

Acoplamiento molecular de proteínas cristalográficas y modelos construidos de hemaglutinina

Alma Zúñiga-Lerma¹, Alfonso Méndez-Tenorio², Juan C. Mateos-Díaz¹, Alba Adriana Vallejo-Cardona¹, Flor Yohana Flores-Hernández¹, Erika Nahomy Marino-Marmolejo¹ y Jorge Bravo-Madrigal^{1*}

¹ Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Guadalajara Jalisco, México

² Laboratorio de Biotecnología y Bioinformática Genómica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Campus Zacatenco, Departamento de Bioquímica, Ciudad de México, México

*Autor de correspondencia: jbravo@ciatej.mx

Palabras clave:

Influenza A, hemaglutinina, acoplamiento molecular, energía de acoplamiento.

Resumen

La escasez en investigaciones de desarrollo nacional propio en México ha sido y podría seguir siendo una complicación para la salud pública; las vidas cobradas de la pandemia de COVID-19, así como la pandemia de Influenza A H1N1 del 2009 son muestra de ello. En este trabajo se ha planteado un nuevo paradigma en el diseño de fármacos útiles contra la generación de variantes resistentes a los antivirales contra el virus de la Influenza A, para ello se ha planteado generar un modelo bioinformático a partir del cual se puedan diseñar nuevos antivirales. En particular, se presenta la comparación de acoplamiento molecular de dos proteínas creadas con herramientas bioinformáticas a partir de secuencias de hemaglutinina, contra acoplamiento hechos con proteínas de hemaglutinina cristalizadas y descargadas del PDB. Los resultados muestran que los modelos construidos tienen potencial para el desarrollo en investigación de nuevas moléculas antivirales. Las limitantes son discutidas en el artículo y se proponen nuevas líneas de investigación.

Enfoques Transdisciplinarios:
Ciencia y Sociedad, 1(1), 55-66.
ISSN. 3061-709X. <https://doi.org/10.5281/zenodo.12809846>

Recibido: 15 marzo 2023
Revisado: 15 de mayo 2023
Aceptado: 14 de junio 2023
Publicado: 24 de julio 2023



Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia CC BY-NC-SA 4.0. Para ver una copia de esta licencia visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Introducción

La influenza ha sido un reto para la humanidad, tan sólo aquí en México la pandemia del 2009 cobró miles de vidas, dado que su tratamiento ha representado un gran desafío. Entre las características que dificultan dicho tratamiento se encuentran su alta mutabilidad y que es estacional, que son características del virus, y la gran cantidad de recursos económicos que consume derivado de estos precedentes (Cordova-Villalobos *et al.*, 2017) .



Dado lo anterior, encontrar una forma de optimizar un tratamiento que sea robusto a dichas dificultades mejoraría las condiciones del sistema de salud, no solo en condiciones normales sino también en posibles eventos impredecibles, como una nueva pandemia. Otras características que dificultan el tratamiento son de carácter social y económico. Actualmente, la mayor parte de la producción e investigación de medicamentos la producen un número limitado de farmacéuticas, lo que implica que su disponibilidad sea limitada y que su costo se pueda elevar, volviendo prohibitiva su adquisición.

La autosuficiencia en los procesos biofarmacéuticos y su investigación en México traería consigo un mejor abasto de medicamentos en las zonas marginadas o de difícil acceso dentro del país. Aplicar estrategias como el uso de herramientas bioinformáticas y el modelaje de proteínas en software para el estudio de los virus con el objetivo de crear antivirales eficaces que se encuentren al alcance de toda la población, marcaría el comienzo (Lemoine *et al.*, 2021).

En el presente artículo se plantea hacer una comparación de energías de acoplamiento de dos proteínas modeladas computacionalmente (modelo H1-H3 y modelo 18HA) a partir de diferentes secuencias de aminoácidos de hemaglutinina del virus de la Influenza A, y estructuras descargadas del banco de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) con las moléculas Arbidol, IY7640 y JNJ4796, con la finalidad de estudiar el potencial de los modelos construidos para su uso en investigación.

Virus de Influenza A.

El virus de la influenza A pertenece a la familia Orthomixoviridae (Thanee *et al.*, 2021) y se dividen según sus glicoproteínas de membrana: hemaglutinina y neuraminidasa. Existen 18 subtipos de hemaglutinina que se dividen en grupo 1 que incluyen H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18 y grupo 2 que incluye H3, H4, H7, H10, H14 y H15 (Wu & Wilson, 2020). Esta proteína cuenta con dos subunidades unidas por enlaces disulfuro, HA1 donde se encuentra el sitio de unión al receptor, distal a la membrana del virus y HA2 con forma de tallo anclada a la membrana del virus que contiene el péptido de fusión (ver Figura 2) (Galloway *et al.*, 2013). Dicho péptido es clave para que se dé la fusión de las membranas y el ingreso de las partículas virales a la célula y sumado a que se encuentra altamente conservado entre todos los subtipos de HA, se ha vuelto un objetivo importante para la creación de fármacos antivirales, que puedan evadir la mutación de los virus de la Influenza (Boonstra *et al.*, 2018; Ranaweera *et al.*, 2019).

Moléculas con potencial actividad antiviral

Se escogieron el arbidol y las moléculas IY7640 y JNJ4796, moléculas que han mostrado inhibir la fusión de la hemaglutinina (Z. Chen *et al.*, 2021). El arbidol es un antiviral usado como tratamiento y profilaxis, aprobado para su uso en China y Rusia. Existe evidencia experimental que señala su sitio de unión en la región de prefusión en una cavidad hidrofóbica de la subunidad HA2 del trímero, entre dos monómeros adyacentes y que se une con mayor afinidad a los subtipos de Influenza A del grupo 2 (Kadam & Wilson, 2017; Li *et al.*, 2022). Sin embargo, también existe



evidencia computacional de su unión estable en la región de fusión, cercana al péptido de fusión. Ambas zonas fueron tomadas para el objetivo de este artículo (Leneva *et al.*, 2009).

La molécula IY7640 fue seleccionada de ensayos *in vitro* e *in vivo* por su capacidad de inhibición en fases tempranas de la infección y la fusión de membranas mediada por la región del tallo de la hemaglutinina. Tras su estudio se encontró que tenía más eficacia contra los subtipos H1N1, H3N2 e Influenza B a nivel celular, en ensayos con ratones no mostró eficacia en cepas H3N2, pero sí una eficacia marcada con cepas resistentes a oseltamivir, otorgándole potencial como nuevo fármaco contra la influenza (Kim *et al.*, 2019).

La molécula JNJ4796 surgió tras el procesamiento de péptidos cíclicos construidos a partir de la caracterización de los anticuerpos CR9114 y FI6v3 dirigidos a la región altamente conservada ubicada en el tallo de la hemaglutinina, cerca del péptido de fusión. Se observó tras pruebas *in vitro* e *in vivo* que tiene la capacidad de inhibir la fusión mediada por la HA de los virus de Influenza A del grupo 1 (Kadam *et al.*, 2017; van Dongen *et al.*, 2019).

Modelos construidos

Los modelos fueron construidos con modelado por homología usando Modeller (Webb & Sali, 2016) a partir de secuencias consenso extraídas de dos grupos de alineamientos de secuencias de aminoácidos de proteínas de hemaglutinina. El modelo H1-H3 fue construido a partir de 5 secuencias de H3N2 y 6 secuencias de H1N1. El modelo 18HA se construyó con secuencias representativas de los 18 subtipos de hemaglutinina. Abarcando así dos grupos importantes, el primero por su infectividad en humanos y el segundo por abarcar todos los subtipos de hemaglutininas conocidas hasta el momento.

Acoplamiento molecular y energía de acoplamiento

El acoplamiento molecular es un ejercicio que ha tomado importancia en el diseño y análisis de fármacos. Ayuda en la predicción de la orientación que podrían tener los ligandos (posibles fármacos) en modelos celulares y *in vivo*, otorga información de las interacciones como los enlaces de hidrógenos, interacciones de van der Waals e interacciones de Coulomb que sumadas dan valores de energía de acoplamiento entre el ligando y la proteína (Ciemny *et al.*, 2018; Pagadala *et al.*, 2017).

Metodología

Se descargaron 20 estructuras cristalizadas de la base de datos PDB de alcance medio, con resoluciones menores o iguales a 2.7 Å y obtenidas por difracción de rayos X. Estas proteínas, tras eliminar presencia de inhibidores o ligandos, fueron sometidas a ejercicios de acoplamiento molecular dirigido con los antivirales Arbidol, JNJ4796 e IY7640, asignadas en su mayoría por su afinidad a los grupos uno o dos de la hemaglutinina. El programa usado fue Autodock Vina con el visualizador UCSF Chimera 64.1.14 (Eberhardt *et al.*, 2021; Pettersen *et al.*, 2004), para linux con la distribución Ubuntu 20.04 en una computadora Lenovo Legion Intel Core i5-7300HQ. Para las visualizaciones de superficie se usó el programa de código



abierto PyMol (Schrödinger, LLC, 2015). Para evaluar la calidad de la esteoquímica global de los modelos se usó la herramienta MolProbity (V. B. Chen et al., 2010), y la desviación cuadrática media se calculó utilizando el programa UCSF Chimera 64.1.14.

Grupos de acoplamiento moleculares

Las estructuras de la hemaglutinina con las que se analizó el arbidol en la región del péptido de fusión y la zona distal a dicho péptido (por la región de prefusión) fueron, en su mayoría, del grupo dos: A/Hong Kong/1/1968(H3N2) (PDB ID: 4FNK) con 1.90 Å de resolución (Ekiert *et al.*, 2012); A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) (PDB ID: 1RVX) con 2.20 Å de resolución (Gamblin *et al.*, 2004); A/California/04/2009(H1N1) (PDB ID: 3UBQ) con 2.0 Å de resolución (Xu *et al.*, 2012); A/mallard/Sweden/51/2002(H10N2) (PDB ID: 4CYV) con 2.30 Å de resolución (Vachieri *et al.*, 2014); A/Shanghai/02/2013(H7N9) (PDB ID: 4LN6) con 2.12 Å de resolución (Yang *et al.*, 2013); A/Netherlands/209/1980(H3N2) (PDB ID: 6N08) con 1.92 Å de resolución, A/swine/Missouri/A01727926/2015(H4N6) (PDB ID: 6V44) con 2.20 Å de resolución, A/turkey/Ontario/6118/1968(H8N4) (PDB ID: 6V46) con 2.25 Å de resolución, A/wedge-tailed shearwater/Western Australia/2576/1979(H15N9) (PDB ID: 6V49) con 2.5 Å de resolución (Yang *et al.*, 2020) y A/Sichuan/26221/2014 (H5N6) (PDB ID: 5HU8) con 2.45 Å de resolución (Yang *et al.*, 2016). Esta última proteína solo se trabajó con la región distal al péptido de fusión debido a que la estructura cristalizada no cuenta con los aminoácidos que conforman el péptido de fusión.

Las estructuras de la hemaglutinina con las que se evaluó la molécula IY7640 fueron, en su mayoría, H1N1 y solo dos H3N2: 3UBQ, 1RVX, 4FNK, 6N08, A/Thailand/CU44/2006(H1N1) (PDB ID: 4EDB) con 2.5 Å de resolución (Cho *et al.*, 2013); A/Brevig Mission/1/1918(H1N1) (PDB ID: 4GXX) con 1.80 Å de resolución (Tsibane *et al.*, 2012); A/South Carolina/1/1918(H1N1) mutante D225G (PDB ID: 4JUG) con 2.70 Å de resolución (Zhang *et al.*, 2013); A/Netherlands/002P1/1951(H1N1) (PDB ID: 6N41) con 2.50 Å de resolución, A/Hickox/1940(H1N1) (PDB ID: 6ONA) con 1.95 Å de resolución y A/Melbourne/1/1946(H1N1) (PDB ID: 6OSR) con 2.55 Å de resolución.

Las estructuras de la hemaglutinina con las que se evaluó la molécula JNJ4796 fueron solo del grupo 1: 1RVX, 3UBQ, 4BXX, 6ONA, 6OSR, 6V46, A/Solomon Islands/3/2006(H1N1) (PDB ID: 6CF7) con 2.72 Å de resolución (van Dongen *et al.*, 2019); A/flat-faced bat/Peru/033/2010 (H18N11) (PDB ID: 4K3X) con 2.15 Å de resolución (Tong *et al.*, 2013); A/gull/Maryland/704/1977(H13N6) (PDB ID: 4KPQ) con 2.50 Å de resolución (Lu *et al.*, 2013); y A/chicken/Guangdong/S1311/2010(H6N6) (PDB ID: 5BNY) con 2.66 Å de resolución (Ni *et al.*, 2015).

Resultados

En el estudio se utilizaron las primeras poses de los acoplamiento moleculares para generar los gráficos de energías de acoplamiento (Figura 1). Se considera que una energía de acoplamiento es más favorable cuando es más negativa (Bender *et al.*, 2021; Xue *et al.*, 2022). Además, se



señala que este análisis se centra exclusivamente en los valores generados y representados en la figura, y se realiza una comparación entre estos valores, calificando como buenos aquellos que se obtienen a partir de las estructuras cristalográficas descargadas del PDB.

Acoplamiento de Arbidol en región de péptido de fusión

En la Figura 1.A se observa una media de aproximadamente -6.22 kcal/mol (línea punteada roja). El mejor acoplamiento se dio con la proteína 4FNK con un valor de -7.612 kcal/mol y peor acoplamiento con la proteína cristalizada 6V46 con un valor de -5.344 kcal/mol. Las energías de los modelos construidos fueron menores a la media, con valores de -5.795 y -6.14 kcal/mol para H1-H3 y 18HA respectivamente, sin embargo, ambos valores tuvieron mejor rendimiento que la proteína cristalizada 6V46, y el valor del modelo 18HA se encuentra muy cercano a la media.

Acoplamiento de Arbidol en zona de prefusión

En la Figura 1.B se observa una media de aproximadamente -5.92 kcal/mol. El mejor acoplamiento, al igual que en la región del péptido de fusión, se observó con la proteína 4FNK con un valor de -7.612 kcal/mol. El caso del peor acoplamiento se dio con el subtipo H7N9 (4LN6) con un valor de -4.625 kcal/mol. En esta región los modelos construidos se situaron sobre la media, con valores de -6.007 kcal/mol para H1-H3 y -6.341 kcal/mol para 18HA.

Acoplamiento de IY7640 en región de péptido de fusión

En la Figura 1.C se observa una media de aproximadamente -8.4745 kcal/mol. El mejor acoplamiento se observó con la proteína 6OSR con un valor de -9.039 kcal/mol y el peor acoplamiento se dio en el modelo construido H1-H3 con un valor de -7.026 kcal/mol. A excepción del modelo construido H1-H3, todos los valores de acoplamiento se encuentran relativamente cerca de la media, incluyendo el segundo modelo construido (18HA) que arrojó un valor de -8.262 kcal/mol.

Acoplamiento de JNJ4796 en región de péptido de fusión

En la Figura 1.D se observa una media de aproximadamente -9.35 kcal/mol. El mejor acoplamiento se observó con la proteína 4GXX con un valor de -11.914, siendo el más alto en todo el estudio. El peor acoplamiento se dio con la proteína -7.186 kcal/mol. Los modelos construidos arrojaron resultados menores a la media, con valores -8.057 kcal/mol y -9.075 kcal/mol para H1-H3 y 18HA, respectivamente. Cabe señalar, que nuevamente el valor de energía de acoplamiento de la proteína construida 18HA se encuentra muy cercano a la media y los valores más altos muy alejados de ella.



Poses de acoplamiento

La comparación de las poses se realizó dando por correcta la ubicación del reacoplamiento de las mismas proteínas utilizadas en las investigaciones previas del Arbidol, IY7640 y JNJ4796 representadas en la figura 2, señaladas con una “i”.

Las poses que tomó el arbidol en la región del péptido de fusión (Figura 2.A) fueron muy distintas entre proteínas, sin embargo, en todos los casos se puede observar que encaja la molécula perfectamente en la cavidad correspondiente.

En la Figura 2.B se observa en las poses cierta similitud entre el acoplamiento hecho con la proteína (B.i) y la del modelo construido H1-H3 (B.iii). La pose dada en el modelo 18HA (B.ii) se muestra diferente a las contiguas. La molécula IY7640 (Figura 2.C) tomó poses muy similares entre la proteína 3UBQ (C.i) y ambas proteínas modelos (C.ii y C.iii). Con la molécula JNJ4796 (Figura 2D) la peor pose se observó con la proteína 6CF7 (D.i) estando esta en una posición más externa a la cavidad del péptido de fusión que las tomadas en los modelos construidos (D.ii y D.iii) aun cuando distan entre ellas, orientándose en sentidos opuestos.

Desviación cuadrática media (RMSD)

Se compararon las proteínas modeladas, H1-H3 y 18HA contra la proteína cristalizada 6OSR descargada del PDB y previamente tratada como se señala en el presente artículo. Los resultados de RMSD fueron 2.545 Å y 1.919 Å para 18HA y H1-H3 respectivamente, valores que según Muratcioglu y colaboradores (2015) se consideran predicciones aceptables, por encontrarse debajo de 3 Å.

Estereoquímica global

En el modelo H1-H3 se observó que los ángulos de torsión φ/ψ se encontraron en las regiones favorables solo en un 90.4% (1284/1420), siendo deseable un porcentaje mayor al 98%. Además, se encontraron en las regiones permitidas en un 98.0% de los casos, cuando se esperaba un porcentaje mayor al 99.8%. En cuanto al modelo 18HA, los ángulos de torsión en las regiones favorables solo alcanzaron el 89.6%, mientras que en las regiones permitidas se encontraron en un 97.5%. ver Figura 3.

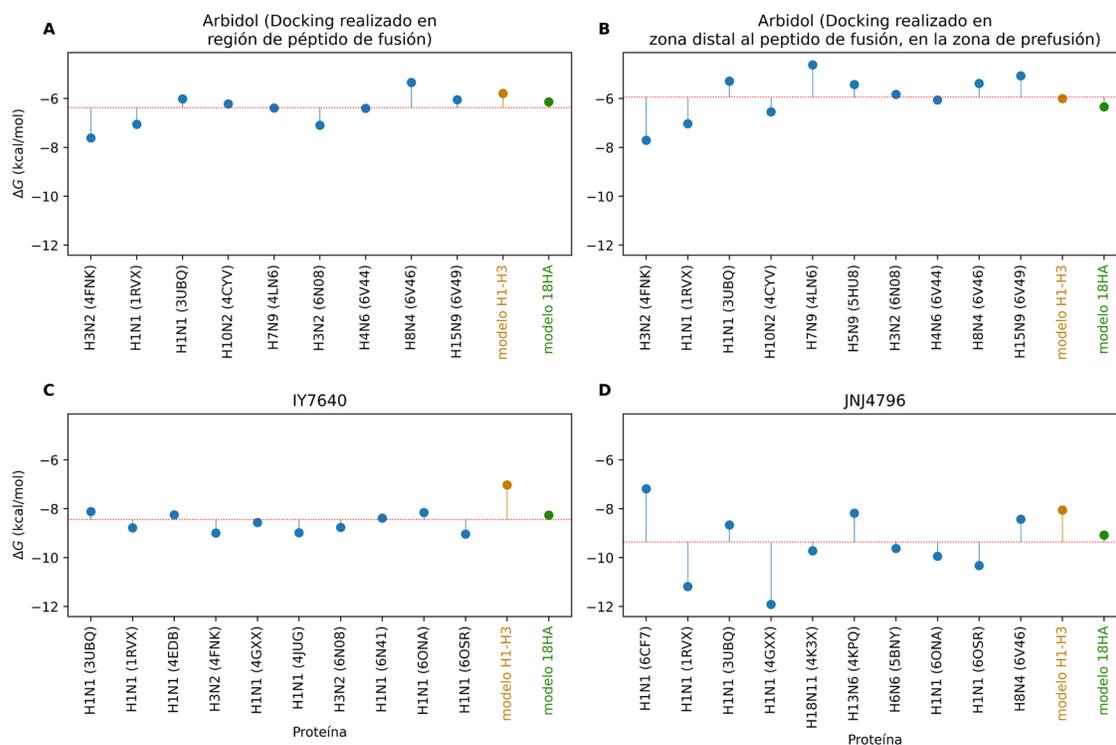


Figura 1. Energías de acoplamiento de moléculas con potencial antiviral y proteínas de hemaglutinina.

Nota. Las energías de acoplamiento correspondientes a las proteínas descargadas del PDB se representan en color azul, en naranja las correspondientes al modelo construido H1-H3 y en verde las del modelo construido 18HA. Las líneas punteadas rojas representan la media de los valores de las energías de acoplamiento. En el eje de las X se mencionan las proteínas de hemaglutinina por subtipo y código del PDB. (A, C, D) Muestran las energías de acoplamiento de las moléculas Arbidol, IY7640 y JNJ4796, respectivamente, en la región del péptido de fusión. (B) Muestran las energías de acoplamiento de la molécula de arbidol en la región distal al péptido de fusión, en la región de prefusión.

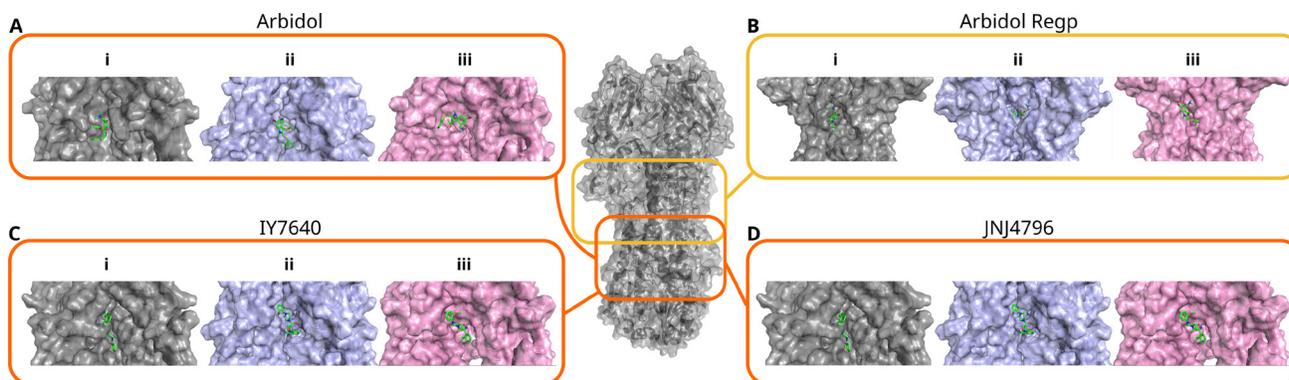


Figura 2. Estructura tridimensional de la hemaglutinina y poses de acoplamiento de las moléculas con potencial antiviral.

Nota. La proteína central color gris representa la estructura de hemaglutinina y las zonas donde fueron realizados los acoplamientos moleculares, en recuadro amarillo la región de prefusión y en recuadro naranja la región de fusión. Los acoplamientos se dan de la siguiente manera: En el recuadro (A) el arbidol con la proteína (A.i) 4FNK. Recuadro (B) arbidol con la proteína (B.i) 4FNK. Recuadro (C) IY7640 con la proteína (C.i) 3UBQ. Recuadro (D) JNJ4796 con la proteína (D.i) 6CF7. Las proteínas en color azul corresponden al modelo 18HA y las proteínas rosas corresponden al modelo H1-H3.

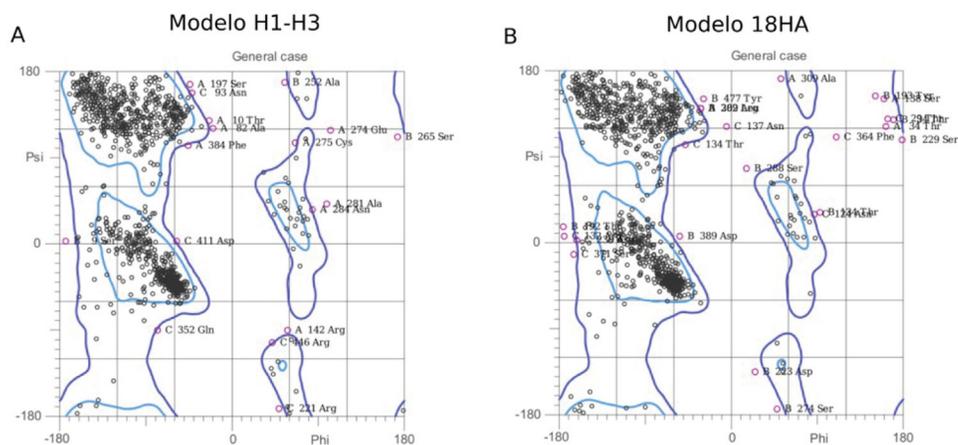


Figura 3. Gráficos Ramachandran de los modelos construidos por homología.

Nota. En el panel A se muestra el mapeo de pares de ángulos de torsión ϕ/ψ del modelo H1-H3 y en el panel B, los correspondientes al modelo 18HA.

Discusión

La metodología presentada aquí produjo resultados prometedores, en la mayoría de los casos las energías de acoplamiento de los modelos construidos estuvieron cercanas al promedio o superiores al peor valor, a excepción del acoplamiento con la molécula IY7640, donde el modelo H1-H3 mostró el peor valor.

Los resultados más promisorios se vieron con el modelo 18HA, que mantuvieron un rango positivo en cuanto a las energías de acoplamiento (muy cercanos a la media o con mejores rendimientos) y en poses donde las moléculas antivirales encajaron dentro de las cavidades esperadas, interactuando con las fracciones conservadas reflejadas también dentro del modelo y no sólo en las estructuras descargadas del PDB. Cabe señalar que este modelo fue creado con una secuencia representativa de los 18 subtipos de HA, por lo cual se considera que podría contribuir al futuro diseño de moléculas contra virus pandémicos y estacionales.

Se observó que los mejores resultados se obtuvieron en proteínas con resoluciones inferiores a 2 Å; por lo tanto, es recomendable llevar a cabo estudios adicionales utilizando proteínas cristalográficas con resoluciones más homogéneas. En relación a la estereoquímica de los modelos, se analizarán las zonas que presentan desviaciones significativas en las proteínas modeladas, con el objetivo de realizar modificaciones que no generen distorsiones artificiales en los ángulos de torsión ϕ/ψ (Wlodawer, 2017).

Conclusión

Gracias a esta metodología se ven características positivas y alentadoras en el modelo 18HA, formado a partir de secuencias de los 18 subtipos de HA. Los resultados representan un primer paso para el desarrollo de un algoritmo que permita el diseño de fármacos efectivos capaces de mostrar competencia aun con nuevas variantes de virus resistentes a fármacos convencionales. Es necesario en estudios posteriores para la optimización de los modelos, además de la suma de estructuras cristalográficas al estudio.



Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de interés.

Financiamiento

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco con el apoyo del CONACYT a través del proyecto Ciencia de Frontera 171564, Diseño racional de moléculas con potencial uso antiviral con énfasis a limitar la resistencia a fármacos.

Agradecimientos

AZL agradece a Conacyt por la beca de maestría al CVU 1096780.

Referencias

- Bender, B. J., Gahbauer, S., Lutgens, A., Lyu, J., Webb, C. M., Stein, R. M., Fink, E. A., Balias, T. E., Carlsson, J., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2021). A practical guide to large-scale docking. *Nature Protocols*, *16*(10), 4799-4832. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z>
- Boonstra, S., Blijleven, J. S., Roos, W. H., Onck, P. R., van der Giessen, E., & van Oijen, A. M. (2018). Hemagglutinin-Mediated Membrane Fusion: A Biophysical Perspective. *Annual Review of Biophysics*, *47*, 153-173. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033018>
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *66*(1), 12-21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Chen, Z., Cui, Q., Caffrey, M., Rong, L., & Du, R. (2021). Small Molecule Inhibitors of Influenza Virus Entry. *Pharmaceuticals*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/ph14060587>
- Cho, K. J., Lee, J.-H., Hong, K. W., Kim, S.-H., Park, Y., Lee, J. Y., Kang, S., Kim, S., Yang, J. H., Kim, E.-K., Seok, J. H., Unzai, S., Park, S. Y., Saelens, X., Kim, C.-J., Lee, J.-Y., Kang, C., Oh, H.-B., Chung, M. S., & Kim, K. H. (2013). Insight into structural diversity of influenza virus haemagglutinin. *Journal of General Virology*, *94*(8), 1712-1722. <https://doi.org/10.1099/vir.0.051136-0>
- Ciemny, M., Kurcinski, M., Kamel, K., Kolinski, A., Alam, N., Schueler-Furman, O., & Kmiecik, S. (2018). Protein-peptide docking: Opportunities and challenges. *Drug Discovery Today*, *23*(8), 1530-1537. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>
- Córdova-Villalobos, J. A., Macias, A. E., Hernandez-Avila, M., Dominguez-Cherit, G., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C., & Ponce de León-Rosales, S. (2017). The 2009 pandemic in Mexico: Experience and lessons regarding national preparedness policies for seasonal and epidemic influenza. *Gaceta Medica De México*, *153*(1), 102-110.
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (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. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>



- Ekiert, D. C., Kashyap, A. K., Steel, J., Rubrum, A., Bhabha, G., Khayat, R., Lee, J. H., Dillon, M. A., O'Neil, R. E., Faynboym, A. M., Horowitz, M., Horowitz, L., Ward, A. B., Palese, P., Webby, R., Lerner, R. A., Bhatt, R. R., & Wilson, I. A. (2012). Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature*, *489*(7417), Article 7417. <https://doi.org/10.1038/nature11414>
- Galloway, S. E., Reed, M. L., Russell, C. J., & Steinhauer, D. A. (2013). Influenza HA Subtypes Demonstrate Divergent Phenotypes for Cleavage Activation and pH of Fusion: Implications for Host Range and Adaptation. *PLoS Pathogens*, *9*(2), e1003151. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003151>
- Gamblin, S. J., Haire, L. F., Russell, R. J., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y., Vasisht, N., Steinhauer, D. A., Daniels, R. S., Elliot, A., Wiley, D. C., & Skehel, J. J. (2004). The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin. *Science*, *303*(5665), 1838-1842. <https://doi.org/10.1126/science.1093155>
- Kadam, R. U., Juraszek, J., Brandenburg, B., Buyck, C., Schepens, W. B. G., Kesteleyn, B., Stoops, B., Vreeken, R., Vermond, J., Goutier, W., Tang, C., Vogels, R., Friesen, R. H. E., Goudsmit, J., van Dongen, M. J. P., & Wilson, I. A. (2017). Potent Peptidic Fusion Inhibitors of Influenza Virus. *Science* (New York, N.Y.), *358*(6362), 496-502. <https://doi.org/10.1126/science.aan0516>
- Kadam, R. U., & Wilson, I. A. (2017). Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(2), 206-214. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617020114>
- Kim, J. I., Lee, S., Lee, G. Y., Park, S., Bae, J.-Y., Heo, J., Kim, H.-Y., Woo, S.-H., Lee, H. U., Ahn, C. A., Bang, H. J., Ju, H. S., Ok, K., Byun, Y., Cho, D.-J., Shin, J. S., Kim, D.-Y., Park, M. S., & Park, M.-S. (2019). Novel Small Molecule Targeting the Hemagglutinin Stalk of Influenza Viruses. *Journal of Virology*, *93*(17), e00878-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00878-19>
- Lemoine, C. H., Nidom, R. V., Ventura, R., Indrasari, S., Normalina, I., Santoso, K. P., Derouet, F., Barnier-Quer, C., Borchard, G., Collin, N., & Nidom, C. A. (2021). Better Pandemic Influenza Preparedness through Adjuvant Technology Transfer: Challenges and Lessons Learned. *Vaccines*, *9*(5), 461. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050461>
- Leneva, I. A., Russell, R. J., Boriskin, Y. S., & Hay, A. J. (2009). Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Research*, *81*(2), 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
- Li, Z., Li, T., Liu, M., & Ivanovic, T. (2022). Hemagglutinin Stability Determines Influenza A Virus Susceptibility to a Broad-Spectrum Fusion Inhibitor Arbidol. *ACS Infectious Diseases*, *8*(8), 1543-1552. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.2c00178>
- Lu, X., Qi, J., Shi, Y., Wang, M., Smith, D. F., Heimburg-Molinaro, J., Zhang, Y., Paulson, J. C., Xiao, H., & Gao, G. F. (2013). Structure and Receptor Binding Specificity of Hemagglu-



- tinin H13 from Avian Influenza A Virus H13N6. *Journal of Virology*, 87(16), 9077-9085. <https://doi.org/10.1128/JVI.00235-13>
- Muratcioglu, S., Guven-Maiorov, E., Keskin, Ö., & Gursoy, A. (2015). Advances in template-based protein docking by utilizing interfaces towards completing structural interactome. *Current Opinion in Structural Biology*, 35, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.10.001>
- Ni, F., Kondrashkina, E., & Wang, Q. (2015). Structural and Functional Studies of Influenza Virus A/H6 Hemagglutinin. *PLOS ONE*, 10(7), e0134576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134576>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: A review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91-102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Ranaweera, A., Ratnayake, P. U., Ekanayaka, E. A. P., DeClercq, R., & Weliky, D. P. (2019). Hydrogen-deuterium exchange supports independent membrane-interfacial fusion peptide and transmembrane domains in subunit 2 of influenza virus hemagglutinin protein, a structured and aqueous-protected connection between the fusion peptide and soluble ectodomain, and the importance of membrane apposition by the trimer-of-hairpins structure. *Biochemistry*, 58(19), 2432-2446. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01272>
- Schrödinger, LLC. (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.8.
- Thanee, C., Kittikraisak, W., Sinthuwattanawibool, C., Roekworachai, K., Klinklom, A., Kor-sitthikul, K., Jirasakpisarn, S., Srirompotong, U., Chittaganpitch, M., Dawood, F. S., Suntarattiwong, P., Mott, J. A., & Chotpitayasunondh, T. (2021). Knowledge, attitude/perception, and practice related to seasonal influenza vaccination among caregivers of young Thai children: A cross-sectional study. *PLoS ONE*, 16(6), e0253561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253561>
- Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., Chen, X., Recuenco, S., Gomez, J., Chen, L.-M., Johnson, A., Tao, Y., Dreyfus, C., Yu, W., McBride, R., Carney, P. J., Gilbert, A. T., Chang, J., ... Donis, R. O. (2013). New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLOS Pathogens*, 9(10), e1003657. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003657>
- Tsibane, T., Ekiert, D. C., Krause, J. C., Martinez, O., Jr, J. E. C., Wilson, I. A., & Basler, C. F. (2012). Influenza Human Monoclonal Antibody 1F1 Interacts with Three Major Antigenic Sites and Residues Mediating Human Receptor Specificity in H1N1 Viruses. *PLOS Pathogens*, 8(12), e1003067. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003067>
- Vachieri, S. G., Xiong, X., Collins, P. J., Walker, P. A., Martin, S. R., Haire, L. F., Zhang, Y., McCauley, J. W., Gamblin, S. J., & Skehel, J. J. (2014). Receptor binding by H10 influenza viruses. *Nature*, 511(7510), Article 7510. <https://doi.org/10.1038/nature13443>



- Van Dongen, M. J. P., Kadam, R. U., Juraszek, J., Lawson, E., Brandenburg, B., Schmitz, F., Schepens, W. B. G., Stoops, B., van Diepen, H. A., Jongeneelen, M., Tang, C., Vermond, J., van Eijgen-Obregoso Real, A., Blokland, S., Garg, D., Yu, W., Goutier, W., Lanckacker, E., Klap, J. M., ... Wilson, I. A. (2019). A small-molecule fusion inhibitor of influenza virus is orally active in mice. *Science* (New York, N.Y.), *363*(6431), eaar6221. <https://doi.org/10.1126/science.aar6221>
- Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, *54*(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
- Wlodawer, A. (2017). Stereochemistry and Validation of Macromolecular Structures. En A. Wlodawer, Z. Dauter, & M. Jaskolski (Eds.), *Protein Crystallography* (Vol. 1607, pp. 595-610). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_24
- Wu, N. C., & Wilson, I. A. (2020). Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(8), a038778. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038778>
- Xu, R., McBride, R., Nycholat, C. M., Paulson, J. C., & Wilson, I. A. (2012). Structural Characterization of the Hemagglutinin Receptor Specificity from the 2009 H1N1 Influenza Pandemic. *Journal of Virology*, *86*(2), 982-990. <https://doi.org/10.1128/JVI.06322-11>
- Xue, Q., Liu, X., Russell, P., Li, J., Pan, W., Fu, J., & Zhang, A. (2022). Evaluation of the binding performance of flavonoids to estrogen receptor alpha by Autodock, Autodock Vina and Surflex-Dock. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *233*, 113323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113323>
- Yang, H., Carney, P. J., Chang, J. C., & Stevens, J. (2020). Molecular characterization and three-dimensional structures of avian H8, H11, H14, H15 and swine H4 influenza virus hemagglutinins. *Heliyon*, *6*(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04068>
- Yang, H., Carney, P. J., Chang, J. C., Villanueva, J. M., & Stevens, J. (2013). Structural Analysis of the Hemagglutinin from the Recent 2013 H7N9 Influenza Virus. *Journal of Virology*, *87*(22), 12433-12446. <https://doi.org/10.1128/JVI.01854-13>
- Yang, H., Carney, P. J., Mishin, V. P., Guo, Z., Chang, J. C., Wentworth, D. E., Gubareva, L. V., & Stevens, J. (2016). Molecular Characterizations of Surface Proteins Hemagglutinin and Neuraminidase from Recent H5Nx Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology*, *90*(12), 5770-5784. <https://doi.org/10.1128/JVI.00180-16>
- Zhang, W., Shi, Y., Qi, J., Gao, F., Li, Q., Fan, Z., Yan, J., & Gao, G. F. (2013). Molecular Basis of the Receptor Binding Specificity Switch of the Hemagglutinins from both the 1918 and 2009 Pandemic Influenza A Viruses by a D225G Substitution. *Journal of Virology*, *87*(10), 5949-5958. <https://doi.org/10.1128/JVI.0054>