

Susceptibility analysis of mutations that confer resistance to inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (M^{Pro}) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)

Análisis de susceptibilidad a mutaciones que confieren resistencia a inhibidores de las enzimas proteasa principal (M^{Pro}) y ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) del SARS-CoV-2

Daysi Espín-Sánchez^{1,2†}, Carolina Vizueta-Rubio^{2†}, Karen Jaramillo-Guapisaca^{2†}, María L. Ramos-Aristimbay², Andrés S. Sánchez-Vaca², Fernanda Chico-Terán^{2, 3}, Liliana Cerda-Mejía^{2*}, Mario D. García^{2*}

ORCID: Daysi Espín-Sánchez: 0000-0001-9696-3570; Carolina Vizueta-Rubio: 0000-0002-5164-4119; Karen Jaramillo-Guapisaca: 0000-0002-0543-5543; María L. Ramos-Aristimbay: 0000-0003-0802-1853; Andrés S. Sánchez-Vaca: 0000-0002-7722-7161; Fernanda Chico-Terán: 0000-0003-2828-1919; Liliana Cerda-Mejía: 0000-0002-5207-1869 ; Mario D. García: 0000-0001-8378-7475

ABSTRACT

Enormous efforts have been made worldwide to generate therapeutic options to prevent the transmissibility of the SARS-CoV-2 and reduce its replication in humans. Currently, the emergence of new variants of the virus is of great concern because the evolution of the viral genome and the inherent mutations introduced in the viral proteins could decrease the effectiveness of the first line therapeutic agents used to prevent and treat COVID-19. The present study evaluated the susceptibility of two important pharmacological drug targets of SARS-CoV-2, the major protease (M^{Pro}) and the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), to suffer point mutations that could produce resistance to inhibitors of these enzymes. The results showed that the residues that contour the inhibitor binding site in RdRp are extremely conserved between the different RNA virus species. This suggests the RdRp enzyme has a low probability to suffer mutation that could confer resistance to therapeutic drugs, such as Remdesivir, an FDA approved compound to treat COVID-19. In contrast, we observed that the M^{Pro} enzyme could undergo up to ten-point mutations in the active site, which is the binding site of several experimental drugs under development, such as Carmofur and N3. Molecular docking analysis showed that the presence of single point mutations in the M^{Pro} active site produces an increase in the binding affinity of carmofur, probably due to the small size and high flexibility of this

Recibido 09 de diciembre de 2022 Aceptado 23 de diciembre de 2022

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP, CONICET-UNLP), 1900, La Plata, Argentina.

²Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Universidad Técnica de Ambato, 180206, Ambato, Ecuador.

³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Central del Ecuador, 170129, Quito, Ecuador.

† Estos autores contribuyeron de igual forma.

* Autores de correspondencia: la.cerda@uta.edu.ec o md.garcia@uta.edu.ec.

molecule. However, the Pro168Ser and Ala191Val mutations significantly decrease the affinity of N3 binding to M^{pro}, suggesting the possible emergence of resistance to this drug. These results could help to anticipate the effect of different mutations on the way M^{pro} inhibitors bind to the enzyme, and design new inhibitors that address the effect of resistance.

Keywords: SARS-CoV-2, M^{pro}, RdRp, homology, mutations, docking.

RESUMEN

A nivel global se han llevado a cabo enormes esfuerzos para generar opciones terapéuticas que permitan prevenir la transmisibilidad del virus SARS-CoV-2 y disminuir su replicación en el huésped. En la actualidad, el reporte constante de nuevas variantes del virus es causa de grandes preocupaciones debido a que la inclusión de mutaciones en las proteínas virales podría disminuir la efectividad de los agentes terapéuticos encontrados. El presente estudio evaluó, mediante un análisis de homología de secuencia, la susceptibilidad a mutaciones de dos de las principales dianas farmacológicas del SARS-CoV-2, la proteasa principal (M^{pro}) y la ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp). Este análisis permitió determinar que el sitio de unión de inhibidores en RdRp se encuentra extremadamente conservado a través de diferentes especies de virus de ARN, lo que sugiere una baja probabilidad de mutación y surgimiento de resistencia a fármacos, como Remdesivir, que actúan sobre esta diana. Por otra parte, se determinó que M^{pro} podría sufrir hasta diez mutaciones puntuales en el sitio activo, el cual constituye el sitio de unión de los fármacos experimentales, Carmofur y N3. Ensayos de acoplamiento molecular permitieron determinar que la presencia de mutaciones puntuales produce un incremento en la afinidad de Carmofur por la enzima, probablemente debido al pequeño tamaño y elevada flexibilidad de esta molécula. Sin embargo, las mutaciones Pro168Ser y Ala191Val disminuyen significativamente la afinidad de unión de N3 en M^{pro}, lo cual sugiere la posible aparición de resistencias hacia esta droga. Estos resultados permiten anticipar el efecto de diferentes mutaciones en el modo en el que actúan potenciales inhibidores de M^{pro} y así diseñar racionalmente nuevos inhibidores que puedan sobrellevar el efecto de resistencia a estos fármacos.

Palabras clave: SARS-CoV-2, M^{pro}, RdRp, homología, mutaciones, docking.

Recibido 09 de diciembre de 2022 Aceptado 23 de diciembre de 2022

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP, CONICET-UNLP), 1900, La Plata, Argentina.

²Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Universidad Técnica de Ambato, 180206, Ambato, Ecuador.

³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Central del Ecuador, 170129, Quito, Ecuador.

† Estos autores contribuyeron de igual forma.

* Autores de correspondencia: la.cerda@uta.edu.ec o md.garcia@uta.edu.ec.

1. INTRODUCCIÓN

A finales de 2019 emergió en Wuhan-China una enfermedad respiratoria humana desconocida, la cual fue designada más tarde por la OMS como COVID-19 (OMS/OPS, 2020). Se descubrió que esta enfermedad es causada por un nuevo coronavirus identificado como SARS-CoV-2. En Marzo del 2020, la COVID-19 fue declarada pandémica debido a su rápida propagación alrededor de todo el mundo (Gao et al., 2020), mostrando tasas de mortalidad asociada que fluctúan entre 0,1 a más del 25% dependiendo del país (Ahammed et al., 2021). A nivel global, se han realizado enormes esfuerzos para desarrollar una vacuna que permita inmunizar a toda la población o gran parte de ella en el menor tiempo posible y a gran escala. Hasta el momento se cuenta ya con 10 vacunas aprobadas por la OMS (OMS, 2022) que, a pesar de las limitaciones en su administración, han ayudado significativamente a reducir las tasas de contagio. No obstante, además de la prevención de la transmisión del virus, son necesarios agentes terapéuticos que permitan detener el avance de la enfermedad tras su entrada al huésped.

En este contexto, se ha explorado el genoma y biología del SARS-CoV-2 e identificado su ciclo de vida luego de la infección, proceso que involucra varias etapas. Dentro de estas etapas se pueden establecer proteínas estructurales y no estructurales que son potenciales dianas farmacológicas (Guy, DiPaola, Romanelli, & Dutch, 2020) (Gervasoni et al., 2020). Tal es el caso de la proteína de la cápside, mediadora de la primera interacción del virus con el organismo hospedero, y las proteínas de la maquinaria del complejo de replicación/transcripción (RTC). Las enzimas que componen el RTC son procesadas mediante proteasas, con el fin de generar proteínas efectoras funcionales (Pastrian-Soto, 2020), donde destaca la acción proteolítica de M^{pro}. Otro componente clave del RTC es la enzima ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp), responsable de un paso fundamental en el proceso infeccioso, pues cataliza la síntesis de nuevo ARN genómico viral (Gao et al., 2020).

En la actualidad, una de las aproximaciones más prometedoras para desarrollar fármacos contra la COVID-19 es la reutilización de medicamentos que han sido diseñados para tratar otras afecciones. Entre estos compuestos están N3 y Carmofur, inhibidores selectivos de la enzima M^{pro} de virus como el SARS-CoV (Jin, Du, Xu, Deng, Liu, Zhao, Zhang, Li, Zhang, Duan, et al., 2020). Otros compuestos que presentan actividad de inhibición de la M^{pro}, como los antivirales, ritonavir y lopinavir, y los antifúngicos, fuconazol e itraconazol. También se ha ensayado la actividad de varios antinematodos, antiprotozoarios e incluso productos naturales como la curcumina contra M^{pro} (Das, Sarmah, Lyndem, & Singha Roy, 2021). Así mismo, se

ha logrado determinar que la hidroxiclороquina, ritonavir, favipiravir y remdesivir, entre otras moléculas, ejercen algún grado de actividad antiviral sobre la polimerasa RdRp, inhibiendo la replicación del virus (Kumar, Zhi, Mukherji, & Gerth, 2020). Dada la gran amenaza que representa la COVID-19 para la humanidad, la FDA ha autorizado el uso de emergencia de medicamentos como Paxlovid (Nirmatlevir y ritonavir), Molnupiravir, Sotrovimab, Veklury (Remdesivir), Bebtelovimab, Tocilizumab, entre otros, que actúan sobre diferentes targets del virus (Murdock, 2022).

Unas de las principales preocupaciones a las que la comunidad científica se enfrenta hoy en día son las numerosas variantes del SARS-CoV-2 que se han reportado alrededor de todo el mundo. Debido a que tanto vacunas como fármacos actúan sobre dianas específicas del virus, se ha demostrado que las alteraciones en el genoma viral pueden disminuir la efectividad de los agentes terapéuticos (Gadge, Kapare, & Gaikwad, 2022). Además, el uso continuo de ciertos fármacos puede propiciar la selección de variantes del virus resistentes a los fármacos de primera línea contra la COVID-19. Es por esto que es crucial anticipar cuáles serían los efectos de las mutaciones sobre el modo de unión de distintos inhibidores a sus targets. En el presente estudio se evaluó la susceptibilidad a mutaciones que pueden presentar dos de las dianas farmacológicas más relevantes del virus causante de la COVID-19, M^{pro} y RdRp, así como el efecto que podrían tener estas alteraciones sobre la afinidad de inhibidores de estas enzimas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Secuencias nativas de M^{pro} y RdRp del SARS-CoV-2

Las secuencias nativas de las enzimas M^{pro} y RdRp del SARS-CoV-2 fueron obtenidas de la base de datos de UniProt (Consortium, 2019) a partir de la secuencia de la replicasa pp1ab (código P0DTC1), donde M^{pro} corresponde a la región comprendida entre los residuos 3264-3564, mientras que RdRp se encuentra entre las posiciones 4393-5324.

2.2. Análisis de homología de secuencia de M^{pro} y RdRp del SARS-CoV-2

El análisis de homología de secuencia de M^{pro} y RdRp se llevó a cabo mediante la herramienta BLAST de UniProt. Los parámetros de búsqueda se mantuvieron en los valores preestablecidos por defecto, a excepción de la opción “Hits” para la cual se seleccionó 50. Posteriormente se analizaron los datos desplegados de acuerdo con su Score (puntuación de alineamiento) y el porcentaje de identidad de secuencia. Además, se descargaron las secuencias de las enzimas homólogas en formato FASTA para la construcción de alineamientos múltiples.

2.3. Identificación de los residuos que conforman el sitio de unión de inhibidores

Para la identificación de los residuos tanto de M^{pro} como de RdRp que interactúan directamente con inhibidores, se tomaron las estructuras de los complejos M^{pro}-N3 (PDB ID 7BQY) y M^{pro}-Carmofur (PDB ID 7BUY) en el caso de la proteasa, y el complejo RdRp- Remdesivir (PDB ID 7BV2) para la polimerasa. Se analizó las interacciones dadas entre la enzima y su respectivo ligando en un rango de 2.2 a 4.2 Å mediante el software WinCoot (Emsley, Lohkamp, Scott, & Cowtan, 2010). Las ilustraciones se generaron mediante el programa PyMOL (Schrödinger, 2017).

2.4. Alineamiento múltiple de secuencias

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó empleando las secuencias FASTA de las enzimas identificadas en el análisis de homología de M^{pro} y RdRp, ordenadas de forma descendente según el porcentaje de similitud con aquellas del SARS-CoV-2. El alineamiento múltiple de secuencias se construyó mediante la herramienta T-Coffee (Di Tommaso et al., 2011). En cada alineamiento se marcaron los residuos que intervienen en la unión de inhibidores con la finalidad de establecer las posibles sustituciones que podrían ocurrir de forma natural y que se consideran plausibles ya que generan enzimas catalíticamente activas y funcionales en organismos homólogos.

2.5. Establecimiento de potenciales mutaciones en la enzima M^{pro} del SARS-CoV-2

Dado el alto grado de conservación de la RdRp, en el presente estudio se consideró irrelevante el modelamiento de mutaciones para esta enzima. Considerando que las mutaciones puntuales son más comunes en la replicación de los virus (Sanjuán, Nebot, Chirico, Mansky, & Belshaw, 2010), en el caso de M^{pro} se realizó un análisis del ADN complementario que codifica para la proteasa con el fin de identificar aquellas mutaciones que podrían ocurrir en la enzima tomando en cuenta únicamente aquellas que se producirían por la sustitución de un nucleótido.

2.6. Construcción de modelos tridimensionales de las variantes mutantes de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2

Una vez identificadas las potenciales mutaciones puntuales que podrían ocurrir de forma natural en la proteasa M^{pro}, se construyeron modelos tridimensionales de la enzima tomando como punto de partida su estructura nativa (PDB ID 6YB7). Los modelos tridimensionales de las variantes mutantes se construyeron con el programa WinCoot y posteriormente se utilizó

el servidor YASARA (Land & Humble, 2018) para minimizar la energía de la estructura luego del cambio artificial producido en la secuencia.

2.7. Acoplamiento molecular

Para determinar la resistencia a inhibidores en las variantes mutantes de la enzima, se llevaron a cabo ensayos de acoplamiento molecular (docking) mediante el programa GOLD - Protein Ligand Docking Software (Jones, Willett, Glen, Leach, & Taylor, 1997). Se empleó la estructura de la proteasa M^{pro} en ausencia de ligandos (PDB ID: 6YB7) y las variantes mutantes de la enzima construidas en el presente estudio. El docking de los inhibidores Carmofur y N3 se realizó en el sitio activo de enzima, considerando que estos se unen covalentemente al residuo catalítico Cys145. Adicionalmente, para el docking se eliminaron las moléculas de agua e hidrógenos. Los resultados de los experimentos de docking se analizaron mediante la función CHEMPLP de GOLD. Así mismo, se establecieron las interacciones proteína-inhibidor de los mejores resultados mediante el servidor Arpeggio (Jubb et al., 2017). Finalmente, se construyeron ilustraciones en PyMOL.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de homología de M^{pro} y RdRp del SARS-CoV-2

Producto del análisis de la estructura primaria de las enzimas M^{pro} y RdRp del SARS-CoV-2, mediante la herramienta BLAST, se logró determinar su homología con proteínas de diferentes organismos. Para la enzima M^{pro} se obtuvieron un total de 23 resultados (Tabla Suplementaria 1). El porcentaje de identidad de las enzimas homólogas se encuentra en un rango de entre el 49,7 a 96,1%, lo cual sugiere que M^{pro} del SARS-CoV-2 mantiene un alto grado de conservación con otras proteasas de coronavirus. Los resultados indican que los coronavirus de murciélago y SARS-CoV presentan el mayor grado de identidad de secuencia, lo cual se correlaciona con la hipótesis de que estos organismos mantienen un ancestro en común con el SARS-CoV-2 (Bzówka et al., 2020). Por otra parte, para la enzima polimerasa se identificaron cuarenta y ocho secuencias que presentaron una identidad entre el 60.4 y 96.4% (Tabla Suplementaria 1). La enzima RdRp del virus SARS-CoV y varias polimerasas de coronavirus de murciélago muestran los valores más altos de identidad de secuencia, similar a lo observado para M^{pro}. Estos resultados fueron esperados, ya que los virus SARS-CoV y SARS-CoV-2 pertenecen al mismo género (*Betacoronavirus*) (Patrian, 2020). Sin embargo, al igual que para

la enzima de M^{pro}, los resultados también revelan que varias especies de coronavirus que infectan animales (murciélago y varios murinos) presentan una estrecha relación con el SARS-CoV-2 (Xiaolu Tang, 2020).

3.2. Identificación de los residuos que conforman el sitio de unión de inhibidores en M^{pro} y RdRp

Se analizaron las interacciones que se producen entre los inhibidores Carmofur y N3, en el caso de M^{pro}, y Remdesivir, en el caso de la RdRp. Carmofur es un derivado de 5-fluorouracilo y fármacos antitumorales aprobados. Su estructura cristalina en complejo con M^{pro} muestra que el compuesto modifica directamente a la enzima mediante la formación de un enlace covalente con el residuo Cys145 (Jin, Zhao, et al., 2020b) (Figura 1A). Carmofur es una molécula de cadena alifática corta (6 átomos de carbono) que interactúa con nueve aminoácidos del sitio activo, y estos son His41, Met49, Gly143, Ser144, Cys145, His164, Met165, Asp187 y Arg188. En contraste, N3 es un peptidomimético conocido por su capacidad de inhibir específicamente a M^{pro} de una variedad de coronavirus. El mapa de densidad electrónica del complejo M^{pro}-N3, muestra que el inhibidor se ancla en el sitio de unión del sustrato en una conformación extendida (Jin, Du, Xu, et al., 2020a; Jin, Zhao, et al., 2020b; Moneriz & Castro-Salguedo, 2020) (Figura 1A). Se conoce que N3 suprime la actividad de la proteasa M^{pro} del SARS-CoV-2 en dos pasos. En el primero, N3 se une al sitio activo de la proteasa mediante numerosas interacciones no covalentes, mientras que en el segundo paso ocurre la formación del enlace covalente con la Cys145 (Arafet et al., 2020; Shan, Li, & Xu, 2004). En el presente estudio se determinó que N3 forma interacciones con veintitrés aminoácidos, que incluyen a Thr25, Thr26, His41, Met49, Tyr54, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, Ser144, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Pro168, His172, Asp187, Arg188, Gln189, Thr190, Ala191 y Gln192.

Por otra parte, Remdesivir es un fármaco con actividad antiviral aprobado por la FDA para el tratamiento de la COVID-19. Químicamente, Remdesivir es un análogo de nucleótidos que inhibe la replicación del ARN viral mediante la terminación temprana de la cadena (Moneriz & Castro, 2020). El análisis de las interacciones que el ligando Remdesivir forma con los aminoácidos que contornean el sitio activo de la polimerasa, muestra que el inhibidor se une a la enzima mediante una gran cantidad de interacciones no covalentes. Las fuerzas que mayormente participan en la unión ligando-receptor son interacciones hidrofóbicas (3.2 - 4.2 Å), enlaces de hidrógeno (2.2 - 3.2 Å) y fuerzas de Van der Waals (>3.2 Å) (García, de Pascual

Teresa, & Braña, 2004). Remdesivir se ancla a la enzima mediante las interacciones que forma con los residuos Lys545, Arg555, Val557, Asp623, Ser682, Thr687, Ala688, Asn691, Ser759, y Asp760 (Figura 1B).

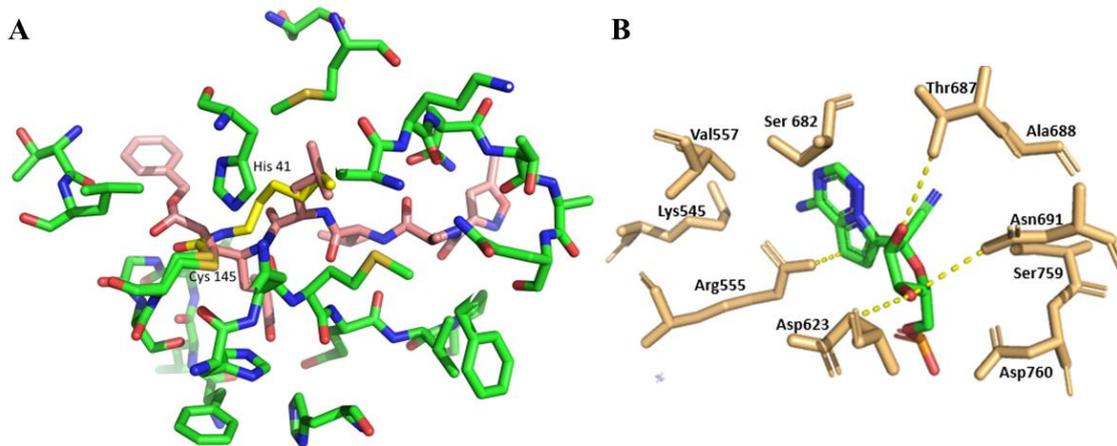


Figura 1. Sitio de unión de inhibidores de M^{pro} y RdRp del SARS-CoV-2. A) Aminoácidos de M^{pro} que interactúan con los inhibidores N3 y Carmofur. Se muestra en sticks de color verde los restos de aminoácidos, en color amarillo a Carmofur y en color rosa a N3. Los residuos Cys145 y His 41 conforman la díada catalítica. B) Aminoácidos de RdRp que interactúan con Remdesivir. El polipéptido se muestra en sticks de color marrón, mientras que el inhibidor se muestra en color verde. Los átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre son de color azul, rojo y amarillo, respectivamente.

3.3. Alineamiento múltiple de secuencias

Una vez que se determinaron los residuos claves para la unión de inhibidores en M^{pro} y RdRp, se analizó su grado de conservación en enzimas homólogas de otros virus. En cuanto a M^{pro}, el alineamiento múltiple de secuencias mostró que los residuos catalíticos His41 y Cys145 presentan un alto grado de conservación debido a su rol crucial en la catálisis (Lim, Shi, Mu, & Song, 2014; Zhou et al., 2019), mientras que los residuos Thr25, Met49, Asn142, His164, Met165, Pro168, Arg188, Thr190, y Ala191, que asisten en la unión tanto de Carmofur como de N3, son menos conservados (Figura Suplementaria 1). Esto sugiere que el sitio de unión de inhibidores en M^{pro}, el cual corresponde al sitio de unión del sustrato, es susceptible de sufrir mutaciones puntuales por efecto de la evolución del virus. Este resultado fue esperado, ya que la enzima M^{pro} procesa proteolíticamente diferentes sustratos y no requiere una alta especificidad hacia los mismos, lo que supone cierta flexibilidad para la sustitución de residuos que conforman el bolsillo de unión del sustrato.

En contraste, el alineamiento múltiple de secuencias de la polimerasa del SARS-CoV-2 y diversas RdRp virales mostró que los residuos del sitio activo que interactúan con Remdesivir se encuentran altamente conservados en todas las especies consideradas para el análisis (Figura Suplementaria 2). En efecto, todos los residuos que conforman el bolsillo catalítico de RdRp presentan un elevado grado de conservación, lo que sugiere que la introducción de mutaciones puntuales en el sitio activo de la enzima podría afectar significativamente la replicación viral y disminuir la capacidad del virus para transmitirse de persona a persona (Gordon, 2020). De este modo, se puede concluir que debido al rol crucial de RdRp en el RTC es poco probable que ocurran mutaciones que generen algún grado de resistencia a Remdesivir u otros inhibidores que se unan al sitio activo, y que RdRp es aparentemente un target seguro para el diseño de fármacos contra la COVID-19.

3.4. Identificación de potenciales mutaciones en la enzima M^{pro} del SARS-CoV-2 y determinación de la resistencia a inhibidores

A partir del análisis múltiple de secuencias de M^{pro} se consideró todas las sustituciones presentes en los residuos Thr25, Met49, Asn142, His164, Met165, Pro168, Arg188, Thr190, y Ala191 de las diferentes proteasas. A continuación, con base a la secuencia del ADN complementario que codifica para M^{pro} (Figura Suplementaria 3), se identificaron los codones que codifican para los residuos susceptibles de mutación y se seleccionó aquellas mutaciones que pueden surgir por sustituciones de un solo nucleótido (Tabla 1). De esta forma, se identificó diez posibles mutaciones puntuales en el sitio de unión de inhibidores de M^{pro}. Ocho mutaciones puntuales se modelaron en la estructura tridimensional de M^{pro} para evaluar su efecto sobre la unión de Carmofur y N3 (Tabla 2). La afinidad de ambos inhibidores por las variantes mutantes y por la enzima silvestre se analizó mediante experimentos de acoplamiento molecular empleando la función CHEMPLP de GOLD (Tabla 2).

Tabla 1. Posibles mutaciones puntuales en el sitio de unión de inhibidores de M^{pro}.

Aminoácido	Codón	Posible mutación	Codones que traducen el aminoácido de la posible mutación
Thr25	ACU	Met	AUG
Met49	AUG	Leu	CUU/ CUC/ CUA/ CUG*
Asn142	AAU	Cys	UGU/ UGC

His164	CAU	Gln	CAA*/ CAG*
Met165	AUG	Leu	CUU/ CUC/ CUA/ CUG*
Pro168	CCA	Ala	GCU/ GCC/ GCA*/GCG
		Ser	UCU/UCC/ UCA*/UCG
Arg188	AGG	Lys	AAA/ AAG*
		Ala	GCU/ GCC/ GCA/ GCG
Thr190	ACA	Val	GUU/ GUC/ GUA/ GUG
		Ile	AUU/ AUC/ AUA*
Ala191	GCA	Ser	UCU/UCC/ UCA*/UCG
		Pro	CCU/ CCC/ CCA*/CCG
		His	CAU/ CAC
		Tyr	UAU/ UAC
		Val	GUU/ GUC/ GUA*/GUG

* Mutaciones que pueden surgir por la substitución de un nucleótido.

3.4.1. Efecto de las variantes mutantes sobre el modo de unión de Carmofur a M^{pro}

El acoplamiento molecular de Carmofur en la forma silvestre y las variantes mutantes Met49Leu, His164Gln y Met165Leu de M^{pro} mostró que el inhibidor adopta una conformación similar a aquella observada en la estructura cristalina del complejo M^{pro}-Carmofur (7BUY) determinada mediante cristalografía de rayos X (Jin, Zhao, et al., 2020a) (Figura 2). Al comparar el valor de Score obtenido para la forma silvestre (67,91) con los valores determinados para las variantes mutantes (69.09 - 83.73) se puede observar que, en términos generales, las mutaciones introducidas no afectan la afinidad del inhibidor por la enzima. Por el contrario, los valores de Score determinados para las tres variantes mutantes son superiores a aquel de la forma silvestre (Tabla 2). El mayor valor de Score se obtuvo para la variante His164Gln, lo cual implica que la substitución de histidina por glutamina aumenta la afinidad de Carmofur por el sitio activo de M^{pro}. Al analizar las interacciones que Carmofur establece con la enzima es posible observar que únicamente el oxígeno del carbono carbonilo de la cadena principal de His164 participa de las interacciones que estabilizan a Carmofur en el sitio activo (Figura 2A), por lo que un cambio en la estructura de la cadena lateral, como ocurre en este caso, no implica serias modificaciones al modo de unión del inhibidor. El aumento de la afinidad de Carmofur en la variante His164Gln se puede atribuir al menor volumen que ocupa la cadena lateral de la glutamina en esta posición, lo que permite que el residuo Met165 adopte una posición que favorece la formación de contactos no covalentes adicionales con el inhibidor

y reduce la penalización de contactos entre proteína-ligando con impedimento estérico (Verdonk, Cole, Hartshorn, Murray, & Taylor, 2003).

Tabla 2. Resultados del acoplamiento molecular de Carmofur y N3 en enzimas M^{pro} de tipo silvestre y sus variantes mutantes

Variante	Score	S (PLP)
M^{pro}-Carmofur		
Silvestre	67.91	-63.86
Met49Leu	69.09	-80.46
His164Gln	83.73	-85.86
Met165Leu	78.17	-83.46
M^{pro}-N3		
Silvestre	120.07	-120.60
Met49Leu	124.09	-119.01
His164Gln	115.15	-115.29
Met165Leu	115.69	-122.64
Pro168Ser	100.80	-101.72
Pro168Ala	137.50	-131.78
Arg188Lys	124.70	-122.70
Thr190Ile	132.49	-134.10
Ala191Val	67.57	-82.69

Así mismo, en cuanto a las sustituciones Met49Leu y Met165Leu, es posible observar que la leucina adopta una conformación similar al de la metionina en ambas posiciones (Figura 2B y

2C), lo cual aparentemente no representa un impedimento para la unión del inhibidor. Carmofur al ser de tamaño pequeño no requiere que los residuos del sitio activo ajusten su posición de forma significativa, únicamente los residuos Met49 y Met165 cambian ligeramente de posición para permitir la unión del inhibidor. Por otra parte, el análisis estructural del complejo M^{pro}-Carmofur muestra que las principales interacciones hidrofóbicas se dan entre la cola de Carmofur y los residuos Met49, Met165 y Asp187. Las sustituciones Met49Leu y Met165Leu no producen un cambio significativo en la naturaleza hidrofóbica de esta región del sitio activo y, por ende, no generan interacciones repulsivas con el inhibidor. Ambas mutaciones producen pequeñas modificaciones en las conformaciones de los residuos adyacentes. Por ejemplo, la mutación Met49Leu provoca un cambio en la conformación de His41 (Figura 2B) y un pequeño desplazamiento de la His164. De igual manera, la sustitución Met165Leu modifica la disposición del anillo de His41 (Figura 2C). Además, al evaluar los resultados del Potencial Lineal por Partes (PLP) se observa que en el acoplamiento molecular de Carmofur en las tres variantes mutantes existe una mejor complementariedad estérica proteína-ligando (González-Paz, Paz, Vera-Villalobos, & Alvarado, 2020). Con base a estos resultados se puede concluir que Carmofur tiene la capacidad de acoplarse a la conformación del sitio activo pese a la presencia de mutaciones, probablemente debido a que es un inhibidor con una cadena alifática de 6 átomos de carbono altamente flexible, lo cual respalda su potencial uso como una opción terapéutica contra la COVID-19 (Jin, Du, Xu, et al., 2020b).

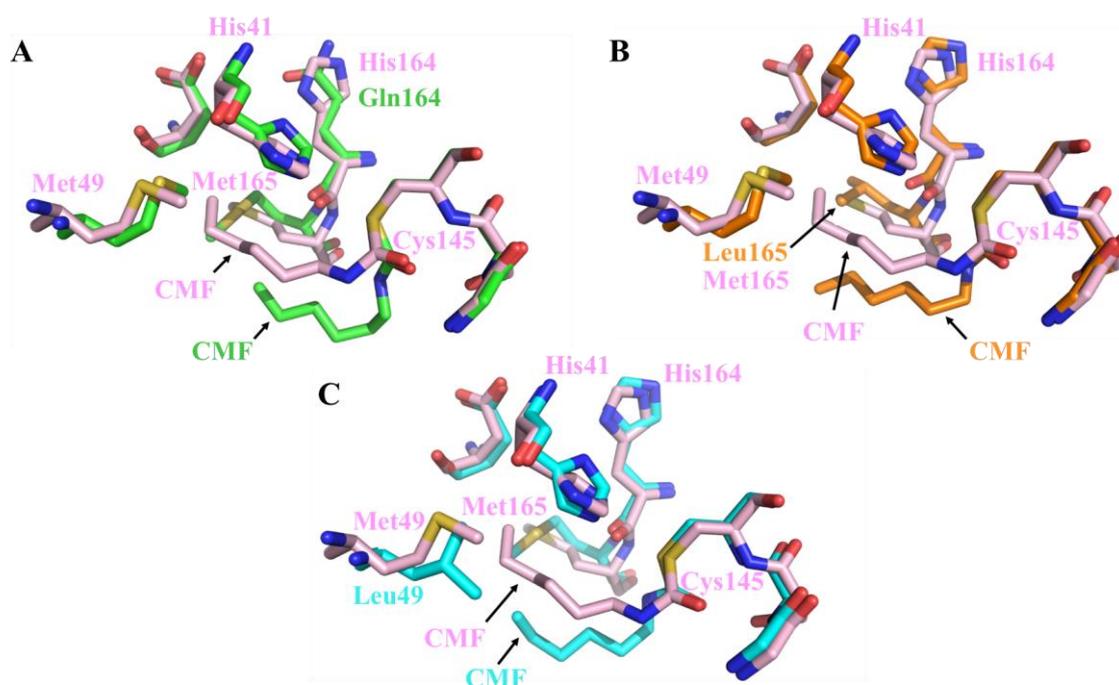


Figura 2. Efecto de tres mutaciones puntuales sobre el modo de unión de Carmofur a M^{Pro}. Superposición del complejo M^{Pro}-Carmofur (7BUY) con los resultados del acoplamiento molecular del inhibidor en las variantes mutantes A) His164Gln, B) Met165Leu y C) Met49Leu4. La forma silvestre y las variantes mutantes de M^{Pro} unidas a Carmofur se muestran en modelos de sticks. Los átomos de carbono son de color rosa para la forma silvestre, mientras que los carbonos en las variantes mutantes tienen colores diferentes. El patrón de colores de los demás átomos es el mismo al descrito en la Figura 1.

3.4.2. Efecto de las variantes mutantes sobre el modo de unión de N3 a M^{Pro}

El acoplamiento molecular de N3 en las variantes mutantes de M^{Pro} sugiere que cambios puntuales en la estructura del sitio activo de la enzima tienen influencia en las propiedades de unión de este inhibidor. Las diferencias en los valores de Score y PLP determinados para la unión de N3 se atribuyen a las diferentes interacciones que se forman o desaparecen al sustituir puntualmente aminoácidos del sitio activo de la enzima. Dentro de los resultados más relevantes, se encontró que los menores valores de Score se obtuvieron para las mutaciones Pro168Ser y Ala191Val en comparación con los resultados obtenidos para la forma silvestre (Tabla 2). La mutación Ala191Val, ubicada en la parte más externa del sitio de unión del sustrato, fue la que generó el menor valor de Score durante la simulación de acoplamiento molecular (Score = 67.57). Al analizar la conformación que adopta N3 en la variante Ala191Val y en la estructura cristalina de la forma silvestre de M^{Pro} obtenida mediante cristalografía de rayos X (Jin, Du, Xu, et al., 2020b) (7BQY) se pudo observar que la valina provoca un cambio significativo en el modo de unión de N3 (Figura 3A). La cadena lateral de la valina se proyecta hacia el espacio que ocupa el anillo de metil isoxazol que conforma la cola de N3, impidiendo así que el inhibidor adopte su típica conformación extendida a lo largo del bolsillo de unión del sustrato y provocando la pérdida de interacciones clave con los residuos que asisten en la unión del inhibidor a la enzima. La mutación Pro168Ser también afecta significativamente la afinidad de N3 (Score = 100.80). La superposición del complejo M^{Pro}-N3 con los resultados de acoplamiento molecular para la mutación Pro168Ser muestran que el anillo de metil isoxazol en este caso se desplaza hacia el oxígeno de la cadena lateral de la serina para dar lugar a la formación de interacciones polares entre estos dos elementos (Figura 3B). Esto ocasiona que aproximadamente un tercio de cola de N3 se ubique por fuera del bolsillo de unión y la pérdida de numerosas interacciones no covalentes con los residuos que contornean el bolsillo de unión de N3. Finalmente, el acoplamiento molecular de N3 en las variantes mutantes His164Gln y Met165Leu muestra una reducción de ~5 puntos (<4%) en el valor de

Score en comparación con el valor obtenido para la variante silvestre (Tabla 2). Como se mencionó anteriormente, estas mutaciones no ejercen un efecto negativo en la afinidad de Carmofur por la enzima. Por lo tanto, es probable que la pequeña variación en la afinidad observada para la unión N3 en estas variantes mutantes pueda deberse al gran tamaño de este inhibidor y a la posible pérdida de interacciones no covalentes producto del ligero cambio de la conformación del bolsillo de unión. Estos resultados sugieren que el modo de unión de N3 es sensible a la sustitución de residuos en el sitio de unión de inhibidores de M^{Pro}, lo que podría dar lugar al surgimiento de resistencia a esta droga.

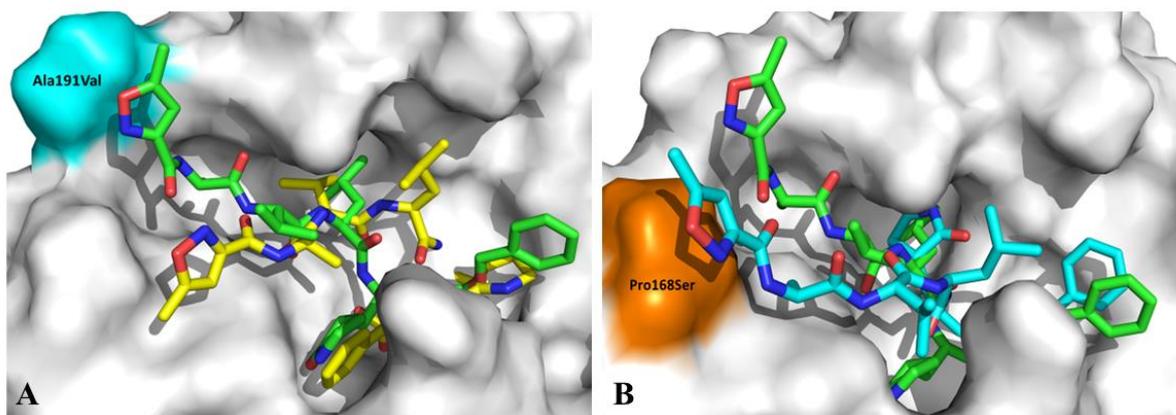


Figura 3. Efecto de cuatro mutaciones puntuales sobre el modo de unión de N3 a M^{Pro}. Superposición del complejo M^{Pro}-N3 (7BQY) con los resultados del acoplamiento molecular del inhibidor en las variantes mutantes A) Ala191Val, y B) Pro168Ser. El polipéptido de cada variante mutante se muestra en modelo de superficie de color blanco, mientras que N3 se muestra en modelo de sticks. Los átomos de carbono son de color verde para la conformación que adopta N3 en 7BQY, mientras que los carbonos en las variantes mutantes tienen colores diferentes. El patrón de colores de los demás átomos es el mismo al descrito en la Figura 1.

4. CONCLUSIONES

El análisis de homología de estructura primaria de las enzimas M^{Pro} y RdRp del SARS-CoV-2 determinó que estas comparten elevados porcentajes de identidad con enzimas del mismo tipo de diversos organismos. En el caso de M^{Pro} la similitud de secuencia alcanza el 96.1%, donde destacan las proteasas de organismos como el coronavirus de murciélago y SARS-CoV, mientras que para RdRp los resultados muestran una identidad de más del 96% para la polimerasa el SARS-CoV y coronavirus animales. Estos resultados indican que ambas enzimas se encuentran altamente conservadas a través de las diferentes especies de coronavirus y otros

virus de ARN.

Es evidente que la polimerasa RdRp muestra un grado de conservación superior en su sitio activo con respecto a la proteasa M^{pro}. Los diez aminoácidos que interactúan con el inhibidor Remdesivir se encuentran extremadamente conservados entre especies, probablemente debido al rol central de la enzima dentro del RTC. Este resultado sugiere que existen pocas posibilidades de que ocurran alteraciones naturales en el sitio de unión a inhibidores de la polimerasa. En cuanto a M^{pro}, se identificó que los residuos catalíticos His41 y Cys145 se encuentran altamente conservados, mientras que los residuos que contornean el bolsillo de unión del sustrato e inhibidores tienen diferentes grados de conservación, lo que da cuenta de las posibles mutaciones que pueden suceder en la enzima. Aparentemente, la proteasa del SARS-CoV-2 es susceptible de sufrir hasta 10 mutaciones puntuales en sitio de unión de inhibidores. Con ayuda de ensayos de acoplamiento molecular se determinó que las mutaciones Ala191Val o Pro168Ser podrían causar resistencia al inhibidor N3. Por otra parte, Carmofur aparentemente es un excelente inhibidor de M^{pro}, ya que su afinidad y modo de unión no se ven afectados por mutaciones puntuales en los residuos que conforman su sitio de unión.

Materiales complementarios: la siguiente información de apoyo se puede descargar en: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7490003>, **Tabla Suplementaria 1.** Valores de similitud de secuencia entre M^{pro} y RdRp del SARS-CoV-2 y proteínas homólogas; **Figura Suplementaria 1.** Alineamiento múltiple de secuencias de M^{pro} del SARS-CoV-2 y virus homólogos; **Figura Suplementaria 2.** Alineamiento múltiple de secuencias de RdRp del SARS-CoV-2 y virus homólogos. **Figura Suplementaria 3.** Secuencia de cDNA de M^{pro} del SARS-CoV-2.

Contribuciones de los autores: Conceptualización, L.C.M. y M.D.G.; metodología, L.C.M. y M.D.G.; software, L.C.M. y M.D.G.; validación, L.C.M. y M.D.G.; análisis formal, D.E.S., C.V.R., K.J.G., L.C.M. y M.D.G.; investigación, D.E.S., C.V.R., K.J.G., M.L.R.A., A.S.S.V., F.C.T., L.C.M. y M.D.G.; curación de datos, D.E.S., C.V.R., K.J.G., L.C.M. y M.D.G.; escritura—preparación del borrador original, D.E.S., C.V.R., K.J.G., L.C.M. y M.D.G.; redacción—revisión y edición, D.E.S., C.V.R., K.J.G., L.C.M. y M.D.G.; supervisión, L.C.M. y M.D.G.; administración de proyectos, L.C.M. y M.D.G. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: El presente estudio se realizó gracias al auspicio de la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Dirección de Investigación y Desarrollo, mediante el proyecto de investigación UTA-CONIN-2020-0295-R.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Ahamed, T., Anjum, A., Rahman, M. M., Haider, N., Kock, R., & Uddin, M. J. (2021). Estimation of novel coronavirus (COVID-19) reproduction number and case fatality rate: A systematic review and meta-analysis. *Health science reports*, 4(2), e274.
- Arafet, K., Serrano-Aparicio, N., Lodola, A., Mulholland, A., González, F. V., Swiderek, K., & Moliner, V. (2020). Mechanism of Inhibition of SARS-CoV-2 Mpro by N3 Peptidyl Michael Acceptor Explained by QM/MM Simulations and Design of New Derivatives with Tunable Chemical Reactivity. *ChemRxiv*.
- Bzówka, M., Mitusińska, K., Raczyńska, A., Samol, A., Tuszyński, J. A., & Góra, A. (2020). Structural and Evolutionary Analysis Indicate That the SARS-CoV-2 Mpro Is a Challenging Target for Small-Molecule Inhibitor Design. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3099.
- Consortium, U. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506-D515.
- Das, S., Sarmah, S., Lyndem, S., & Singha Roy, A. (2021). An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*, 39(9), 3347-3357.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., . . . Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W13-W17.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D*, 66(4), 486-501. doi:doi:10.1107/S0907444910007493
- Gadge, S. K., Kapare, H. S., & Gaikwad, H. K. (2022). Review on different variants of Covid-19. *Pharmaceutical Resonance*.
- Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., . . . Zhang, L. (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*, 368(6492), 779-782. doi:10.1126/science.abb7498
- García, M. L., de Pascual Teresa, B., & Braña, M. F. (2004). *Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I*. Paper presented at the Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Gervasoni, S., Vistoli, G., Talarico, C., Manelfi, C., Beccari, A. R., Studer, G., . . . Pedretti, A. (2020). A comprehensive mapping of the druggable cavities within the SARS-CoV-2 therapeutically relevant proteins by combining pocket and docking searches as implemented in pockets 2.0. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5152.
- González-Paz, L., Paz, J. L., Vera-Villalobos, J., & Alvarado, Y. J. (2020). Compuestos Fitoquímicos Dirigidos al Bloqueo de la Polimerasa Viral del SARS-CoV-2 causante del COVID-19: un Análisis Comparativo de Funciones de Puntuación para Acoplamiento con Interés Biomédico. *Revista Politécnica*, 46, 7-20.

- Gordon, D. E., Jang, G.M., Bouhaddou, M. (2020). SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 459-468.
- Guy, R. K., DiPaola, R. S., Romanelli, F., & Dutch, R. E. J. S. (2020). Rapid repurposing of drugs for COVID-19. *368(6493)*, 829-830.
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., . . . Liu, X. (2020). Structure-based drug design, virtual screening and high-throughput screening rapidly identify antiviral leads targeting COVID-19. *The Preprint Server for Biology*, 234-240.
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., . . . Peng, C. (2020a). Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 1-5.
- Jin, Z., Du, X., Xu, Y., Deng, Y., Liu, M., Zhao, Y., . . . Peng, C. J. N. (2020b). Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *582(7811)*, 289-293.
- Jin, Z., Zhao, Y., Sun, Y., Zhang, B., Wang, H., Wu, Y., . . . Du, X. (2020a). Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nature structural molecular biology*, 27(6), 529-532.
- Jin, Z., Zhao, Y., Sun, Y., Zhang, B., Wang, H., Wu, Y., . . . Du, X. (2020b). Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nature structural & molecular biology*, 27(6), 529-532.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727-748.
- Jubb, H. C., Higuero, A. P., Ochoa-Montano, B., Pitt, W. R., Ascher, D. B., & Blundell, T. L. (2017). Arpeggio: a web server for calculating and visualising interatomic interactions in protein structures. *Journal of Molecular Biology*, 429(3), 365-371.
- Kumar, S., Zhi, K., Mukherji, A., & Gerth, a. K. (2020). Repurposing Antiviral Protease Inhibitors Using Extracellular Vesicles for Potential Therapy of COVID-19. *Journal Virules*, 486-492.
- Land, H., & Humble, M. S. (2018). YASARA: a tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. In *Protein Engineering* (pp. 43-67): Springer.
- Lim, L., Shi, J., Mu, Y., & Song, J. (2014). Dynamically-Driven Enhancement of the Catalytic Machinery of the SARS 3C-Like Protease by the S284-T285-I286/A Mutations on the Extra Domain. *PLOS ONE*, 9(7), e101941. doi:10.1371/journal.pone.0101941
- Moneriz, C., & Castro-Salguedo, C. (2020). Fármacos prometedores y potenciales para el tratamiento de COVID-19. *Revista chilena de infectología*, 37, 205-215.
- Moneriz, C., & Castro, C. (2020). Fármacos prometedores y potenciales para el tratamiento de COVID-19. *SciELO (Revista chilena de infectología)*, 205-215.
- Murdock, J. (2022). The Latest Updates on COVID-19 Treatments and Medications in the Pipeline, Health. *GoodRx health*.
- OMS. (2022). *10 Vaccines Granted Emergency Use Listing (EUL) by WHO*. Retrieved from <https://covid19.trackvaccines.org/agency/who/>
- OMS/OPS. (2020). *Actualización Epidemiológica Enfermedad por coronavirus*. Retrieved from <https://www.paho.org/es/file/71105/download?token=t3ekzUeP>
- Pastrian-Soto, G. J. I. j. o. o. (2020). Bases genéticas y moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune. *14(3)*, 331-337.

- Pastrian, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *SciELO (International journal of odontostomatology)*, v3, 331-337.
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733-9748.
- Schrödinger, L. (2017). The PyMOL Molecular Graphics System. (Version 2.0).
- Shan, Y.-F., Li, S.-F., & Xu, G.-J. (2004). A novel auto-cleavage assay for studying mutational effects on the active site of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(2), 579-583. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.088>
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003). Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(4), 609-623.
- Xiaolu Tang, C. W., Xiang Li, Yuhe Song, Xinmin Yao, Xinkai Wu, Yuange Duan, Hong Zhang, Yirong Wang, Zhaohui Qian, Jie Cui, Jian Lu. (2020). On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review*, 1012-1023.
- Zhou, J., Fang, L., Yang, Z., Xu, S., Lv, M., Sun, Z., . . . Xiao, S. (2019). Identification of novel proteolytically inactive mutations in coronavirus 3C-like protease using a combined approach. *The FASEB Journal*, 33(12), 14575-14587.