un equipo con acceso a internet.
- La plataforma de ZINC.
- La plataforma de SwissDock.
- Archivo SMILE de las moléculas obtenidas de la plataforma ZINC.

Desarrollo.

- Se eligieron 3 moléculas pequeñas que han sido identificadas como plomos y se buscaron en la página de ZINC.

1. Valganciclovir (figura 1).

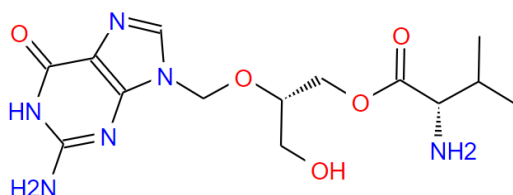


Figura 1. Estructura de la Valganciclovir.

2. Iopromide (figura 2).

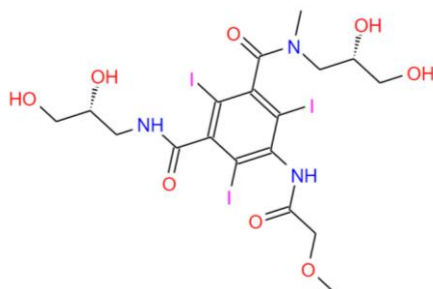


Figura 2. Estructura de la Iopromida.

3. Hesperetin (figura 3).

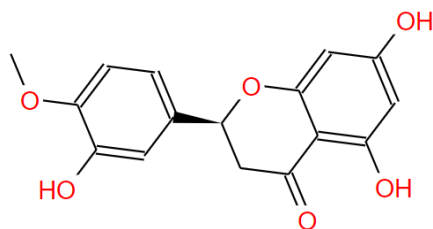


Figura 3. Estructura de la Hesperetina.

- Usando la plataforma SwissDock se realizó un acoplamiento con la proteína Nsp9 y cada una de las moléculas potenciales.

1. Valganciclovir:

Se introdujo la cadena del archivo SMILES de la molécula Valganciclovir para generar el ligando (figura 4).

1 - Submit a ligand

Provide a SMILES

... or upload a Mol2 file

... or input, or modify, or check the molecule **using the sketcher**

... or use the **advanced search**



Prepare ligand

Reset ligand

Figura 4. Generación del ligando por medio de la cadena del archivo SMILES.

Posteriormente se definió la proteína objetivo, así como las cadenas a considerar (figura 5).

2 - Submit a target

Provide a PDB id (e.g. 5hie)

Choose chain(s) to keep*:

Choose heteroatom(s) to keep*:

... or upload a PDB file

... or use the **advanced search**



Prepare target

Reset target

Figura 5. Definición de la proteína objetivo.

Vista del espacio de búsqueda (figura 6).

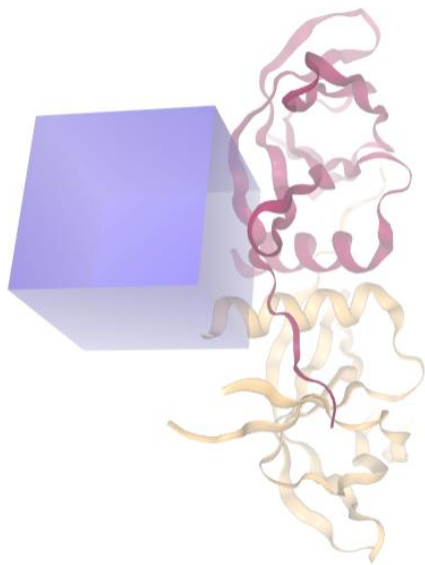






Figura 6. Vista del espacio de búsqueda.


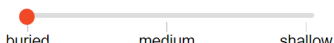
Se definen los parámetros del acoplamiento (figura 7).

4 - Select parameters

Number of RIC  

Hide extra parameters

Sampling exhaustivity  

Cavity prioritization  



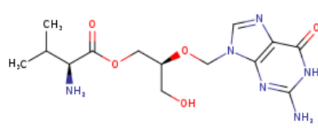
 

Figura 7. Parámetros del acoplamiento.

Una vez completado el acoplamiento se muestra un resumen de la operación (figura 8).

Query			
Ligand	<chem>CC(C)[C@H](N)C(=O)OC[C@H](CO)OCn1cnc2c(=O)[nH]c(N)nc21</chem>		
Target	5ym6_modified.pdb		
Method	Attracting Cavities 2.0		
Date	May 30, 2024, 8:50 pm UTC		
Parameters:			
Box center:	0 - 13 - 45	Sampling exhaustivity:	medium
Box size:	20 - 20 - 20	Cavity prioritization:	buried
Number of RIC: 1			
If you publish these results, please, cite the following papers:			
Bugnon M, Röhrig UF, Goullieux M, Perez MAS, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. <i>Nucleic Acids Res.</i> 2024			
Röhrig UF, Goullieux M, Bugnon M, Zoete V. Attracting Cavities 2.0: improving the flexibility and robustness for small-molecule docking. <i>J. Chem. Inf. Model.</i> , 2023			

Ligand



Σ ⚙️ 🔍 🔄 😊

Figura 8. Resumen del acoplamiento.

Finalmente se muestra la tabla con los grupos con mejor puntaje expresados en unidades de energía, donde un valor más bajo (más negativo) generalmente indica una interacción más fuerte y favorable entre el ligando y la proteína (figura 9).

Cluster number	Cluster member	AC Score	SwissParam Score
0	1	-20.906377	-6.6238
7	1	-13.181771	-6.5284
4	1	-13.775619	-6.5184
9	1	-9.068339	-6.4549
5	1	-13.341386	-6.3248
3	1	-14.497706	-6.1863
1	1	-18.979140	-6.0897
6	1	-13.292561	-5.9876
2	1	-15.473894	-5.9491
8	1	-12.440349	-5.8973

Figura 9. Tabla de los 10 mejores grupos.

Seleccionando un grupo de la tabla, se muestra la molécula plegada a las cadenas de la proteína (figura 10).

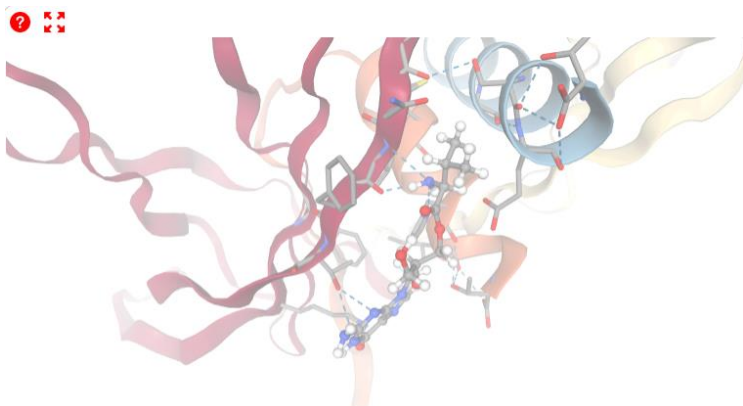


Figura 10. Grafica 3D con la molécula Valganciclovir plegada sobre la proteína Nsp9.

2. Iopromide:

Se introdujo la cadena del archivo SMILES de la molécula Iopromide para generar el ligando (figura 11).

1 - Submit a ligand

Provide a SMILES

... or upload a Mol2 file

... or input, or modify, or check the molecule using the **sketcher**

... or use the **advanced search**

✓

Figura 11. Generación del ligando por medio de la cadena del archivo SMILES.

Posteriormente se definió la proteína objetivo, así como las cadenas a considerar (figura 12).

2 - Submit a target

Provide a PDB id (e.g. 5hie)

Choose chain(s) to keep*:

Choose heteroatom(s) to keep*:

... or upload a PDB file

... or use the **advanced search**

✓

Figura 12. Definición de la proteína objetivo.

Vista del espacio de búsqueda (figura 13).

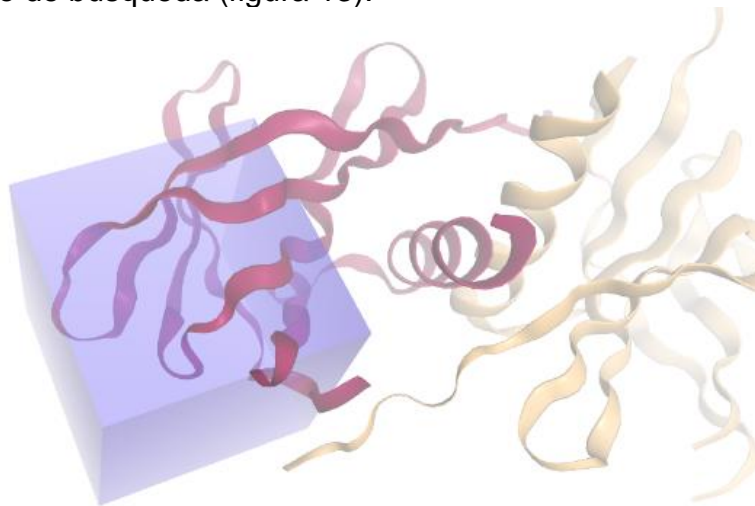


Figura 13. Vista del espacio de búsqueda.

Se definen los parámetros del acoplamiento (figura 14).

4 - Select parameters

Number of RIC

Hide extra parameters

Sampling exhaustivity

Cavity prioritization

✓

Figura 14. Parámetros del acoplamiento.

Una vez completado el acoplamiento se muestra un resumen de la operación (figura 15).

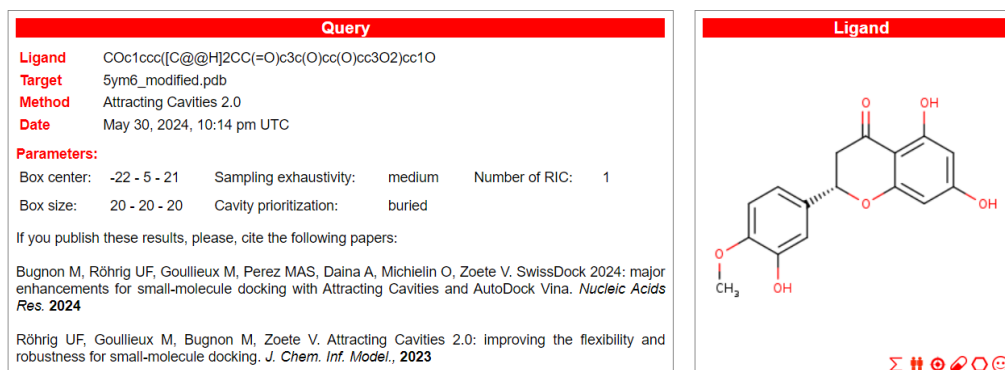


Figura 15. Resumen del acoplamiento.

Se muestra la tabla con los grupos con mejor puntaje donde el valor más negativo indica una interacción más fuerte y favorable entre el ligando y la proteína (figura 16).

Cluster number	Cluster member	AC Score	SwissParam Score
0	1	0.607923	-5.3222
1	1	1.253763	-5.2661
2	1	1.818109	-5.9730
3	1	1.832646	-5.2125
4	1	1.840822	-5.7897
5	1	2.191317	-5.6059
6	1	3.282330	-5.8338
7	1	3.513092	-5.8744
8	1	4.170971	-5.0747
9	1	5.631056	-5.3577

Figura 16. Tabla de los 10 mejores grupos.

Seleccionando el primer grupo de la tabla, se muestra la molécula plegada a las cadenas de la proteína (figura 17).

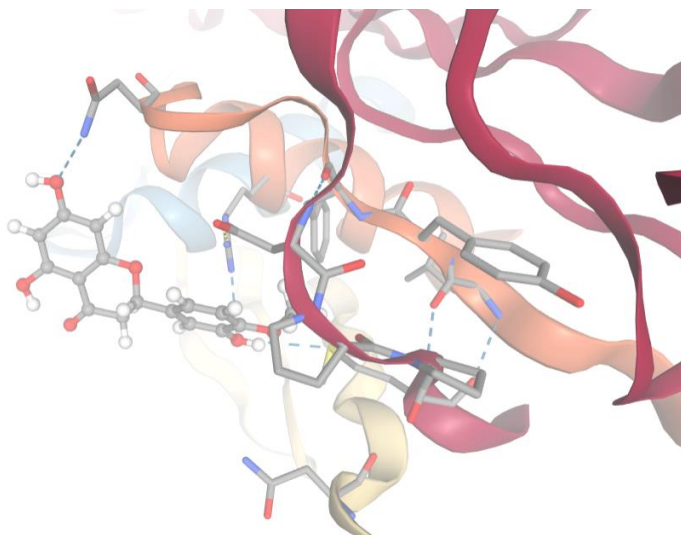


Figura 17. Grafica 3D con la molécula Iopromida plegada sobre la proteína Nsp9.

3. Hesperetina:

Se introdujo la cadena del archivo SMILES de la molécula “Hesperetin” para generar el ligando (figura 18).

1 - Submit a ligand

Provide a SMILES

... or upload a Mol2 file

... or input, or modify, or check the molecule **using the sketcher**

... or use the **advanced search**

✓

Figura 18. Generación del ligando por medio de la cadena del archivo SMILES.

Posteriormente se definió la proteína objetivo, así como las cadenas a considerar (figura 19).

2 - Submit a target

Provide a PDB id (e.g. 5hie)

Choose chain(s) to keep*:

Choose heteroatom(s) to keep*:

... or upload a PDB file

... or use the **advanced search**

✓

Figura 19. Definición de la proteína objetivo.

Vista del espacio de búsqueda (figura 20).

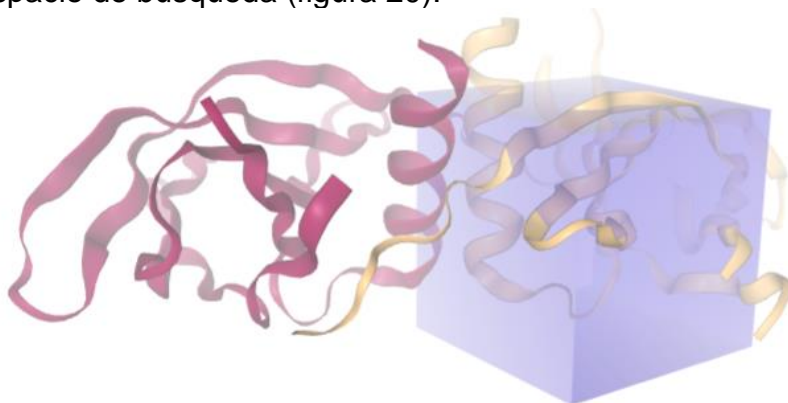


Figura 20. Vista del espacio de búsqueda.

Se definen los parámetros del acoplamiento (figura 21).

4 - Select parameters

Number of RIC ?

Hide extra parameters

Sampling exhaustivity ?

Cavity prioritization ?

☒ ?

Figura 21. Parámetros del acoplamiento.

Una vez completado el acoplamiento se muestra un resumen de la operación (figura 22).

Query

Ligand COCC(=O)Nc1c(l)c(C(=O)NC[C@@H](O)CO)c(l)c(C(=O)N(C)C[C@H](O)CO)c1...

Target 5ym6_modified.pdb

Method Attracting Cavities 2.0

Date May 30, 2024, 10:33 pm UTC

Parameters:

Box center: 9 - -7 - 25 Sampling exhaustivity: medium Number of RIC: 1

Box size: 20 - 20 - 20 Cavity prioritization: buried

If you publish these results, please, cite the following papers:

Bugnon M, Röhrig UF, Goullieux M, Perez MAS, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. *Nucleic Acids Res.* 2024

Röhrig UF, Goullieux M, Bugnon M, Zoete V. Attracting Cavities 2.0: improving the flexibility and robustness for small-molecule docking. *J. Chem. Inf. Model.*, 2023

Ligand

Σ

Figura 22. Resumen del acoplamiento.

Se muestra la tabla con los grupos con mejor puntaje donde el valor más negativo indica una interacción más fuerte y favorable entre el ligando y la proteína (figura 23).

Cluster number	Cluster member	AC Score	SwissParam Score
0	1	62.991551	-6.5128
1	1	68.678652	-6.6787
2	1	70.621843	-6.0176
3	1	70.703967	-6.4120
4	1	71.295276	-5.9351
5	1	72.111485	-5.5930
6	1	72.269701	-6.2177
7	1	72.513621	-6.4990
8	1	73.357082	-5.7273
9	1	73.876692	-5.6751

Figura 23. Tabla de los 10 mejores grupos.

Seleccionando el primer grupo de la tabla, se muestra la molécula plegada a las cadenas de la proteína (figura 24).

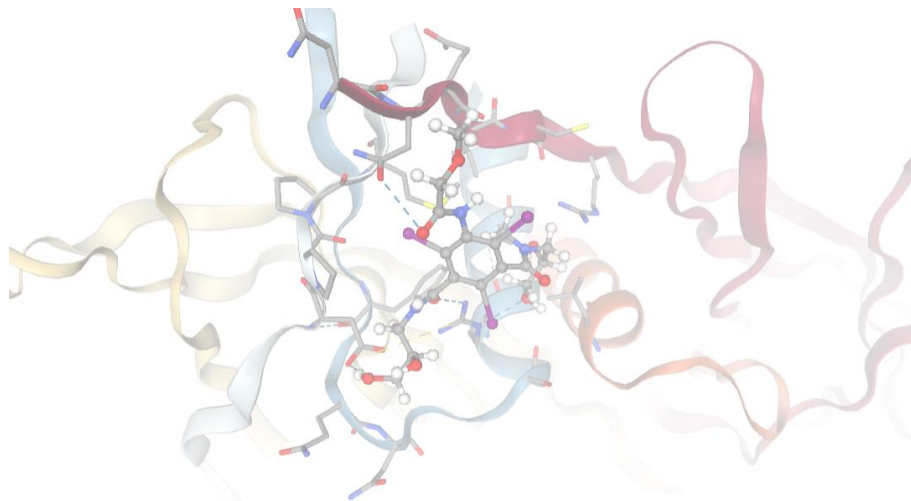


Figura 24. Grafica 3D con la molécula Hesperetina plegada sobre la proteína Nsp9.

- Se eligió un “líder” basado en el mejor puntaje de los 3 anteriores y se buscó en ZINC una molécula similar para utilizarla en otro acoplamiento (figura 25).

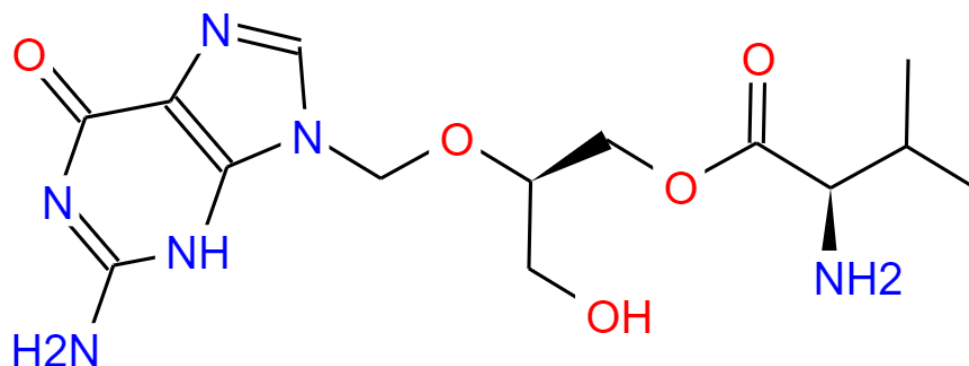


Figura 25. Molécula similar al Valganciclovir.

Se introduce la cadena SMILE en la plataforma de SwissDock (figura 26).

1 - Submit a ligand

Provide a SMILES

... or upload a Mol2 file

... or input, or modify, or check the molecule **using the sketcher**

... or use the **advanced search**

Figura 26. Generación del ligando por medio de la cadena del archivo SMILES.

Posteriormente se definió la proteína objetivo, así como las cadenas a considerar (figura 27).

2 - Submit a target

Provide a PDB id (e.g. 5hie)

Choose chain(s) to keep*:

Choose heteroatom(s) to keep*:

... or upload a PDB file

... or use the **advanced search**

✓

Figura 27. Definición de la proteína objetivo.

Vista del espacio de búsqueda (figura 28).

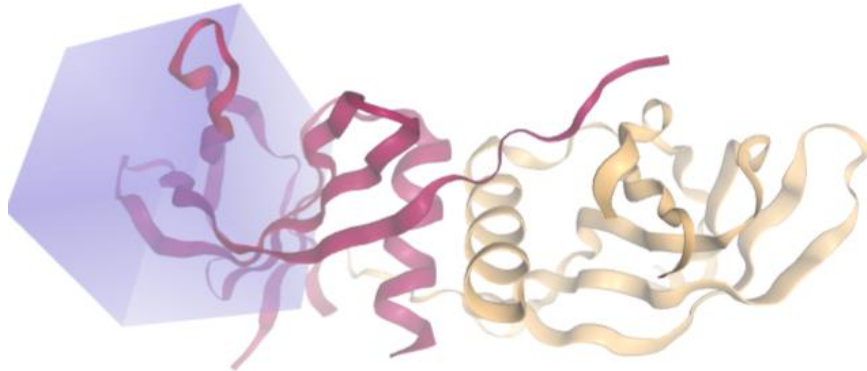


Figura 28. Vista del espacio de búsqueda.

Se definen los parámetros del acoplamiento (figura 29).

4 - Select parameters

Number of RIC ⓘ

Hide extra parameters

Sampling exhaustivity ⓘ

Cavity prioritization ⓘ

✓ ⓘ

Figura 29. Parámetros del acoplamiento.

Una vez completado el acoplamiento se muestra un resumen de la operación (figura 30).

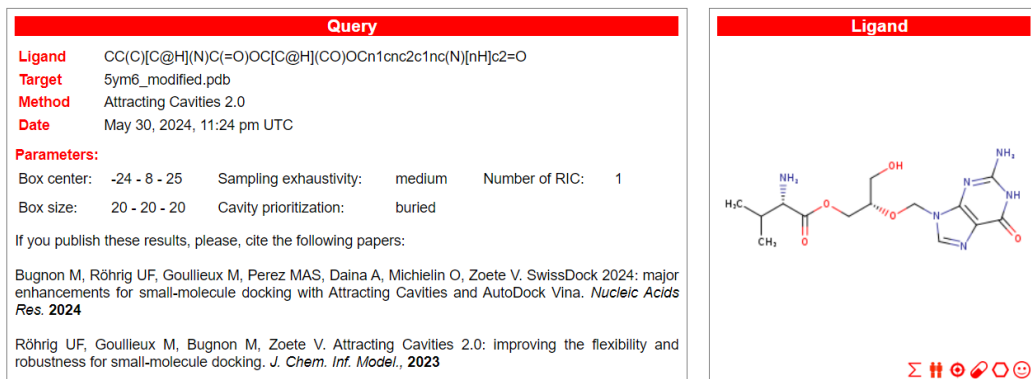


Figura 30. Resumen del acoplamiento.

Se muestra la tabla con los grupos con mejor puntaje (figura 31).

Cluster number	Cluster member	AC Score	SwissParam Score
0	1	-17.898709	-6.4172
1	1	-16.388538	-6.3267
2	1	-15.071562	-6.0482
3	1	-14.756931	-5.8931
4	1	-14.012292	-5.9723
5	1	-13.648105	-5.7026
6	1	-13.515124	-6.2268
7	1	-12.802876	-5.9290
8	1	-12.331496	-6.5465
9	1	-12.089476	-6.3963

Figura 31. Tabla de los 10 mejores grupos.

Seleccionando un grupo de la tabla, se muestra la molécula plegada a las cadenas de la proteína (figura 32).

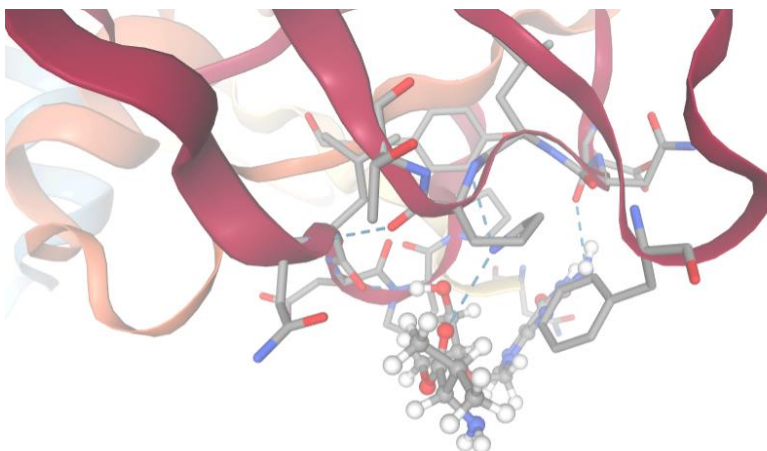


Figura 32. Grafica 3D con la molécula similar a la Valganciclovir plegada sobre la proteína Nsp9.

Se comparan los puntajes de cada plegamiento (figura 33 a 36).

AC Score	SwissParam Score
-20.906377	-6.6238
-13.181771	-6.5284
-13.775619	-6.5184
-9.068339	-6.4549
-13.341386	-6.3248
-14.497706	-6.1863
-18.979140	-6.0897
-13.292561	-5.9876
-15.473894	-5.9491
-12.440349	-5.8973

Figura 33. Puntajes del plegamiento de la molécula Valganciclovir.

AC Score	SwissParam Score
0.607923	-5.3222
1.253763	-5.2661
1.818109	-5.9730
1.832646	-5.2125
1.840822	-5.7897
2.191317	-5.6059
3.282330	-5.8338
3.513092	-5.8744
4.170971	-5.0747
5.631056	-5.3577

Figura 34. Puntajes del plegamiento de la molécula lopromide.

AC Score	SwissParam Score
62.991551	-6.5128
68.678652	-6.6787
70.621843	-6.0176
70.703967	-6.4120
71.295276	-5.9351
72.111485	-5.5930
72.269701	-6.2177
72.513621	-6.4990
73.357082	-5.7273
73.876692	-5.6751

Figura 35. Puntajes del plegamiento de la molécula Hesperetin.

AC Score	SwissParam Score
-17.898709	-6.4172
-16.388538	-6.3267
-15.071562	-6.0482
-14.756931	-5.8931
-14.012292	-5.9723
-13.648105	-5.7026
-13.515124	-6.2268
-12.802876	-5.9290
-12.331496	-6.5465
-12.089476	-6.3963

Figura 36. Puntajes del plegamiento de la molécula similar a la Valganciclovir.

Como se pudo observar muchos de estos compuestos se acoplan bastante bien en la proteína Nsp9 con un margen de error relativamente pequeño. En este caso el mejor puntaje lo obtuvo el ligando del compuesto Valganciclovir incluso por debajo de su variante con un -20.9063 y -6.6238. Lo que significa que este compuesto se acopla mejor a la proteína Nsp9 del virus SARS-CoV-2.

Conclusiones.

Las herramientas como ZINC y SwissDock proporcionan un marco de trabajo para la creación de fármacos asistida por computadora además de otras herramientas para la búsqueda de compuestos con características similares complementándose con PDB o Uniprot.

La creación de fármacos es un proceso riguroso que toma alrededor de 10 años en comercializarse ya que requiere de múltiples pruebas en distintos organismos que compartan similitudes con el ser humano, no obstante, el uso de herramientas tecnológicas como las utilizadas en esta práctica facilitan el análisis y la simulación de distintos comportamientos como el plegamiento de compuestos orgánicos con las proteínas.

Referencias.

- [1] Zhong, Yali Wang, Qiqi Wang, Yang Xu, Mingxue Li, Xingzhou Li, Mengzhu Zheng, Lixia Chen, Hua Li, "Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods". *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volume 10, Issue 5, 2020, Pages 766-788, ISSN 2211-3835, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>.
- [2] Irwin, Tang, Young, Dandarchuluun, Wong, Khurelbaatar, Moroz, Mayfield, Sayle, J. *Chem. Inf. Model* 2020, in press. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.0c00675>.
- [3] Bugnon M, Röhrig UF, Goullieux M, Perez MAS, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. *Nucleic Acids Res.* 2024 (*Web Server issue*), gkae300.