

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Evaluación sobre docking molecular y ensayo de actividad de  
compuestos noveles sobre ACE2: Búsqueda de posibles  
moduladores capaces de generar un cambio conformacional  
mediante alosterismo**

**Tutor:** Alejandro Ezequiel Leroux, Ph.D.<sup>1</sup>

**Cotutora:** Mariela Bollini, Ph.D.<sup>2</sup>

**Alumno:** Maximiliano Javier Gandola Toledo

**Matrícula:** 02500

**Carrera:** Licenciatura en Ciencias Químicas (1401)

**Año:** 2022

**Tesina de grado para optar por el título de: Licenciado en Ciencias  
Químicas**

<sup>1</sup> Investigador Asistente CONICET-IBioBA-MPSP. Biología química de mecanismos de regulación alostérica.

<sup>2</sup> Investigadora Independiente CONICET-CIBION. Profesora Adjunta de bioinformática y biomedicina estructural y computacional, carrera de Bioingeniería, Instituto Tecnológico de Buenos Aires, ITBA.

## **Agradecimientos y Aclaraciones**

A mis tutores, Mariela Bollini y Alejandro Leroux, por compartirme sus conocimientos siempre con la mejor predisposición y paciencia, y por la asesoría brindada durante la realización de esta investigación. Gracias por introducirme al fascinante mundo de la bioinformática y diseño de fármacos. Sobre todo, agradecer al Dr. Ricardo Biondi, por confiar en mí y darme la oportunidad de introducirme a su línea de investigación junto con su grupo para involucrarme en este proyecto.

A mis docentes a lo largo de estos años, por su incansable entusiasmo, paciencia y sabiduría, logrando transmitir el amor y la pasión por esta disciplina.

A mis padres, por el apoyo brindado durante todos estos años de estudio y por darme la oportunidad y todas las facilidades para seguir esta apasionante disciplina.

A mi compañera, Cecilia, por creer en mí, darme fuerzas, buenas ideas y todo su apoyo con buena predisposición siempre que la necesité.

A mis amigos, por brindarme siempre palabras de aliento y confianza durante toda esta etapa.

A mi director de carrera, Dr. Daniel Bacelo, por siempre tener una gran predisposición para ayudarme con lo que necesitaba.

A mi lugar de trabajo, Laboratorios Fatro Von Franken, por el tiempo y la comprensión brindada durante la realización de esta investigación.

El alumno realizó de forma independiente todo lo que implica el Docking Molecular (Metodología, Resultados y Discusión). A la vez participó de forma conjunta con el grupo de investigación del IBioBA-MPSP (Dr Ricardo Biondi) en la metodología de la parte experimental de los ensayos de actividad (pesada de compuestos, preparado de soluciones y muestras, ensayos de puesta a punto). Los datos obtenidos de estos ensayos fueron procesados y obtenidos por el grupo de investigación. La enzima recombinante fue aportada por el grupo de investigación.

<b>1</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>5</b>
2.1	Introducción general .....	5
2.2	Bioquímica estructural y dinámica de ACE2 .....	7
2.3	Mecanismo de Infección de SARS-CoV-2.....	9
2.4	Docking Molecular.....	11
2.5	Ensayo de actividad de ACE2 .....	11
2.6	Ensayo AlphaSCREEN.....	12
2.7	Ensayo de Desnaturalización Térmica .....	12
<b>3</b>	<b>Marco Teórico/Antecedentes .....</b>	<b>13</b>
3.1	Estructura y Dinámica de ACE2 .....	13
3.2	Dimerización de ACE2.....	16
3.3	Interacción ACE2/SARS-CoV-2 .....	17
3.4	Antecedentes de Docking molecular con búsqueda de reguladores de ACE2 .....	19
3.5	Antecedentes más recientes.....	23
3.6	Selección de compuestos para utilizar durante el presente trabajo.....	26
3.7	Conclusión del Marco Teórico.....	27
<b>4</b>	<b>Objetivos: .....</b>	<b>28</b>
4.1	Objetivo General: .....	28
4.2	Objetivos Específicos: .....	28
<b>5</b>	<b>Metodología .....</b>	<b>28</b>
5.1	Docking Molecular.....	28
5.1.1	Preparación de las estructuras receptoras:.....	28
5.1.2	Preparación de los ligandos:.....	29
5.1.3	Preparado e identificación de las coordenadas a analizar en los diferentes receptores:.....	29
5.1.4	Docking.....	29
5.2	Ensayo de Actividad Enzimática .....	30
<b>6</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>36</b>
6.1	Docking Molecular.....	36
6.1.1	Análisis de Interacciones entre los residuos del sitio activo y el inhibidor MLN- 4760: 39	

6.1.2	Análisis de Interacciones entre los residuos del sitio activo y los compuestos dockeados:.....	40
6.1.3	Análisis de interacciones entre los residuos del sitio bisagra o “hinge” y los compuestos dockeados: .....	44
6.1.4	Análisis de interacciones entre los residuos del sitio de unión con RBD de Spike y los compuestos dockeados: .....	46
6.2	Ensayo de Actividad Enzimática .....	49
<b>7</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>53</b>
7.1	Docking Molecular.....	53
7.1.1	Sitio Activo.....	53
7.1.2	Sitio bisagra .....	54
7.1.3	Sitio de Interacción con Spike.....	54
7.2	Actividad Enzimática.....	54
<b>8</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo I:</b>	<b>.....</b>	<b>63</b>

## 1 Resumen

Este trabajo plantea un posible método de abordar la problemática del COVID-19 generada por el coronavirus SARS-CoV-2, diferente a las vacunas, y de aliviar síntomas de otras afecciones como la hipertensión. Se plantea que la enzima que permite la entrada del virus a la célula, ACE2, puede ser un posible blanco terapéutico de compuestos con capacidad de modular su actividad enzimática o capaces de generar un cambio conformacional de la enzima alostéricamente, no sólo para evitar su interacción con la proteína Spike de SARS-CoV-2 y así evitar la entrada del virus a la célula, sino para aliviar los síntomas causados por el COVID-19 y otras afecciones como la hipertensión debido al rol que esta enzima presenta en el sistema renina-angiotensina. Además, al enfocarse sobre ACE2 y no sobre la proteína Spike del virus, se obtiene el beneficio de un tratamiento más amplio en caso de la aparición de una nueva cepa o mutaciones de SARS CoV's, además de poder tratar a pacientes durante el transcurso de la infección para poder disminuir sus efectos patológicos.

Para eso se hicieron ensayos *in silico* de docking molecular donde se evaluó la afinidad de compuestos previamente evaluados en un ensayo de desnaturalización térmica con capacidad de afectar la estabilidad de ACE2 para determinar la energía de unión que presentan en tres sitios diferentes de la enzima. Seguido a esto, se realizó un ensayo *in vitro* de actividad enzimática en presencia de los compuestos para determinar su capacidad de modular la actividad de ACE2. La idea general es que el docking molecular funcione como una herramienta de predicción de afinidad de los compuestos por la enzima y predicción de los residuos más relevantes de ACE2 a la hora de interactuar con los compuestos, y mediante el ensayo de actividad comprobar esta afinidad.

Se encontraron varios compuestos con alta energía de unión a ACE2 y a la vez capaces de generar un aumento significativo de la actividad enzimática. Se desconoce el mecanismo por el cual estos compuestos aumentan la actividad, pero haciendo un análisis de las interacciones de los compuestos con los residuos más relevantes (los que presentan mayor cantidad de interacciones con los compuestos) de ACE2 se plantean diferentes hipótesis y posibles ensayos a llevar a cabo para indagar más sobre el mecanismo por el cual estos compuestos aumentan la actividad enzimática.

## 2 Introducción

### 2.1 Introducción general

En diciembre de 2019, un nuevo y desconocido tipo de coronavirus surgió en Wuhan, provincia de Hubei, en China. Una vez que se logró identificar, el Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (ICTV) lo denominó Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), y es el causante de la enfermedad del Coronavirus 2019 (COVID-19). El 11 de marzo de 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declaró como una pandemia, y a pesar de los esfuerzos globales para detener su expansión, al 31 de agosto de 2022 la OMS declara 598 millones de casos confirmados, incluyendo más de 6.4 millones de muertes reportadas a nivel global. (WHO, 2022).

El SARS-CoV-2 es el séptimo coronavirus conocido causante de enfermedades en humanos. Pertenece a la misma familia y género de virus emergentes altamente patógenos, los betacoronavirus, como el Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) y el Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), que le quitaron la vida a un gran número de personas en los últimos 17 años (Lu et. al., 2015). Los CoV son virus de ARN de sentido positivo no segmentados que presentan cuatro proteínas estructurales, incluidas las proteínas de la cubierta o envelope (E), la membrana (M), la nucleocápside (N) y la espiga o Spike (S) (Rota et. al, 2003).

En los coronavirus como el SARS-CoV y el SARS-CoV-2, el proceso de entrada a la célula huésped está mediado por la glicoproteína Spike o S (Lu et. al, 2015). Esta proteína Spike contiene 2 subunidades diferenciables y reconocibles, S1 y S2, en la cual S1 es responsable del reconocimiento del receptor celular y S2 es responsable de la fusión con la membrana celular (Lai et. al., 2007).

Se demostró que la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), es la vía de ingreso de los diferentes coronavirus a la célula huésped (Zhou et. al., 2020). El mecanismo de infección comienza con la unión de partículas virales a los receptores en la superficie celular de la célula huésped. ACE2 es una proteína transmembrana, específicamente, una carboxipeptidasa dependiente de zinc (Gheblawi et. al, 2020) presente en varios tipos de células epiteliales incluyendo las pulmonares, de las vías respiratorias, del sistema olfatorio, corazón, riñones, hígado páncreas e intestino (Gross et. al., 2020). Se considera a ACE2 como un regulador de la fisiología cardiovascular por su rol en el sistema renina-angiotensina (Ver Figura 1), la homeostasis de aminoácidos y de la microbiota intestinal (Gross et. al., 2020).

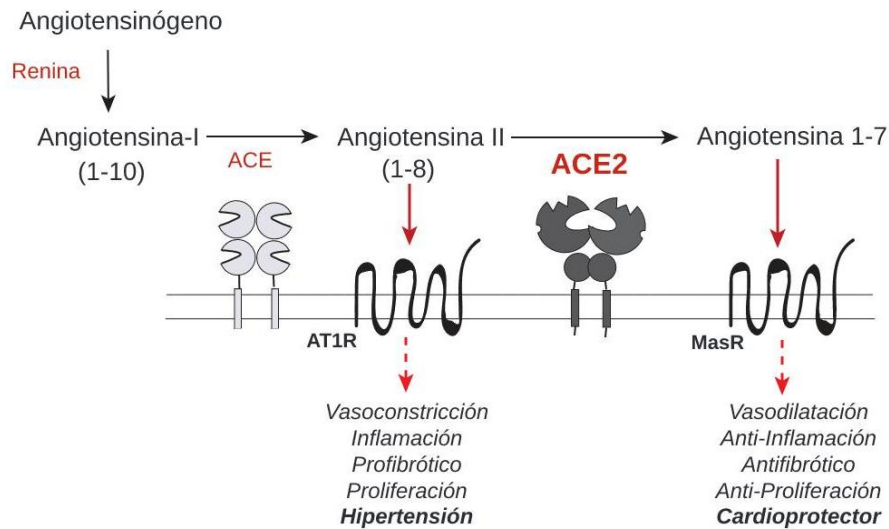


Figura 1: Esquema simplificado del sistema renina-angiotensina y el rol de ACE2 en el mismo. La enzima Renina produce una escisión o “clivaje” del péptido angiotensinógeno resultando en el decapeptido angiotensina I (1-10). ACE “cliva” Ang I a Ang II (Ang 1-8), un potente vasoconstrictor que se une al receptor de tipo 1 de angiotensina II (AT1R), resultando en un aumento de la presión sanguínea e inflamación. ACE2 “cliva” a Ang II para producir Ang 1-7 la cual se une al receptor Mas (MasR) produciendo vasodilatación y acciones cardioprotectoras. Fuente: Imagen adaptada de Gross et. al., 2020.

ACE2 y ACE poseen un rol esencial en el sistema renina-angiotensina (Donoghue et. al., 2000). ACE cataliza la formación de angiotensina II ó 1-8 (Ang II), un octapéptido vasoconstrictor, responsable del aumento de la presión sanguínea, hipertensión e inflamación, utilizando como sustrato la Angiotensina I ó 1-10 (Ang I), un decapeptido derivado del angiotensinógeno (Ver Figura 1). ACE2 presenta dos funciones esenciales en este sistema. Una es la conversión de Ang II, en angiotensina 1-7, un heptapéptido vasodilatador responsable de la disminución de la presión sanguínea, antiinflamatorio y cardioprotector. Y su otra función es la conversión de angiotensina I ó 1-10, el decapeptido precursor de angiotensina II, en angiotensina 1-9, un nonapéptido (Fyhrquist et. al., 2008). Por lo tanto, ACE2 es un regulador negativo del sistema renina-angiotensina que contrarresta las acciones deletéreas producidas por Ang II y que protege contra múltiples enfermedades cardiovasculares, como hipertensión e insuficiencia cardíaca (Paz Ocaranza et. al., 2020). Debido a esta capacidad de contrarrestar los efectos de Ang II, ACE2 es un blanco terapéutico relevante para el desarrollo de fármacos innovadores contra la hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Hernández Prada et. al., 2008).

Experimentos de transferencia de genes de ACE2 donde se logró aumentar los niveles de ARNm de ACE2 de 2 a 3 veces su valor original reportan un aumento similar del ARNm de ACE2 y de la concentración de Ang 1-7 en plasma que la obtenida a través de la inhibición de ACE con drogas clínicamente aprobadas (Huentelman et. al., 2005). De esa forma, el aumento de la actividad de ACE2 generaría efectos semejantes a la inhibición de ACE cuyos efectos

positivos en enfermedades cardiovasculares ha sido validada a nivel clínico por distintos estudios (Ferrario et. al., 2005). A la vez, compuestos capaces de aumentar la actividad enzimática de ACE2 pueden ser beneficiosos para el tratamiento de nefropatía diabética, fallas cardíacas o hipertensión (Danilczyk et. al., 2006). Es por estas razones que un activador de ACE2 puede ser capaz de presentar efectos beneficiosos *in vivo* frente a los cuadros de enfermedades cardiovasculares (Huentelman et. al., 2005). Actualmente, se comprobó que ACE2 recombinante *in vivo* es un buen protector contra el daño pulmonar agudo generado por COVID-19 (Zhang et. al., 2022).

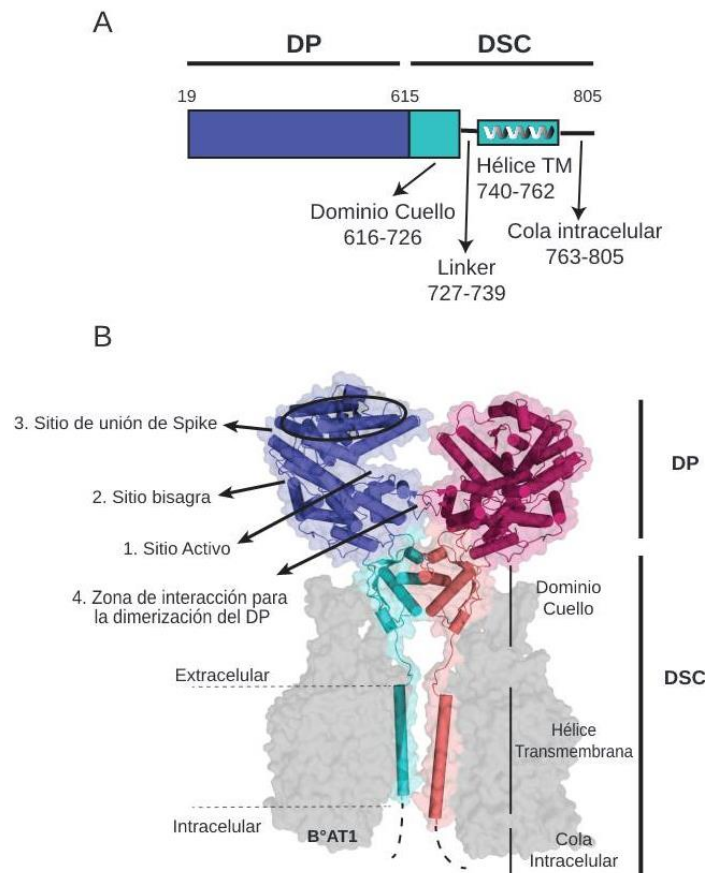
La secuencia de aminoácidos del dominio catalítico o sitio activo de ACE2 presenta un 42% de similaridad con ACE (Donoghue et. al., 2000), pero a pesar de esta similitud, los inhibidores conocidos de ACE no son eficaces contra ACE2 (Rice et. al., 2004). Esta diferencia estructural entre los sitios activos de ambas peptidasas probablemente surge del hecho de que algunas cadenas laterales de residuos de ACE2 como ARG 273, THR 347 y TYR 510 son relativamente más grandes comparadas con los respectivos residuos de ACE, generando una especificidad y selectividad diferente (Towler et. al., 2004). Se han encontrado inhibidores de ACE2 como MLN-4760, y se demostró que tienen un efecto positivo en el tratamiento de colitis en ratones (Byrnes et. al., 2009), pero se discontinuó su desarrollo en la fase I de ensayos clínicos en humanos debido a que generan toxicidad en los pacientes. ACE2 es clivada (es decir, cortada, liberada de la membrana celular) por otra proteasa, ADAM17, lo que permite la liberación de una forma soluble de ACE2 catalíticamente activa a la circulación, con funciones desconocidas (Gross et. al., 2020).

## **2.2 Bioquímica estructural y dinámica de ACE2**

En 2004 se logró obtener mediante cristalografía de rayos X la primera estructura cristalina de ACE2 en presencia de un inhibidor en su sitio activo, MLN-4760 (Towler et. al., 2004). Esta estructura luego se comparó con la estructura cristalina de ACE2 en su estado nativo, y se identificaron diferencias entre la ubicación espacial y posición de muchos residuos, no sólo los del sitio activo (Towler et. al., 2004), sino los que también participan en la interacción con la proteína Spike de SARS-CoV (Prabakaran et. al., 2004).

La extensión extracelular de ACE2 está conformada en su mayoría por el dominio proteolítico (DP, residuos 19-615), con el cual cumple su función en el sistema renina-angiotensina hidrolizando los polipéptidos mencionados previamente. También cuenta con un dominio similar a la colectrina (DSC, residuos 616-805), constituido por un dominio de “cuello” (residuos 616-726), una región donde es clivada para ser liberada al plasma (residuos 716-741), una hélice transmembrana simple (residuos 740-762) y una cola de aminoácidos en el citoplasma celular (residuos 763-805) (Ver Figura 2) (Gross et. al., 2020).





**Figura 2: Estructura de ACE2.** A) Esquema de los dominios de ACE2. En azul, el dominio proteolítico y en cian el dominio similar a la colectrina. B) Dímero de los complejos ACE2-B°AT1 obtenida por criomicroscopía electrónica (CryoEM), indicando el dominio proteolítico (DP), el dominio símil colectrina (DSC), el dominio cuello o “neck domain”, la hélice transmembrana y la cola intracelular, donde luego se encuentra el transportador de aminoácidos B°AT1. Imagen adaptada de Gross et. al., 2020.

Trabajos realizados con proteína purificada demostraron que ACE2 se presenta como dímero (Poglitsch et. al., 2012), y que esta dimerización es mediada por la interacción entre los dominios similares a la colectrina de los monómeros de ACE2 (Yan et. al., 2020). A la vez, éstos dímeros de ACE2 se pueden presentar en dos formas diferentes, una conformación “abierta” y otra “cerrada”, donde en la abierta los dominios proteolíticos extracelulares se encuentran rotados y no están en contacto estrecho entre sí, mientras que, en la conformación cerrada, hay mayores interacciones entre los dominios proteolíticos de ambos monómeros y menor distancia entre ellos (Yan et. al., 2020).

### 2.3 Mecanismo de Infección de SARS-CoV-2

Se identificó que el dominio C-terminal (CTD) de la proteína Spike de SARS-CoV-2 es el responsable del reconocimiento del receptor en ACE2 (Wang et. al., 2020). La proteína Spike del SARS-CoV-2 forma trímeros (Wrapp et. al., 2020). También se ha demostrado que los trímeros de la proteína Spike tienden a tener una unión completa y abarcativa con los dímeros de ACE2, pero en el caso de la interacción entre un monómero de ACE2 con un trímero de Spike la unión no es del todo abarcativa y completa (Lui et. al., 2020). También se investigó la estructura cryoEM resultante de ACE2 en presencia del dominio de unión al receptor (RBD, “receptor binding domain”) de Spike, y la interacción demuestra el RBD unido con ACE2 en su conformación de dímero cerrado (Yan et. al., 2020).

Es sabido que el virus se une a un sitio particular diferente al sitio activo de ACE2 (Yan et. al., 2020). La alta afinidad entre la proteína Spike del SARS-CoV-2 y este sitio particular de ACE2 denominado sitio de unión a Spike, permiten el ingreso del virus a la célula (Wang et. al., 2020) mediante mecanismos que serán descritos en el marco teórico. A partir del conocimiento del mecanismo de infección del SARS-CoV-2 se plantearon y desarrollaron distintos tratamientos innovadores a nivel global para combatir la enfermedad que genera, incluyendo las vacunas. Se probaron distintos antivirales y antiparasitarios conocidos ya aprobados por la FDA como la Ivermectina, Hidroxicloroquina, Remdesivir, Nirmatrelvir y otros, con resultados variados. Las vacunas son una medida efectiva para la prevención de la mortalidad generada por el agravamiento de los cuadros en ciertos pacientes, demostrando una reducción de la mortalidad del 90% (Sheikh et. al., 2020). Sin embargo, la proteína Spike de las nuevas variantes delta y omicron presentan mutaciones (Kumar et. al., 2020). Estas mutaciones pueden afectar la eficacia de la vacunación generando preocupación sobre su efectividad, siendo que cada vacuna es específica para cada Spike y no protegerían contra futuras mutaciones de la misma. Sin embargo, una pequeña molécula con ACE2 como blanco terapéutico podría inhibir la infección de cualquier coronavirus que utilice esta enzima como mecanismo de entrada a la célula.

El ingreso del SARS-CoV-2 a la célula induce una disminución en la expresión de ACE2, resultando en la alteración del balance fisiológico entre Ang II y Ang 1-7, disminuyendo los efectos protectores de ACE2 frente a altos niveles de Ang II y disminuyendo la función endotelial, lo que conduce a una lesión pulmonar. (Verdecchia et. al., 2020), (Lei et. al., 2021). Este fenómeno se relaciona a las condiciones clínicas específicas que presentan los pacientes con COVID-19, como la tormenta de citoquinas y coagulopatías (Banu et. al., 2020).

Gracias a los trabajos mencionados previamente, sabemos que la infección con SARS-CoV-2 genera importantes desregulaciones a nivel fisiológico, más que nada debido a la disrupción de la funcionalidad de ACE2 lo cual genera un desequilibrio en el sistema renina-angiotensina

(Wiese et. al., 2020), un acercamiento posible como se plantea en este trabajo es hacer foco con un targeting farmacológico sobre ACE2. Generalmente, hay dos tipos de targets farmacológicos disponibles cuando una enzima juega un rol relevante en una enfermedad particular, un sitio ortostérico y un sitio alostérico (Nussinov et. al., 2012). Los fármacos diseñados para el sitio ortostérico usualmente se unen al sitio activo de la enzima mediante inhibición competitiva o no competitiva (Blat et. al., 2010). Las drogas diseñadas para sitios alostéricos se unen a estos últimos y logran modificar la funcionalidad de sitios distantes, como por ejemplo el sitio activo (Nussinov et.al., 2012) modificando su estructura y alcanzando conformaciones estables diferentes a la original. A la vez, algunas drogas alostéricas actúan como interruptores moleculares, donde un ligero cambio estructural afecta el mecanismo de interacción proteína-proteína (Wenthur et. al., 2014), lo cual es relevante a la hora de evitar el contacto entre la proteína Spike de SARS-CoV-2 y ACE2.

Se podría plantear desde lo hipotético que la presencia de un inhibidor en el sitio activo de ACE2 podría generar cambios conformacionales en el sitio de unión de Spike de SARS-CoV (Towler et. al., 2004) y a la vez generar un desplazamiento de los residuos que interaccionan con el RBD de Spike de SARS-CoV-2 (Terali et. al., 2020). Al enfocarse sobre ACE2 y no sobre la proteína Spike del virus, se obtiene el beneficio de un tratamiento más amplio en caso de la aparición de una nueva cepa o mutaciones de SARS CoV's, además de poder tratar a pacientes durante el transcurso de la infección para poder disminuir sus efectos patológicos.

Trabajos previos del grupo indican que una posible forma de abordar la problemática es mediante el uso de una droga alostérica. El alosterismo es un fenómeno donde surgen perturbaciones conformacionales entre al menos dos sitios de una proteína donde la ocupación de alguno de estos sitios genera un cambio conformacional en el otro, y viceversa. Involucra una comunicación estructural y dinámica entre ambos sitios (Gross et. al., 2020).

Gross y colaboradores plantean la presencia de 4 sitios relevantes en el dominio proteolítico de ACE2, que están presentes en la conformación abierta o cerrada del mismo. El sitio carboxipeptidasa o sitio activo, el sitio pocket/hinge o bisagra, presente únicamente en la conformación abierta de ACE2 nativa, el sitio de interacción con el RBD de Spike y el sitio de interacción del DP para estabilizar la dimerización. Varios trabajos demostraron que ACE2 presenta alosterismo en su sitio activo respecto a otros sitios, (Towler et. al., 2004; Huentelman et. al., 2004; Hernández Prada et. al., 2008; Yan et. al, 2020) Esto dio lugar a la evaluación de moléculas pequeñas que sean capaces de generar un cambio conformacional en el sitio de unión de ACE2 con la proteína Spike.

## 2.4 Docking Molecular

El docking molecular es una opción efectiva y económica de encontrar nuevas moléculas pequeñas capaces de inhibir la interacción entre proteína y virus. Es un método *in silico* para el descubrimiento de drogas ampliamente utilizado durante las últimas tres décadas (Scardino et. al., 2021). Mediante un procedimiento computacional se intenta predecir la unión e interacción de una macromolécula (receptor) con una molécula pequeña (ligando) (Trott & Olson, 2010).

La predicción de la unión de moléculas pequeñas a proteínas tiene una importancia práctica particular porque se utiliza para identificar posibles candidatos moleculares con el fin de obtener moléculas candidatas para el desarrollo de posibles nuevos fármacos. El docking también se puede utilizar para intentar predecir la conformación unida de los ligandos evaluados (Trott & Olson, 2010).

Se utiliza la estructura 3D de una proteína obtenida mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica (CryoEM) y la estructura 3D del ligando en su menor estado de energía libre para la simulación de interacciones entre la proteína y el ligando. Varias estructuras tridimensionales de ACE2 fueron publicadas en el Protein Data Bank (PDB), abriendo el camino para un enfoque de descubrimiento de drogas basado en estructuras para la identificación de moléculas candidatas a unirse con alta afinidad y selectividad a la misma. (Fiorillo et. al., 2022).

En el caso de un docking proteína-molécula, la posición, conformación y orientación de cada molécula en el sitio de unión seleccionado es evaluada, y se obtiene un cálculo estimado de su energía de unión que representa su afinidad. Los programas de docking generalmente usan una función de puntuación, las cuales simulan aproximarse a los potenciales químicos estándar del sistema (Trott & Olson, 2010). Para calcular la energía de unión, el programa tiene en cuenta las interacciones presentes, como las fuerzas de Van der Waals (dispersión/repulsión), las fuerzas electrostáticas, enlaces puente hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.

## 2.5 Ensayo de actividad de ACE2

Para verificar si los compuestos a utilizar son inhibidores, activadores, o neutros frente a la actividad de ACE2 se realizó un ensayo para determinar la actividad catalítica de la enzima en presencia de los compuestos. Se utilizó un ensayo fluorimétrico con ACE2 recombinante en presencia de un péptido sustrato quencheado (Mca-A-P-K(Dnp)) que es capaz de ser clivado por la enzima. Al ser clivado, la fluorescencia del péptido deja de ser bloqueada por el quencher (Dnp) y la metoxicumarina (Mca) es capaz de emitir fluorescencia a una longitud de onda específica (Xiao et al., 2017).

## 2.6 Ensayo AlphaSCREEN

Este ensayo nos permite estudiar interacciones entre biomoléculas. Se basa en dos “beads” específicos y diferentes, los cuales se denominan “bead aceptor” y “bead donante”. El bead donante se une a una de las moléculas de interés, y mediante excitación con luz a 680 nm genera oxígeno singlete excitado, que se puede difundir 200 nm en solución antes de volver a su estado normal (Ver Figura 3). El bead aceptor se une a la otra biomolécula de interés, y si está a menos de 200 nm de un bead donante que generó oxígeno singlete, éste le transfiere su energía al bead aceptor, que genera una emisión de luz. Si ambas biomoléculas están en proximidad debido a su interacción, los beads generarán una emisión de luz, de lo contrario, si no hay interacción entre las biomoléculas de interés, no habrá emisión de luz.

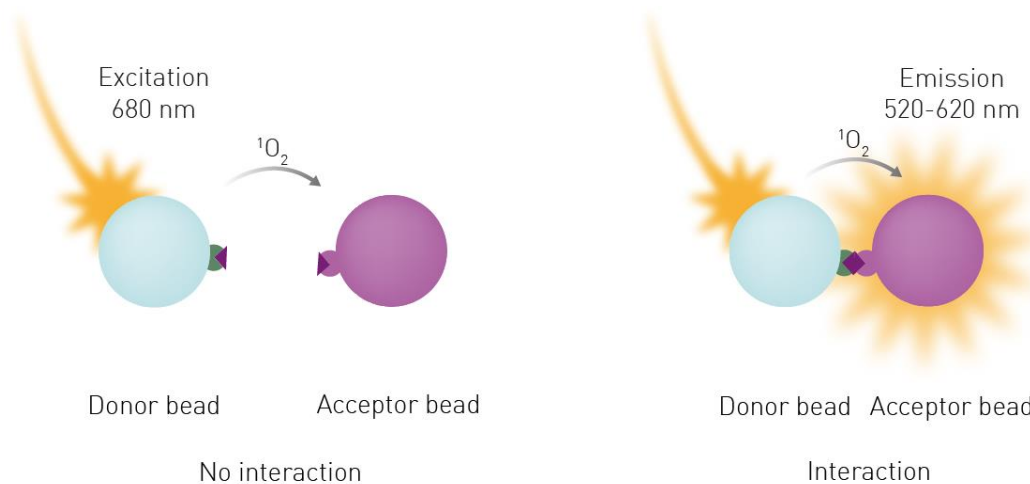


Figura 3: Imagen representativa del funcionamiento del ensayo AlphaScreen. La excitación de luz con una longitud de onda de 680 nm, estimula a que el bead dador (Donor bead) produzca  $^1O_2$ . En caso de haber interacción, se genera un puente entre los dos beads y el bead aceptor (Acceptor bead) reacciona químicamente con  $^1O_2$  el generando la producción de luz con longitud de onda entre 520 y 620 nm.

## 2.7 Ensayo de Desnaturalización Térmica

Para determinar la desnaturalización de la proteína se decidió optar por una Fluorimetría diferencial de barrido o en inglés, Differential Scanning Fluorimetry (DSF). Es una técnica biofísica ampliamente utilizada para seguir la estabilidad térmica y el “folding y unfolding” de las proteínas. Se puede monitorear el proceso de desnaturalización de la proteína a lo largo de un aumento de temperatura midiendo los cambios en la fluorescencia que ésta genera.

Otros cambios en el ambiente de la proteína, como en nuestro caso la presencia de una molécula capaz de generar un complejo (complejo ligando-proteína), pueden estabilizar a la proteína mediante una reducción de la energía libre de Gibbs. Esta reducción se produce por nuevas interacciones (puentes de hidrógeno, Van der Waals) entre ligando-proteína o un reordenamiento conformacional de la proteína. Esto resulta en un aumento de la  $T_m$ , o “melting temperature” de la proteína, que indica la temperatura en la cual el 50% de la proteína se encuentra plegada y el otro 50% no plegada (Lo, 2004, como se cita en Gao, 2020).

Al realizar una medición de la  $T_m$  con cambios en el ambiente o en ausencia y presencia de los posibles ligandos, nos permite estimar el desplazamiento de la misma (Scott, 2016, como se cita en Gao, 2020), si es que hay desplazamiento. Este desplazamiento puede ser generado por la formación de un complejo o por estabilización térmica, lo que aumenta la estabilidad de la proteína modificando su  $T_m$ . En conclusión, si se observa un desplazamiento en la  $T_m$ , se puede atribuir a la formación de un complejo.

### **3 Marco Teórico/Antecedentes**

#### **3.1 Estructura y Dinámica de ACE2**

En este apartado se profundizará sobre la estructura y dinámica de ACE2. Se ha mencionado previamente en la introducción, en el apartado de bioquímica estructural de ACE2, que la enzima presenta una dinámica particular. Primero abordaremos la “hinge-bending motion” o flexión de bisagra que presenta el dominio proteolítico (DP), primeramente descrita por Towler et. al. en 2004. En su trabajo, logra obtener las dos primeras estructuras cristalinas de la proteína, una en su conformación nativa (Ver Figura 4) (PDB ID: 1R42) y otra en su conformación con un inhibidor unido en su sitio catalítico (PDB ID: 1R4L).

La región extracelular de ACE2 está constituida por dos dominios, el dominio metalopeptidasa con Zinc o dominio proteolítico, con una similaridad del 42% con el correspondiente de ACE, y el dominio similar a la colectrina en un 48%, situado en el extremo C terminal. Al hacer un análisis de la estructura del DP, se puede realizar una división del mismo en dos subdominios I y II, que entre sí forman el espacio de hendidura donde ocurre la actividad catalítica (sitio activo) (Towler et. al., 2004).

Al hacer una comparación entre ambas conformaciones (nativa VS. en presencia de un inhibidor en su sitio activo), se puede observar que hay una flexión y movimiento de uno de los subdominios del DP respecto del otro subdominio, generada por la presencia del inhibidor, y esta capacidad de flexión de la enzima es lo que permite que ciertos residuos críticos se posicionen correctamente para la catálisis de los sustratos (Towler et. al., 2004).

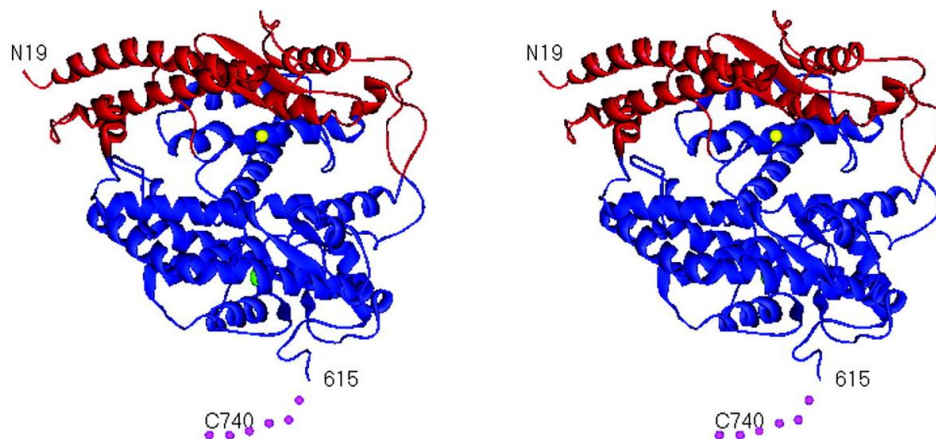


Figura 4: Representación de la estructura secundaria de ACE2 nativa mostrando los subdominios del dominio proteolítico. En rojo se observa el subdominio I, ubicado en el sitio N-terminal, compuesto por los residuos 19-102, 290-397, 417-430, y que contiene el ión Zinc (esfera amarilla), el cual es coordinado por los residuos His 374, His 378, Glu 402. En azul, el subdominio II ubicado en el sitio C-terminal compuesto por los residuos 103-289, 398-416, 431-615. La esfera verde representa el ión cloruro necesario para la actividad de ACE2. Fuente: Towler et. al. 2004.

Es posible observar en la Figura 5 una clara diferencia en la distancia que separa a los subdominios en la estructura nativa de ACE2 respecto a la distancia que los separa en su estructura con un inhibidor presente en el sitio activo. Estos subdominios sufren un movimiento de flexión de bisagra dependiente de la presencia del inhibidor de unos  $16^\circ$ , y esto es observable cuando se superponen las estructuras del dominio proteolítico en presencia y ausencia del inhibidor (Towler et. al., 2004).

Towler et. al., 2004 menciona los residuos críticos que interaccionan con MLN-4760, y van a ser relevantes para nuestro trabajo. Menciona a la esfera de coordinación del Zinc (HIS 374, HIS 378, GLU 402), que se une con uno de los grupos carboxilato presente en MLN-4760, y otros residuos que presentan enlaces de puente hidrógeno con MLN-4760 (ARG 273, HIS 505, HIS 345, PRO 346, THR 371, TYR 515, GLU 375). Además de los residuos que presentan enlaces puente hidrógeno, otros 11 residuos están a una distancia menor de  $4,5 \text{ \AA}$ , que proveen interacciones electrostáticas y de Van der Waals importantes. Estudios posteriores demostraron mediante experimentos de mutagénesis que ARG 273 presenta un rol crítico en el reconocimiento y unión del sustrato, tanto que su reemplazo causa que la actividad enzimática sea nula (Guy et. al., 2005). Otros residuos relevantes del sitio activo son HIS 345 que actúa como donante/aceptor del puente hidrógeno en la formación del intermediario peptídico tetraédrico, GLU 375 que actúa como una base y activa el nucleófilo agua unido al zinc, e HIS 505, que también está involucrado en la catálisis (Terali et. al., 2020)



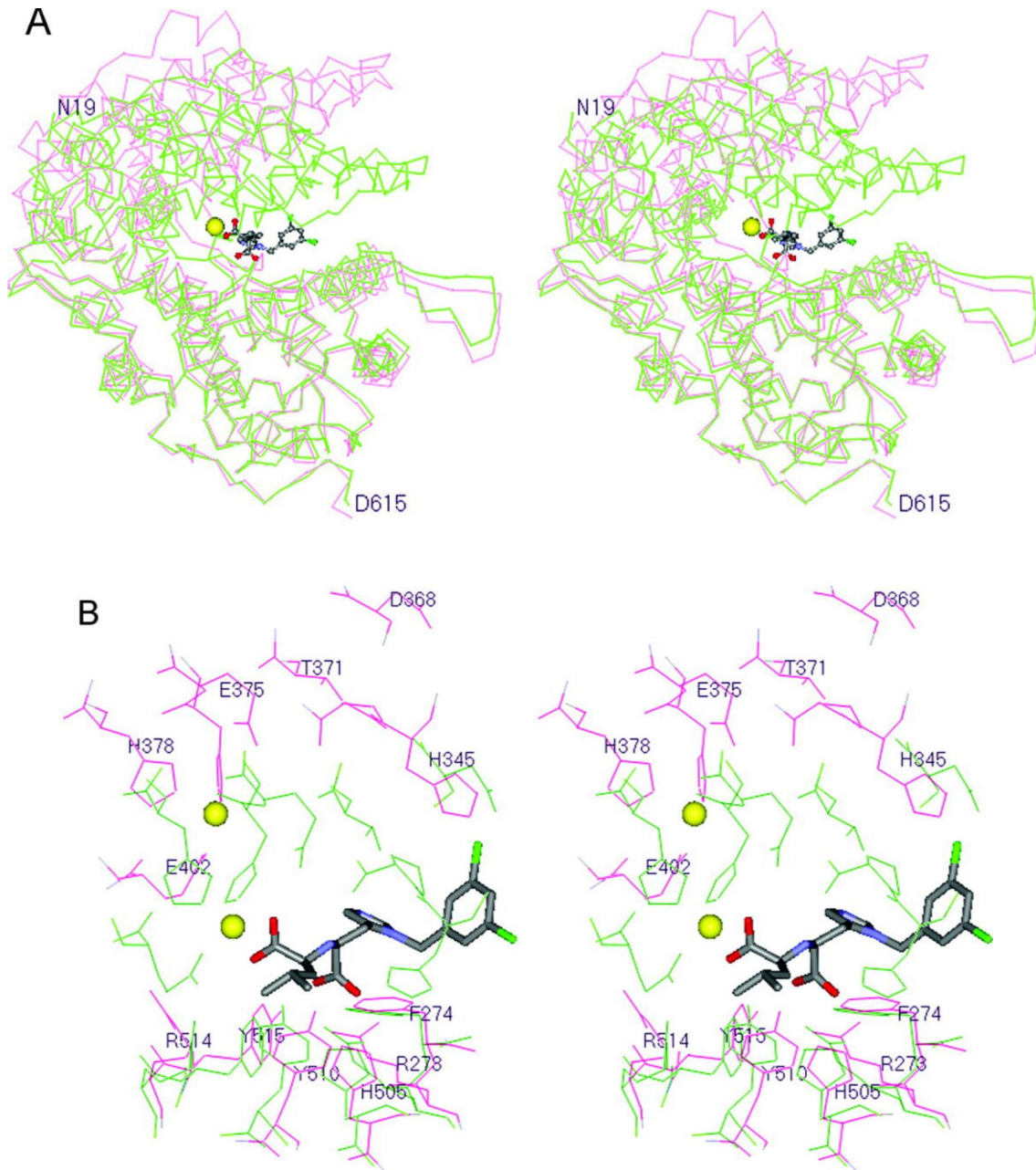


Figura 5: Movimientos de ACE2 en presencia del inhibidor MLN-4760. A) Imagen del dominio proteolítico de la estructura nativa (violeta) y en presencia del inhibidor (verde) de ACE2, con el ión Zinc (esfera amarilla) y el inhibidor MLN-4760. Se puede observar claramente que el subdominio II (parte inferior) se mantiene relativamente sin cambios significativos, mientras que el subdominio I (parte superior) se moviliza para “cerrar” las distancias en presencia del inhibidor, similar a un movimiento de “Pac-Man”. B) Al realizar un acercamiento de la imagen del panel A, se observa en detalle el desplazamiento (entre 6-9 Å) que sufren los residuos del subdominio I (parte superior) del dominio proteolítico. Fuente: Towler et. al., 2004.



En resumen, se logra remarcar las diferencias entre los residuos de los sitios activos de ACE y ACE2, y se presume que estas variaciones en los residuos juegan un rol significativo en la especificidad del sustrato y la unión de inhibidores en estas enzimas homólogas, justificando por qué los inhibidores de ACE no presentan efecto en ACE2, a pesar de la similitud entre ambos sitios activos (Towler et. al., 2004).

### 3.2 Dimerización de ACE2

Otra dinámica a remarcar de ACE2 es que forma homodímeros (Ver Figura 6). Recientemente, se logró elucidar la estructura de ACE2 en complejo con B<sup>o</sup>AT1, un transportador de aminoácidos, mediante criomicroscopía electrónica, demostrando que ACE2 forma un complejo con B<sup>o</sup>AT1. Este transportador estabiliza el dominio cuello o “neck domain” y la hélice transmembrana de ACE2, permitiendo la dimerización (Yan et. al., 2020).

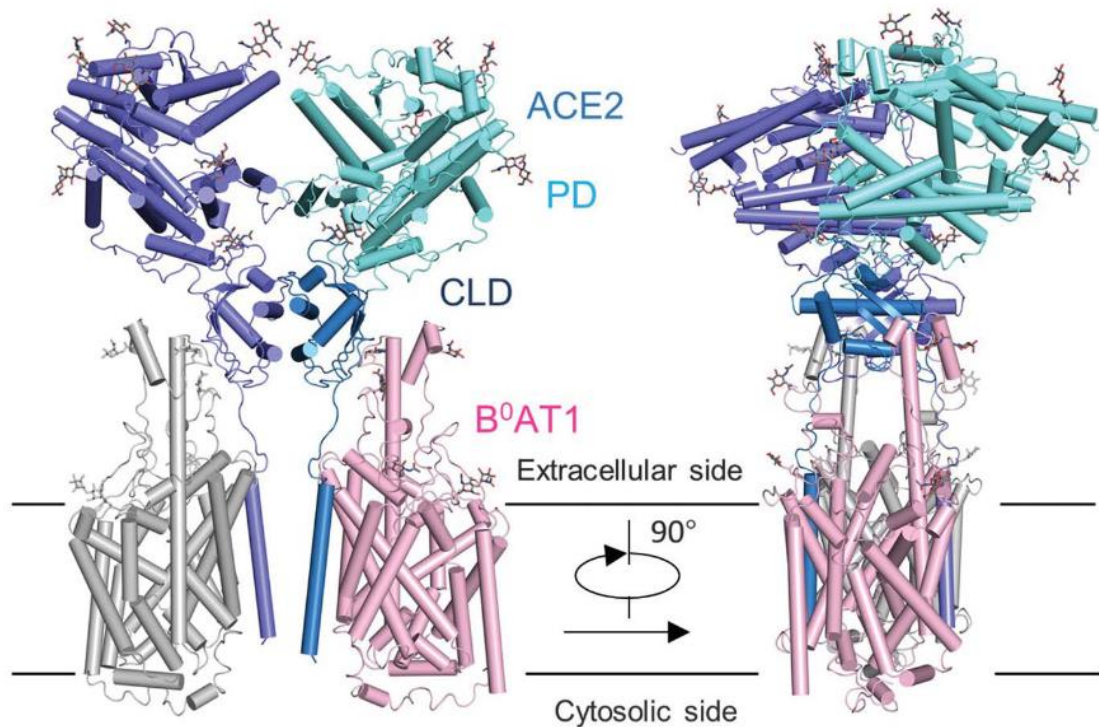


Figura 6: Representación del modelo atómico del complejo ACE2-B<sup>o</sup>AT1 y su homodímero. PD: Dominio Proteolítico. CLD: Dominio Similar a la Colectrina. Fuente: Yan et. al., 2020.

El complejo ACE2-B<sup>o</sup>AT1 forma un homodímero con otro complejo ACE2-B<sup>o</sup>AT1, el cual es estabilizado por interacciones entre los dominios similar colectrina, que interaccionan entre sí, y una interacción menor de los DP's. Estos homodímeros resultantes pueden tener dos conformaciones, “abierta”, donde los DP se encuentran separados y no interaccionan entre sí, y la conformación “cerrada”, donde los DP's presentan esa interacción menor antes mencionada (Ver Figura 7). En la conformación abierta, la interacción entre ambos DP's se ve

afectada debido a la rotación de los mismos respecto a los dominios símil colectrina, separándolos unos 25 Å y perdiendo la interacción. El dímero resulta estable todavía debido a la fuerte interacción entre los dominios cuello que son los principales responsables de la formación del dímero (Yan et. al., 2020).

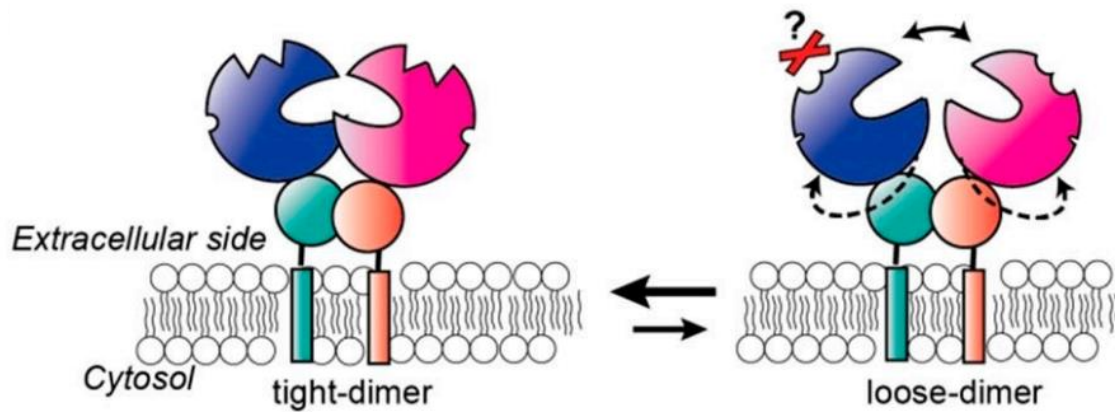


Figura 7: Equilibrio entre el homodímero de ACE2 en su conformación “cerrada” (izquierda) y en su conformación “abierta” (derecha). En azul y rosa se representan los DP’s de cada proteína involucrada en la formación del dímero. Fuente: Gross et. al., 2020.

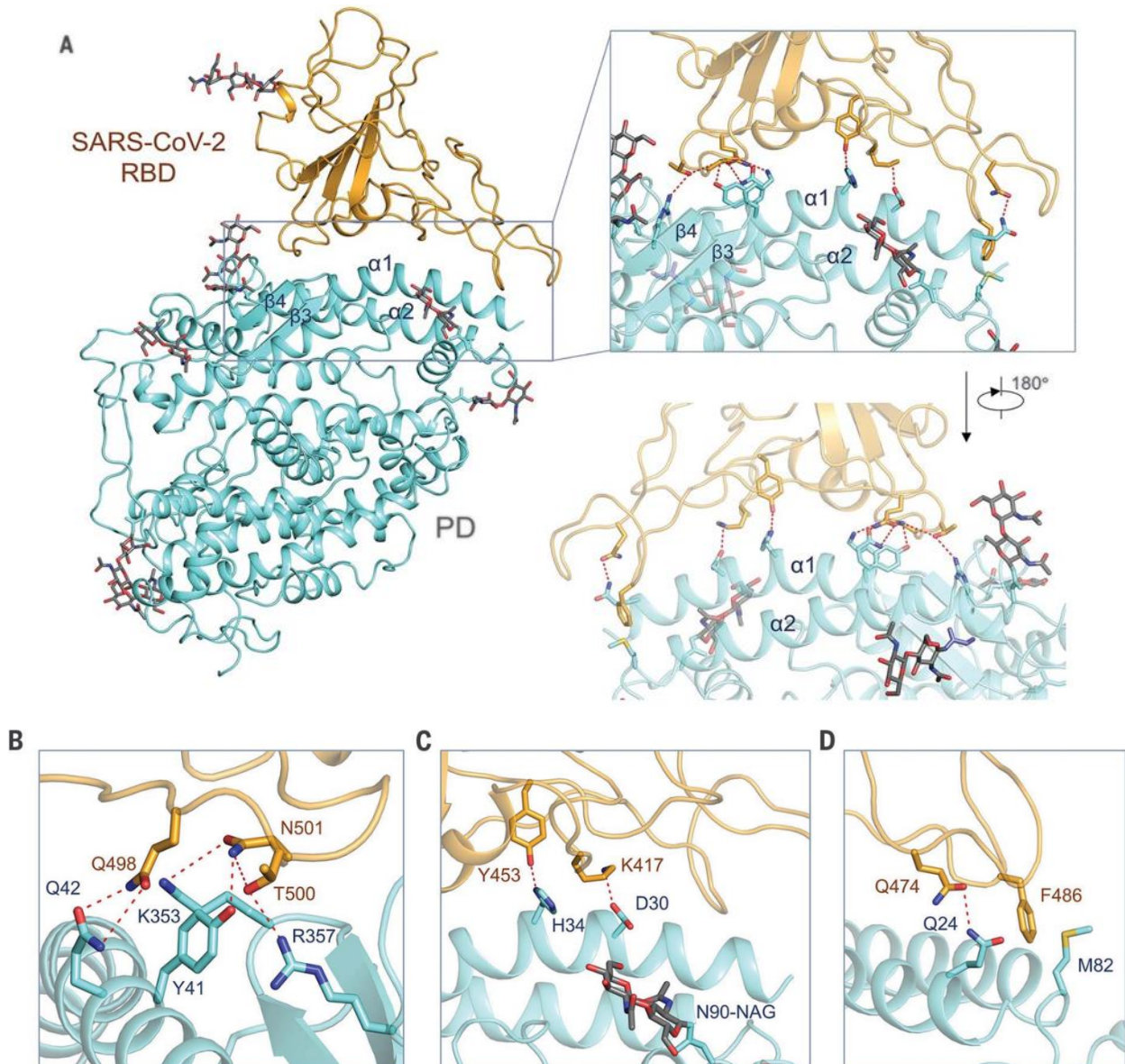
### 3.3 Interacción ACE2/SARS-CoV-2

Un análisis bioinformático revela que la proteína Spike de SARS-CoV-2 presenta características similares a las proteínas Spike de otros CoV’s, incluyendo un dominio S1 que contiene al subdominio N-terminal y al subdominio C-terminal (CTD), un dominio S2 y un dominio citoplasmático pequeño (Wang et. al., 2020). En trabajos previos se demostró que el dominio C-terminal de Spike de SARS-CoV es el que funciona como reconocimiento del receptor (Li et. al., 2005, Wang et. al., 2020).

Mediante citometría de flujo, se logró identificar que el CTD de Spike de SARS-CoV-2 es el responsable del reconocimiento del receptor ACE2, al igual que en Spike de SARS-CoV. En un análisis más profundo sobre las interacciones del complejo ACE2-RBD de Spike de SARS-CoV-2 (Ver Figura 8) se denota una serie de sólidas interacciones como puentes salinos y enlaces puente hidrógeno entre los residuos de ambas partes, determinando que la interacción es dominada por contactos polares entre residuos hidrofílicos. Además, estos residuos (GLN24, ASP30, GLU35, GLU 37, ASP38, TYR41, GLN42, TYR83, GLN325, GLU329, ASN330, LYS353, ARG393) de ACE2 que están involucrados en las interacciones con el CTD de Spike se encuentran la gran mayoría en el subdominio I del DP (Wang et. al., 2020).

Al realizar una comparación entre Spike de SARS-CoV-2 y Spike de SARS-CoV ambas unidas con ACE2, el dominio CTD de Spike de SARS-CoV-2 presenta 21 residuos que tienen

interacciones directas con ACE2, mientras que el RBD de Spike de SARS-CoV presenta 17, haciendo una diferencia de 288 vs 213 (interacciones Van der Waals (VdW)) y 16 vs 11 (interacciones puente H), a favor del CTD de SARS-CoV-2. Al tener mayores interacciones, el dominio CTD de SARS-CoV-2 demuestra 4 veces más afinidad por ACE2 que el RBD de SARS-CoV (Wang et. al., 2020).



**Figura 8: Estructura del complejo ACE2-B\*AT1-RBD obtenida por CryoEM.** A) Imagen del complejo completo donde se observa las hélices y hebras del DP de ACE2 que interactúan mediante enlaces puente hidrógeno (línea guionada roja) con RBD. ACE2-B\*AT1 (cian), RBD de SARS-CoV-2 (dorado). B) a D): Análisis detallado de las interacciones entre las superficies del RBD de SARS-CoV-2 y ACE2. Las interacciones polares se indican con una línea roja guionada. NAG, N-acetilglucosamina. Fuente: Yan et. al., 2020.

La proteína Spike de SARS-CoV utiliza la serino proteasa TMPRSS2 para ser cebada o “primeada” y así poder realizar la fusión con la membrana celular mediada por la subunidad S2 de Spike (Glowacka et. al., 2011, como se citó en Hoffman et. al., 2020). A la vez, en Spike de SARS-CoV-2, una vez que hay una fuerte interacción entre el CTD del sitio S1 y los residuos de ACE2, esta serino proteasa permite el “priming” o activación de la subunidad S2 de Spike encargada de la fusión con la membrana celular, permitiendo la entrada a la célula y promoviendo la replicación viral (Matsuyama et. al., 2020). Una vez unida a ACE2 debido a las interacciones del CTD del subsitio S1 de Spike con la enzima, la proteína de SARS-CoV-2 debe ser cebada o sufrir un “priming” por parte de las proteasas celulares para poder realizar la fusión de la membrana viral con la celular, la cual es mediada por la subunidad S2 de Spike (Hoffman et. al., 2020).

Una vez resuelta la estructura del complejo ACE2-B<sup>o</sup>AT1-RBD de Spike de SARS-CoV-2, se identificó que solo la estructura “cerrada” del homodímero de ACE2-B<sup>o</sup>AT1 es la que interacciona con el RBD de Spike. Cada DP es capaz de acomodar un RBD de Spike, y la interacción es generalmente similar a la de Spike de SARS-CoV con ACE2, mediada principalmente por interacciones polares. Una región de bucle del RBD se extiende como si fuera un puente sobre la hélice  $\alpha_1$ , que se encuentra “arqueada”, y la hélice  $\alpha_2$  y las hebras antiparalelas  $\beta_3$  y  $\beta_4$  también presentan interacciones menores para la coordinación con el RBD (Yan et. al., 2020).

### **3.4 Antecedentes de Docking molecular con búsqueda de reguladores de ACE2**

Desde el descubrimiento de ACE2 y debido a su importancia y desempeño como regulador de la fisiología cardiovascular, hay varios antecedentes de búsqueda de un modulador de la actividad de ACE2 además de MLN-4760. En el siguiente apartado, se hace un repaso general de los trabajos donde se logró encontrar un modulador *in vitro* de la actividad enzimática de ACE2, y en algunos casos disminuyendo la presión sanguínea de ratones *in vivo*.

Una de las primeras búsquedas de un inhibidor de ACE2 se centró en un docking molecular en el sitio activo de la enzima en su conformación cerrada (PDB ID:1R4L) y a la vez se buscó evaluar su capacidad de bloquear la fusión celular de la proteína Spike de SARS-CoV (Huentelman et. al., 2004). En dicho trabajo, identifican un inhibidor de la actividad enzimática de ACE2, N-(2-aminoetil)-1 aziridina-etanamina (NAAE), capaz de lograr una IC<sub>50</sub> de 57±7  $\mu$ M, y a la vez, capaz de bloquear la fusión celular de Spike de SARS-CoV en concentraciones en el rango micromolar.

Huentelman y colaboradores sugieren que al haber un movimiento de “flexión de bisagra” por parte de la enzima en presencia de un inhibidor (NAAE), se puede generar un cambio



conformacional en los residuos de ACE2 que interaccionan con la proteína Spike de SARS-CoV, lo que logra inhibir su unión con ACE2 (Huentelman et. al., 2004) e indica una posible comunicación alostérica entre el sitio activo y el sitio de interacción con Spike (Ver Figura 9).

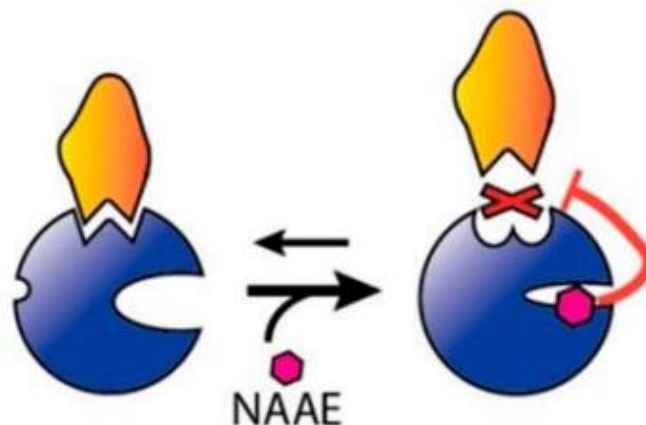


Figura 9: Posible mecanismo acción de NAAE sobre la interacción entre ACE2 y Spike de SARS-CoV. Es importante remarcar que este mecanismo de acción se deduce de un trabajo bioquímico y no está validado estructuralmente. La flecha roja indica inhibición alostérica. Fuente: Gross et. al., 2020.

Hernandez Prada y colaboradores realizaron una búsqueda de activadores de ACE2 mediante un docking molecular *in silico* en sitios distintos al sitio activo, seguido de un ensayo de actividad para los compuestos con mejor energía de unión y una posterior evaluación de la capacidad de estos compuestos de revertir los efectos de las patologías inducidas por la hipertensión en ratones *in vivo* (Hernández Prada et. al., 2008).

Se eligieron tres sitios distintos de la enzima (Ver Figura 10) para probar afinidad con los compuestos a evaluar, basándose en la diferencia de volumen disponible entre la conformación abierta y la conformación cerrada. Uno de los sitios que elige para realizar el docking molecular (sitio 1) es en la estructura nativa (abierta) de ACE2 (PDB ID:1R42), en la región bisagra entre los subdominios I y II del dominio proteolítico. Este sitio no está “disponible” en la conformación cerrada de ACE2, y las moléculas que se eligieron para afinidad con el mismo son pequeñas y con características de droga. Los otros dos sitios se encuentran en la conformación de ACE2 en presencia de un inhibidor (cerrada, PDB ID:1R4L), encontrándose uno en posición distal respecto al sitio activo (sitio 2), y el otro en la entrada del sitio activo entre el subdominio I y II (sitio 3). Los compuestos utilizados para el docking en los sitios 2 y 3 tienen características de péptidos y resultan más voluminosos que los del sitio 1 (Hernández Prada et. al., 2008).

Los compuestos que obtuvieron mejor energía de unión fueron evaluados *in vitro* con un ensayo de actividad (Mca-YVADAPK(Dnp)-OH, sustrato) para verificar su habilidad de regular la actividad de ACE2. Finalmente se hallaron dos compuestos, xantenona Y

resorcinolnaftaleína, que se unen al sitio 1 (región bisagra) capaces de aumentar la actividad de ACE2 de 1,8 a 2,2 respecto al control. Los valores de EC50 (capacidad de aumentar en un 50% la actividad) de estos compuestos son de 20  $\mu$ M aproximadamente. La xantenona fue evaluada en un ensayo con ratones *in vivo* y se demostró que genera una reducción significativa de la presión sanguínea y del ritmo cardíaco (Hernández Prada et. al., 2008).

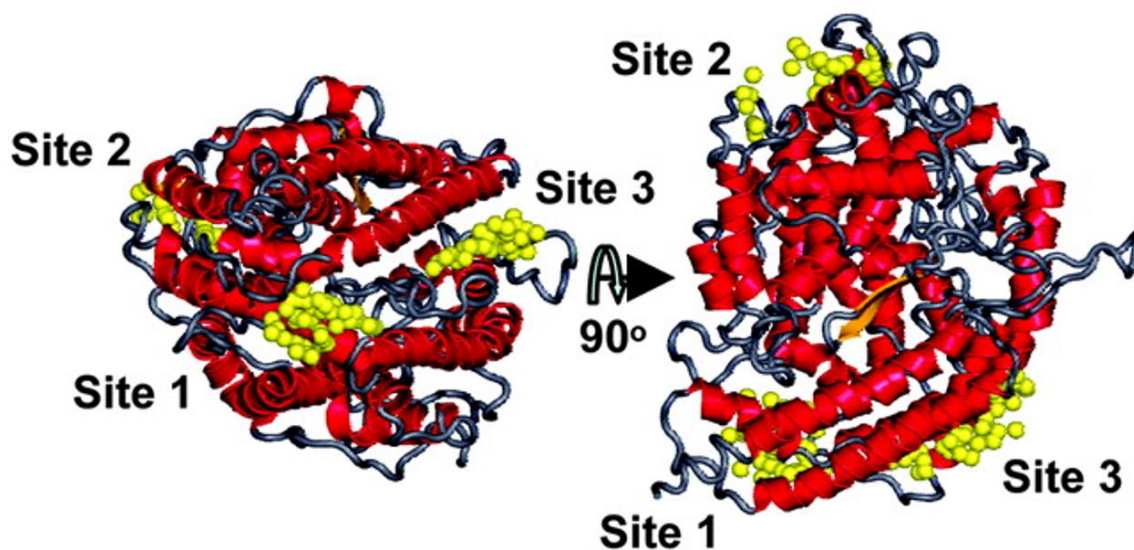


Figura 10: Estructura del DP de ACE2 donde se detallan los sitios utilizados por Hernández Prada y colaboradores en su búsqueda de activadores. Los cúmulos de esferas amarillas representan el volumen del sitio donde las moléculas del docking pueden ubicarse. La enzima es ACE2 en su conformación cerrada. Fuente: Hernández Prada et. al., 2008.

Una observación remarcable de éste trabajo es que el 20% de los compuestos dockeados en el sitio 1 (región bisagra) son capaces de aumentar la actividad de ACE2, mientras que los compuestos apuntados a los sitios 2 y 3 no aumentan la actividad de ACE2. A partir de esto, se hipotetizó que estos resultados se deben a que al apuntar al sitio bisagra de ACE2 con pequeñas moléculas con características de medicamentos, se genera un cambio conformacional en la enzima que cambia el equilibrio conformacional de la misma favorablemente para su actividad (Ver Figura 11). Esto sugiere que este sitio puede ser una región o “pocket” viable como blanco terapéutico (Hernández Prada et. al., 2008). La relevancia del sitio bisagra también está apoyada por otros análisis bioquímicos y de biología estructural publicados por nuestro grupo de trabajo (Gross et. al., 2020).

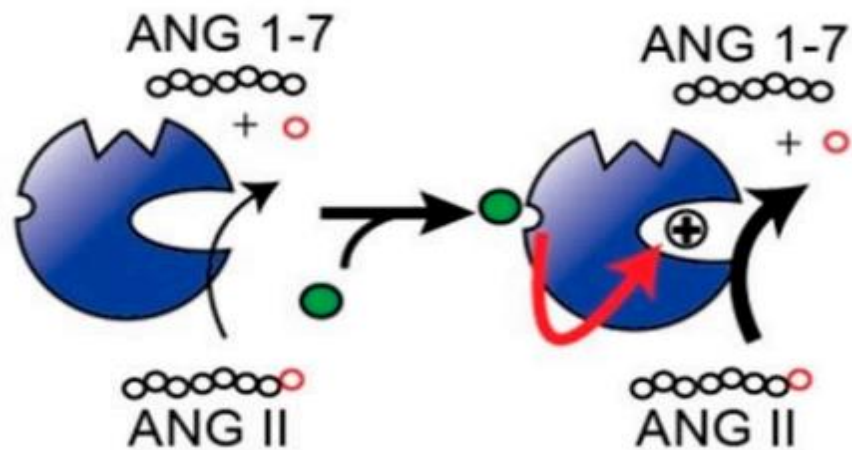


Figura 11: Posible mecanismo de acción de la xantenona o resorcinolnaftaleína (verde) para la activación de ACE2. Nuevamente tener en cuenta que este mecanismo se deduce de la bioquímica de ACE2 y no está validado estructuralmente. La flecha roja indica activación alostérica. Fuente: Gross et. al., 2020.

El trabajo de Kulemina et. al., 2011, es una continuación del trabajo analizado previamente, donde se realizó un docking molecular *in silico* de nuevos compuestos en el sitio de la región bisagra (Ver Figura 12) el cual demostró ser un posible blanco terapéutico para la búsqueda de activadores. Los compuestos con mejor energía de unión al sitio fueron evaluados para verificar su capacidad de modulación de ACE2 en un ensayo de actividad enzimática.

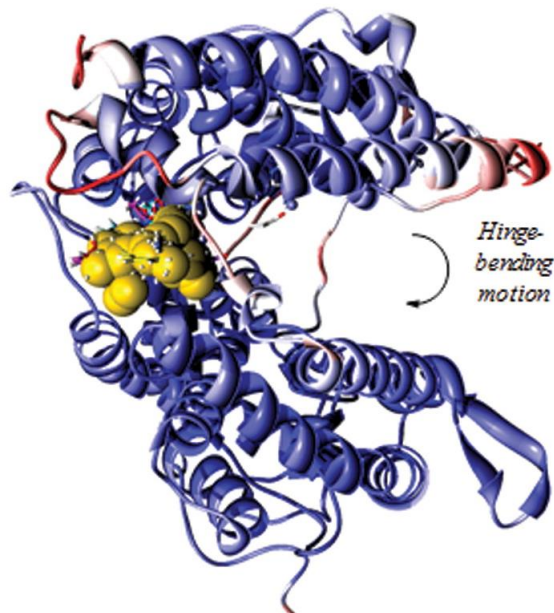
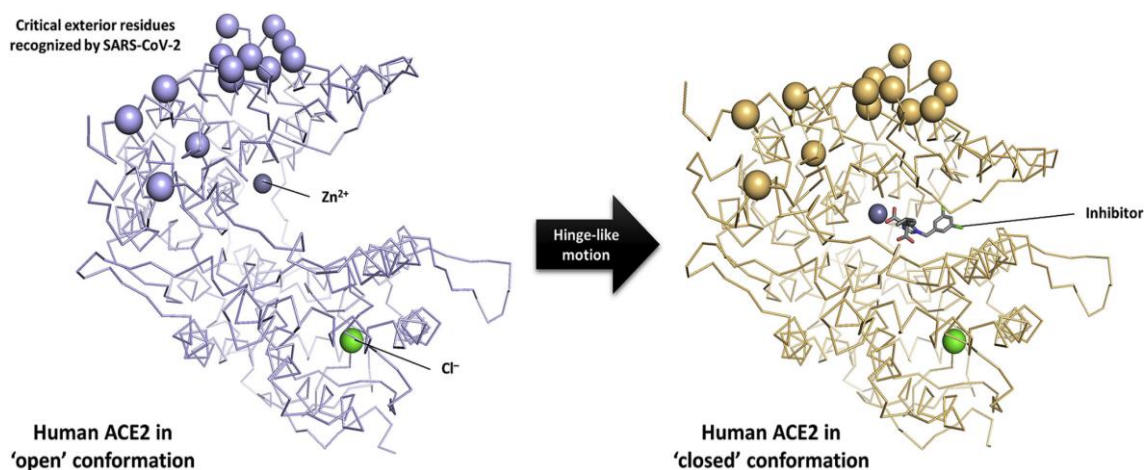


Figura 12: Estructura de ACE2 donde se detalla el sitio bisagra utilizado por Kulemina et al. Los residuos del sitio usado para el docking molecular de los compuestos *in silico* están marcados con esferas amarillas. Fuente: Kulemina 2011, Imagen modificada.

Se comprobó un aumento de la actividad de ACE2 en presencia de tres compuestos aprobados por la FDA con una EC50 (concentración necesaria para alcanzar un aumento del 50% en la actividad) de 8  $\mu\text{M}$  aproximadamente, al modificar ambas  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$ , siendo el compuesto aceturato de diminazeno (DIZE) el activador más potente. Nuevamente estos resultados sugieren una comunicación alostérica entre esta región bisagra y el sitio activo. Sin embargo, el aumento de la actividad enzimática generado por el compuesto DIZE es controversial, ya que se ha demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro* que no hubo un efecto significativo en la actividad enzimática de ACE2 (Rajapaksha et. al., 2018).

### 3.5 Antecedentes más recientes

Antecedentes más recientes utilizan a ACE2 como un blanco terapéutico para el tratamiento del COVID-19. Se hicieron varios ensayos donde se realiza una búsqueda mediante docking molecular de compuestos que presenten afinidad, y luego se analiza su capacidad de regular a ACE2, sea inhibición o activación de la enzima. La validación de la metodología utilizada se realizó mediante el redocking de MLN-4760 para corroborar la reproducibilidad con la estructura cristalina 1R4L comparando los valores de la desviación media de la raíz de los cuadrados, o en inglés root mean square deviation (RMSD) entre MLN-4760 posicionado por el ensayo de docking y MLN-4760 cristalizado (Ver Figura 15).



**Figura 13: Efecto de la unión del inhibidor MLN-4760 sobre la estructura de ACE2.** Diferencia entre ACE2 nativa (izquierda, azul PDB ID:1R42) y ACE2 en presencia del inhibidor MLN-4760 (derecha, dorado PDB ID:1R4L). Se puede observar la flexión “bisagra” generada por la presencia del inhibidor MLN-4760 y el desplazamiento de los residuos críticos que interactúan con Spike de SARS-CoV-2 (esferas). Fuente: Terali et. al., 2020.

Una vez identificados, se logró observar el desplazamiento de los residuos polares de ACE2 que interactúan con Spike de SARS-CoV-2 cuando MLN-4760 se encuentra inhibiendo el sitio activo, y se identificó un desplazamiento medio de los mismos de 7 Å (Ver Figuras 13 y



14), sugiriendo que estos desplazamientos pueden interrumpir la unión con Spike de SARS-CoV-2.

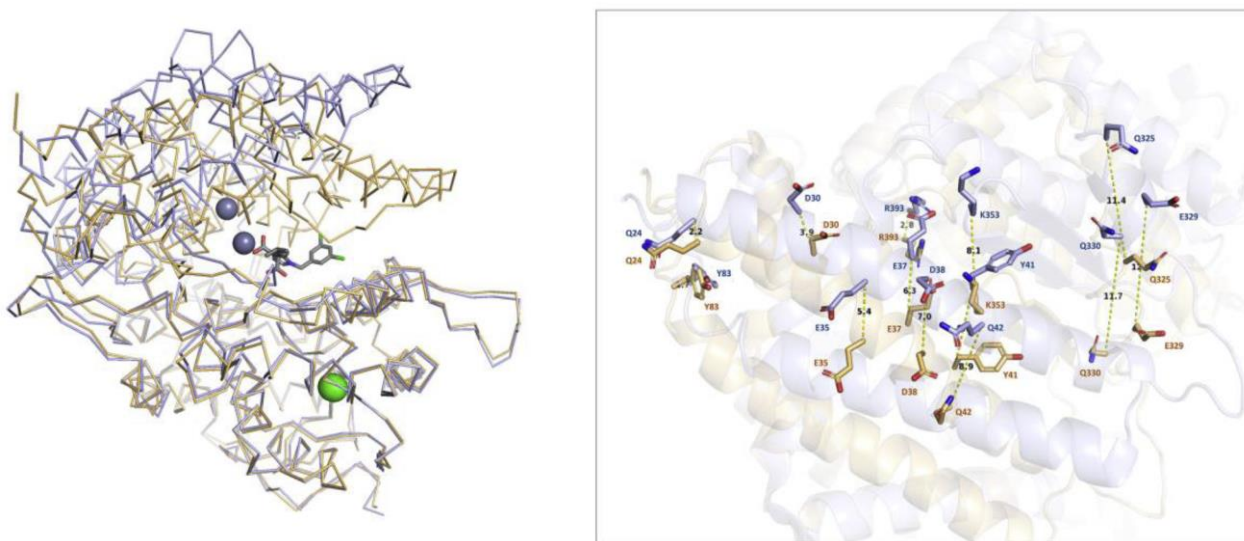


Figura 14: Efecto de la unión del inhibidor MLN-4760 sobre el movimiento bisagra de la estructura de ACE2. A la izquierda se observa la superposición de la conformación de ACE2 nativa (azul) y ACE2 en presencia del inhibidor MLN-4760 (dorado), dejando en evidencia el desplazamiento de la flexión bisagra. A la derecha se observa el desplazamiento que sufren los residuos polares que interaccionan con Spike de SARS-CoV-2 en presencia del inhibidor MLN-4760. Fuente: Terali et. al., 2020.

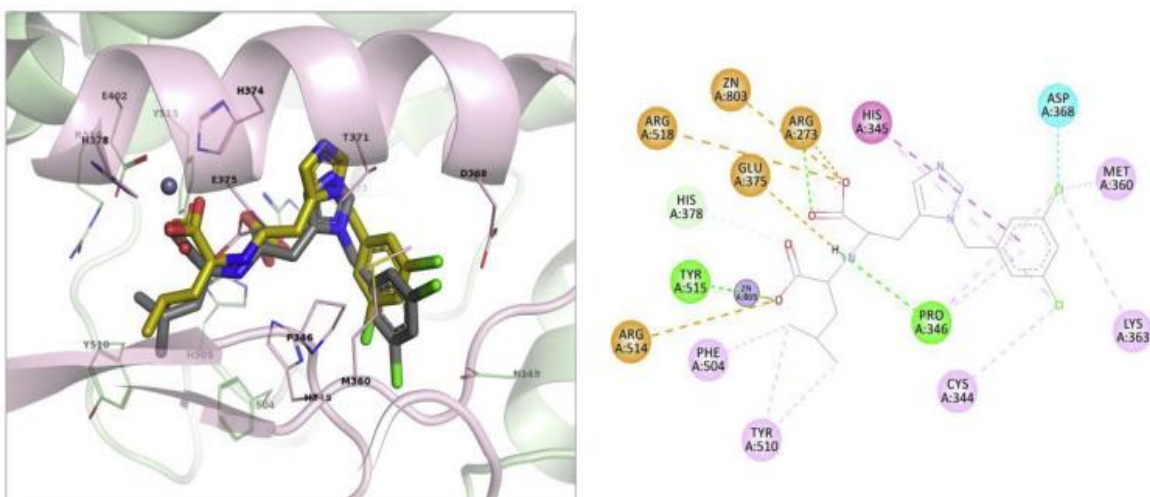


Figura 15: Comparación de la posición del MLN-4760 en la estructura cristalina y del obtenido por docking molecular *in silico*. Izquierda: Superposición del inhibidor MLN-4760 cristalizado en complejo con ACE2 (gris) y MLN-4760 redockeado (dorado) para justificación de un correcto docking. Derecha: Interacciones en 2D que presenta MLN-4760 cristalizado en complejo con ACE2. En naranja, las interacciones iónicas, en verde, las interacciones puente hidrógeno. Fuente: Terali et. al., 2020.

Se realizó un docking molecular de una biblioteca de compuestos en la búsqueda de alguno que sea capaz de interrumpir la entrada de SARS-CoV-2 a la célula. Se obtuvo un análisis de las interacciones favorables de los compuestos con mejor energía de unión con los residuos críticos del sitio activo, y se compararon con las interacciones que presenta MLN-4760, inhibidor de ACE2. Se encontraron 8 posibles candidatos con interacciones similares a MLN-4760 en el sitio activo y son sugeridos como posibles drogas capaces de estabilizar la conformación cerrada de ACE2, generando así el desplazamiento en los residuos de la misma que interaccionan con el RBD de Spike (Terali et. al., 2020).

Posteriormente, se analizaron las interacciones entre MLN-4760 y ACE2. Se logró establecer que hay interacciones iónicas entre las cargas negativas de los grupos carboxilato y las cargas positivas presentes en las cadenas laterales de ARG 518, ARG 514 y ARG 273 e interacciones puente hidrógeno entre el grupo amino secundario de MLN-4760 y PRO 346 y entre otro grupo carboxilato y TYR 515 (Terali et. al., 2020).

Más recientemente, Shin y colaboradores realizaron un screening sobre una biblioteca propia de compuestos heterocíclicos en busca de moduladores alostéricos que pudieran romper la unión de ACE2/Spike haciendo blanco en ACE2 (Shin et. al., 2022). Los compuestos fueron evaluados mediante un ensayo de actividad y un ensayo ELISA para corroborar la actividad de ACE2 en presencia de pequeñas moléculas y la unión del RBD de Spike con ACE2 respectivamente. Se identificó una molécula capaz de mantener la actividad de ACE2 a niveles normales y que a la vez irrumpe la unión con Spike de SARS-CoV-2 con una eficacia mayor al 60% en concentraciones de 6.25  $\mu$ M.

Otro trabajo reciente destaca el potencial terapéutico que podría presentar un activador de ACE2, los cuales son limitados, difíciles de dosificar debido a su citotoxicidad y controversiales respecto a su eficacia. No sólo para aliviar los síntomas de la hipertensión y proteger contra la insuficiencia cardíaca, sino también para evitar la infección del SARS-CoV-2 mediante un cambio conformacional en la enzima debido a la presencia de dicho activador (Fiorillo et. al., 2022).

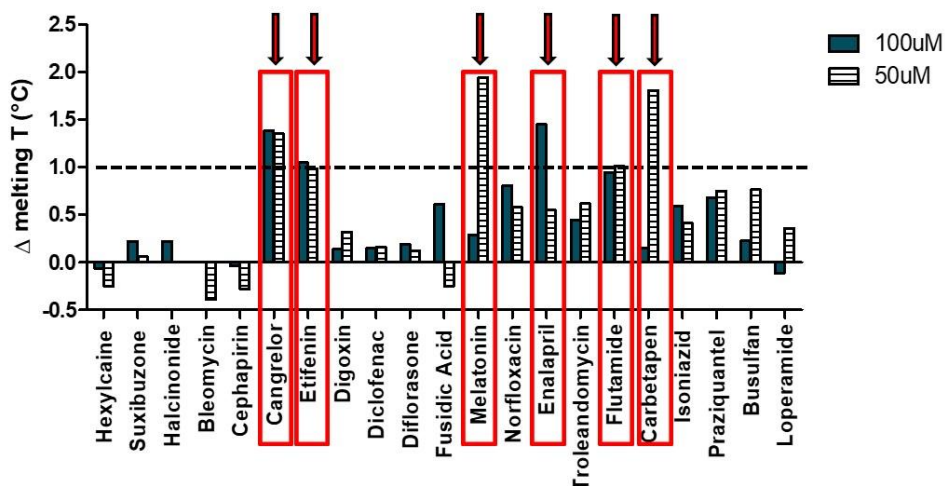
Dicho trabajo se concentra en la búsqueda de activadores mediante un "screening virtual o basado en estructuras para el descubrimiento de nuevos compuestos capaces de activar ACE2, basándose en sus investigaciones donde sugieren que ácidos biliares endógenos pueden interferir con la interacción Spike-ACE2 (Fiorillo et. al., 2022). Para un acercamiento más amplio se realizó un docking molecular de 67 ácidos biliares en la región bisagra de ACE2 en su conformación nativa (PDB ID:1R42), basándose en los antecedentes previos que encontraron activadores de ACE2 usando este sitio. Para validar la reproducibilidad del método se utilizó a MLN-4760 y fue redockeado en ACE2 en su conformación cerrada (PDB ID:1R4L) y comparado con MLN-4760 cristalizado con ACE2.

Los hits con mejor energía de unión del screening *in silico* fueron analizados mediante ensayos *in vitro* que evaluaban los efectos sobre la actividad enzimática de ACE2 y la capacidad de romper la interacción Spike-ACE2. Se logró encontrar dos derivados de ácidos biliares capaces de aumentar la actividad de ACE2 alrededor de un 40% respecto al control. A la vez, encontraron otros ácidos biliares capaces de inhibir la interacción Spike-ACE2 en un 40% (Fiorillo et. al., 2022).

### 3.6 Selección de compuestos para utilizar durante el presente trabajo

Hanson y colaboradores llevaron a cabo un screening utilizando la técnica de alphascreen donde identificaron compuestos de una biblioteca de fármacos aprobados con la capacidad de romper la interacción ACE2- RBD de Spike de SARS-CoV-2 (Hanson et. al., 2020). El análisis completo de los datos crudos (<https://opendata.ncats.nih.gov/covid19/databrowser>) de dicho screening nos indica que no existen fármacos aprobados potentes que inhiban la interacción entre ACE2 y Spike y a su vez inhiban en forma potente la infección experimental en un modelo celular. Teniendo la experiencia de nuestro grupo de trabajo en el análisis de screening de bibliotecas de compuestos usando alphascreen, evaluamos los datos publicados por Hanson y colaboradores de manera independiente. Elaboramos una lista donde priorizamos “hits” que potencialmente tienen diferente mecanismo de acción. Finalmente acertamos la lista a 34 compuestos comerciales aprobados por FDA (que inhiben la interacción con Spike con IC50s entre 2 y 12  $\mu\text{M}$ ). Un “hit” obtenido de un cribaje puede ser un “artefacto” y no tiene valor hasta que no se ha validado el efecto del compuesto sobre la proteína blanco por una metodología diferente a la usada en el cribaje.

Figura 16: Variación de estabilidad térmica ( $\Delta T_m$ ) de ACE2 en presencia de fármacos aprobados por FDA seleccionados del cribaje. Se muestra un experimento donde se valida la unión específica a la proteína blanco, con una tecnología diferente a la del cribaje. 10 compuestos estabilizaron ACE2 más de 1°C, mientras que dos compuestos desestabilizaron ACE2. Otros compuestos no pudieron ser validados.



Con el objeto de validar los resultados obtenidos por la plataforma de screening usada por Hanson y colaboradores pusimos a punto el ensayo de estabilidad térmica usando 0.5  $\mu\text{M}$  de ACE2 en cada ensayo. Cuando un compuesto interacciona específicamente con un blanco, le brinda estabilidad a la región de la proteína, y se observa un aumento en la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ). Evaluamos el efecto de los compuestos a dos concentraciones, 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Los resultados demuestran que 12 compuestos afectan la estabilidad de ACE2 (ver Figura 16).

En resumen, concluimos que 12 compuestos del cribaje de NIH desplazan la unión entre ACE2 y Spike a través de interactuar específicamente con ACE2. Realizamos una búsqueda en proveedores de análogos de estos compuestos madre, lo que nos permitió agregar otros 21 compuestos extra para utilizar en el presente trabajo. La finalidad del uso de estos análogos es para identificar si hay algún farmacóforo relevante que sea responsable por la interrupción de la interacción.

### **3.7 Conclusión del Marco Teórico**

En conclusión, todos los trabajos anteriores sientan la base para hipotetizar que:

- ACE2 presenta una dinámica y un equilibrio entre su conformación nativa “abierta” y en presencia de un inhibidor “cerrada”.
- ACE2 presenta un sitio donde se sugiere que ocurre la unión de los activadores que aumentan la actividad de la enzima, el sitio de la región bisagra. A la vez, este sitio parece presentar una comunicación alostérica con el sitio activo debido al aumento de actividad.
- Es posible que haya una comunicación alostérica entre el sitio activo de ACE2 y los residuos que interactúan con el RBD de Spike de SARS-CoV-2.
- Un modulador (inhibidor o activador) de ACE2 podría ser capaz de generar un cambio conformacional en ACE2 que bloquee la interacción entre Spike de SARS-CoV-2 y ACE2 de forma alostérica.

## **4 Objetivos:**

### **4.1 Objetivo General:**

Encontrar mediante docking molecular y posterior ensayo de actividad un modulador de ACE2 que al interactuar con el sitio activo, el sitio de la región bisagra o con los residuos que interactúan con el RBD de Spike, sean capaces de modificar su actividad y/o inhibir la interacción con Spike de SARS-CoV-2.

### **4.2 Objetivos Específicos:**

Encontrar mediante docking molecular indicios de posibles reguladores de ACE2 según la energía de unión y analizar las interacciones que presentan con los residuos del sitio activo para compararlas con las interacciones de MLN-4760 en el mismo sitio.

Analizar las interacciones presentes entre los compuestos y los residuos críticos del sitio activo, del sitio bisagra y del sitio de unión con el RBD de Spike de SARS-CoV-2. Lograr identificar los residuos críticos de estos sitios.

Analizar la actividad enzimática que presentan los compuestos y correlacionarla con la energía de unión y las interacciones que presentan.

## **5 Metodología**

### **5.1 Docking Molecular**

Para la realización del ensayo *in silico* del docking molecular primeramente se prepararon los archivos de las estructuras cristalográficas de las proteínas y ligandos involucrados para su utilización en Autodock Vina (Trott & Olson, 2010).

#### **5.1.1 Preparación de las estructuras receptoras:**

Los archivos de las estructuras cristalográficas en 3D de las proteínas se obtuvieron a través del RCSB Protein Data Bank en [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) (PDB). Se utilizó la estructura nativa de ACE2 1R42 (Towler et. al., 2004) resolución 2.20 Å; la estructura con el inhibidor MLN-4760 unido en el sitio activo 1R4L (Towler et. al., 2004) resolución 3.00 Å y la estructura del RBD de Spike unido con ACE2 6M0J (Lan et. al., 2020) resolución 2.45 Å. Se removió el agua, detergentes y ligandos, se agregaron las cargas y los hidrógenos polares usando el software UCSF Chimera (Pettersen et. al., 2004). En el caso de 1R4L se removió el ligando MLN-4760. Los archivos se transformaron a formato PDBQT usando el software Autodock Tools versión 1.5.6.

### 5.1.2 Preparación de los ligandos:

Las estructuras 3D de los ligandos se obtuvieron a través del software ChemDraw Ultra 12.0 y Chem3D Pro 12.0. Se copió el código SMILES del ligando en ChemDraw Ultra 12.0 y la molécula obtenida se pegó en Chem3D Pro 12.0. Allí se utilizó la función de minimización de energía de la molécula para que pierda la rigidez y se posicione en su menor estado de energía posible. Se guardó con formato MOL2. Ese archivo MOL2 luego se abrió en Autodock Tools versión 1.5.6 y se guardó como formato PDBQT.

### 5.1.3 Preparado e identificación de las coordenadas a analizar en los diferentes receptores:

Con el servidor Proteins Plus (Schöning-Stierand et. al., 2020) se hallaron y definieron los pockets o sitios para realizar el docking en cada una de las conformaciones de la proteína. Cada uno de estos sitios tiene una caja o GRID que define las coordenadas de volumen disponible donde el ligando puede interactuar con la proteína en esa GRID especificada. En la conformación 1R4L con MLN-4760 unido en su sitio activo la GRID se coloca en el sitio activo de la proteína, en la conformación nativa 1R42 la GRID se define en el sitio bisagra o "hinge" de la enzima (Ver Figura 17), descrito previamente como el sitio propuesto donde se unen los activadores de la enzima, y en 6M0J se define la GRID en los residuos con los cuales ACE2 interacciona con el RBD de Spike.

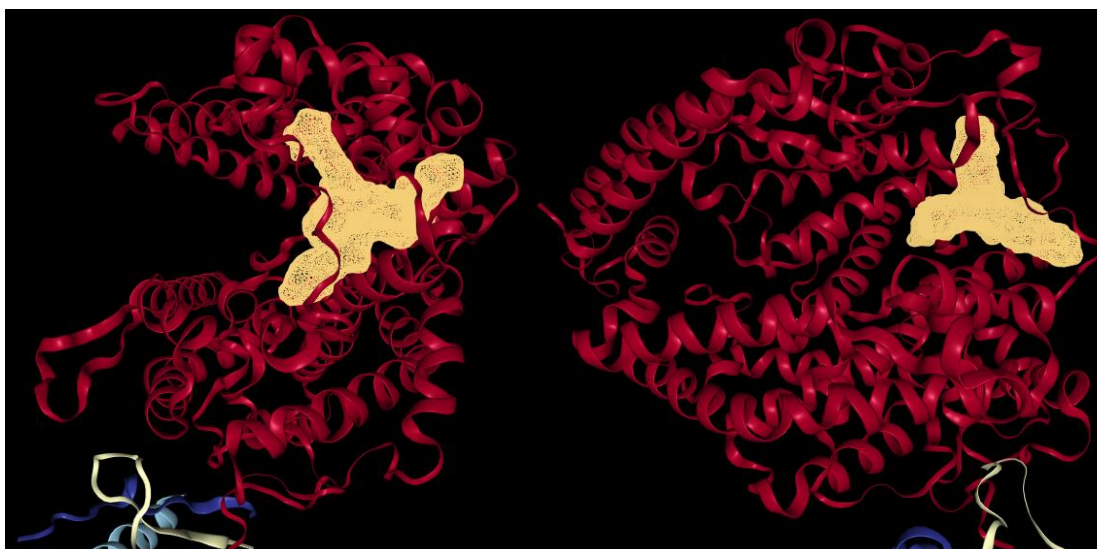


Figura 17: Estructura nativa de ACE2 (PDB ID: 1R42) utilizada en los dockings moleculares. La estructura de ACE2 se detalla en color rojo y el pocket del sitio bisagra remarcado utilizado esta coloreado de amarillo. Imagen obtenida mediante el servidor de ProteinsPlus.

### 5.1.4 Docking

Una vez listas las proteínas y ligandos y definidos los GRIDS en las tres proteínas distintas, se utilizó el programa Autodock Vina (Trott & Olson, 2010) para realizar el docking, usando una exhaustiveness = 50.

## 5.2 Ensayo de Actividad Enzimática

Los compuestos analizados *in silico* se prepararon para un ensayo de actividad enzimática basado en fluorescencia utilizando enzima ACE2 humana recombinante y un péptido sustrato fluorogénico (Mca-A-P-K(Dnp)). ACE2 “cliva” el péptido sustrato entre la prolina y la lisina, liberando el grupo dinitrofenol que “quenchea” la fluorescencia inherente de la metoxicumarina (Mca), resultando en un aumento de la fluorescencia en presencia de la actividad de ACE2 en longitudes de onda de excitación y emisión de 320 y 405 nm, respectivamente. La actividad enzimática se midió con el equipo Enspire Plate Reader de Perkin Elmer. Se midieron previamente con un péptido control (Mca-P-L) y el péptido sustrato los parámetros cinéticos de la enzima para averiguar las concentraciones óptimas de enzima y sustrato a utilizar. Luego se midió la actividad enzimática en presencia de los compuestos y el péptido sustrato. Se utilizó ACE2 con el dominio cuello (residuos 18-731) y sin el dominio cuello (residuos 18-615). Se llevaron a cabo ensayos en distintas condiciones, donde hubo variación de concentración del sustrato y de la enzima. La enzima se disolvió en un buffer conteniendo Tris-HCl 75 mM pH = 7.4, 300 mM NaCl y 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> y el volumen final del ensayo fue de 50  $\mu$ L. Se utilizó una concentración final de los compuestos de 50  $\mu$ M previamente disueltos en DMSO en todos los ensayos.



Tabla 1: Estructuras de los compuestos a analizar:

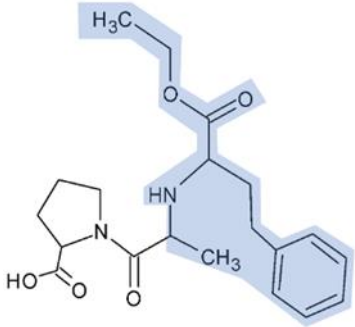
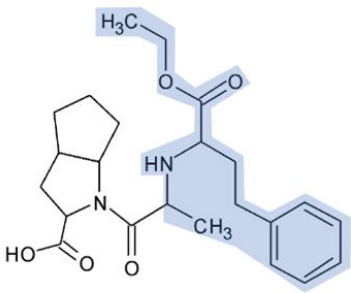
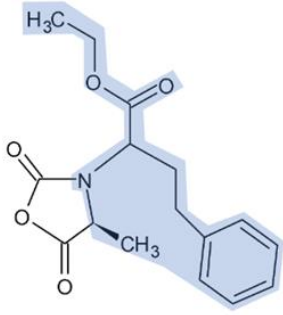
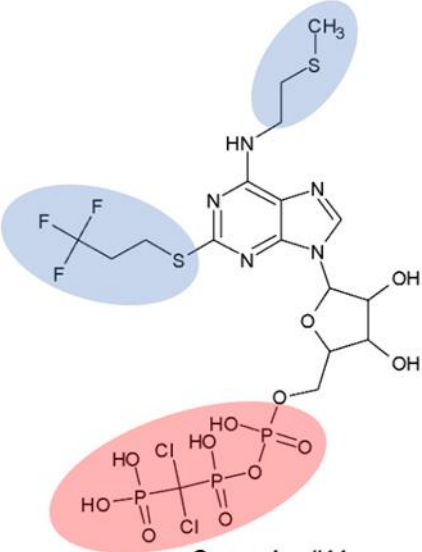
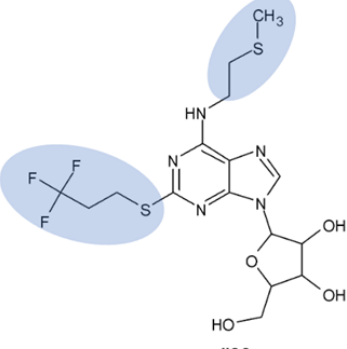
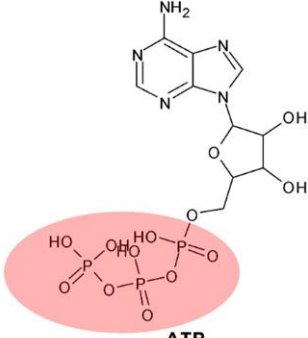
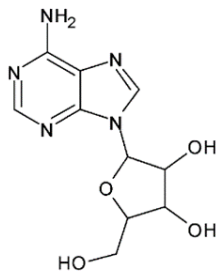
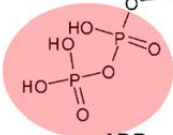
Compuesto Madre	Derivados
 <p><b>Enalapril #9</b></p>	 <p><b>#47</b></p>  <p><b>#48</b></p>
 <p><b>Cangrelor #11</b></p>	 <p><b>#39</b></p>  <p><b>ATP</b></p>  <p><b>Adenosine</b></p>  <p><b>ADP</b></p>



Tabla 1: (continuación)

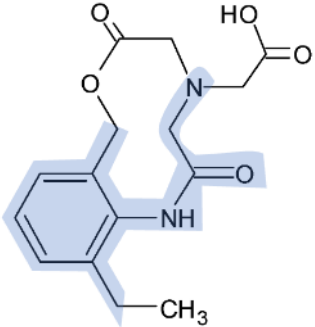
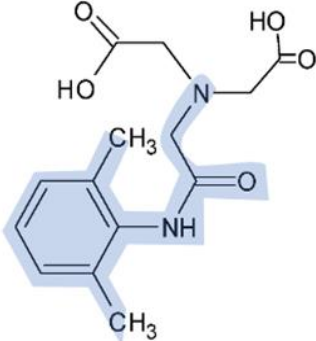
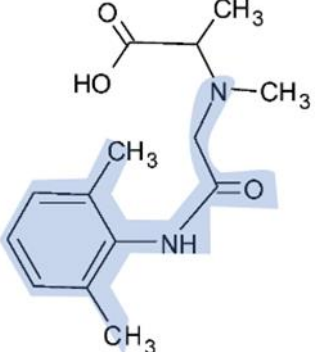
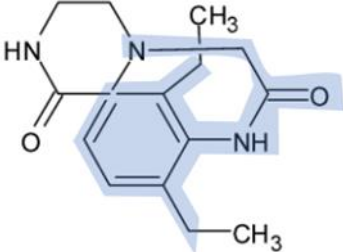
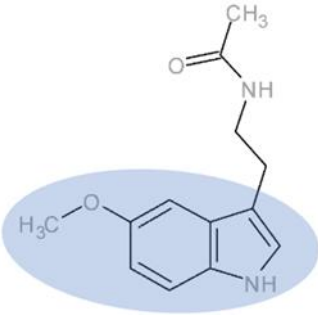
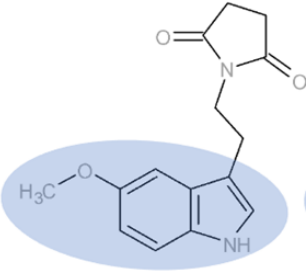
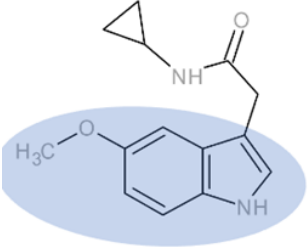
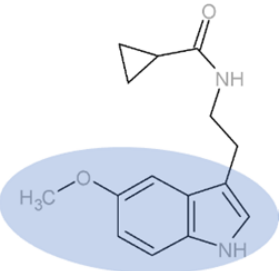
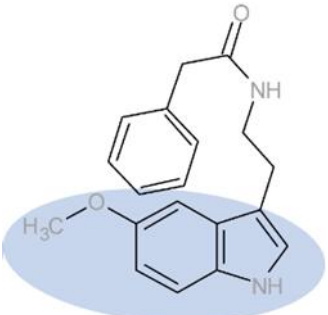
Compuesto Madre	Derivados
 <p><b>Etifenin #26</b></p>	 <p><b>#35</b></p>  <p><b>#36</b></p>  <p><b>#37</b></p>
 <p><b>Melatonin #27</b></p>	 <p><b>#49</b></p>  <p><b>#50</b></p>  <p><b>#51</b></p>  <p><b>#52</b></p>

Tabla 1: (continuación)

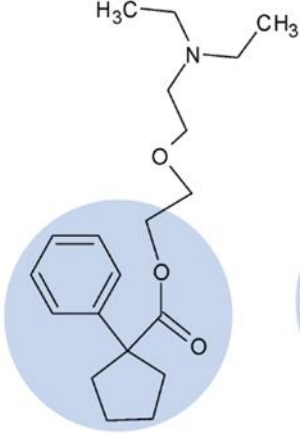
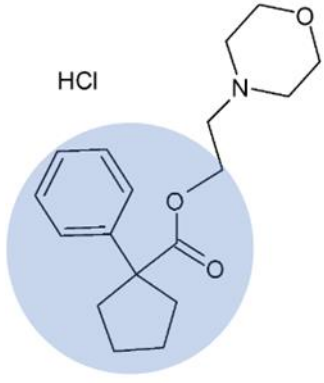
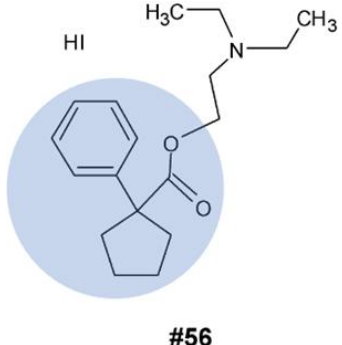
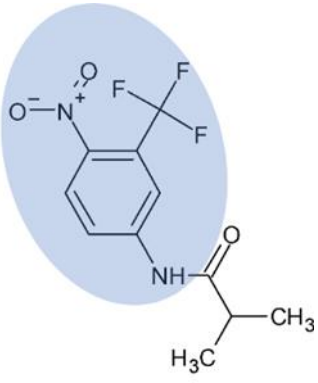
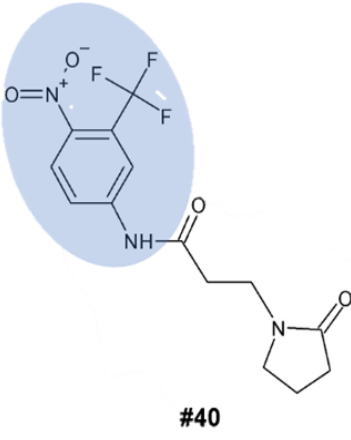
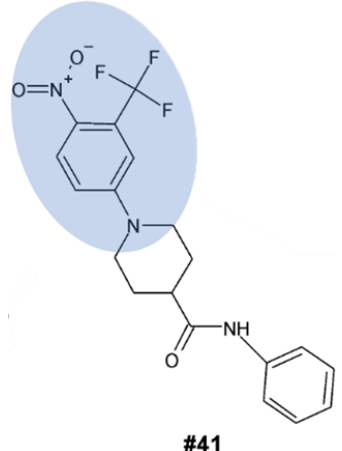
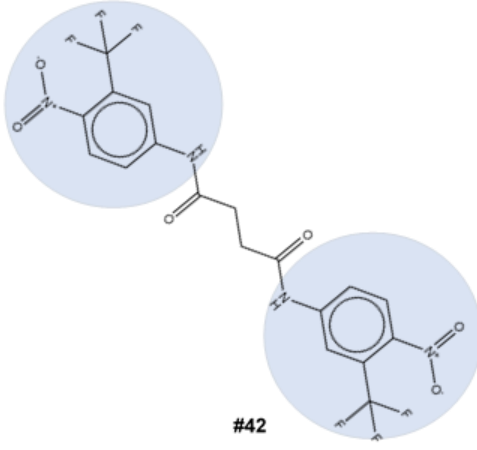
Compuesto Madre	Derivados
 <p><b>Carbetapentane #28</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="657 443 981 824">  <p><b>#55</b></p> </div> <div data-bbox="1109 481 1452 824">  <p><b>#56</b></p> </div> </div>
 <p><b>Flutamide #29</b></p>	<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div data-bbox="646 940 997 1377">  <p><b>#40</b></p> </div> <div data-bbox="1109 929 1452 1377">  <p><b>#41</b></p> </div> </div> <div data-bbox="805 1422 1284 1870" style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p><b>#42</b></p> </div> </div>

Tabla 1: (continuación)

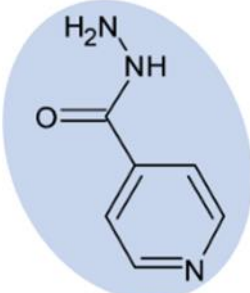
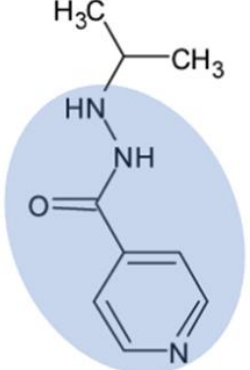
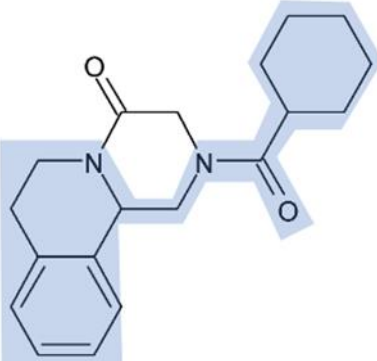
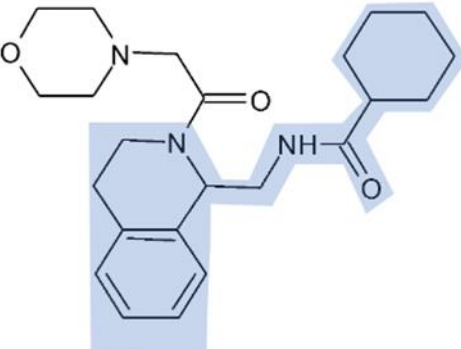
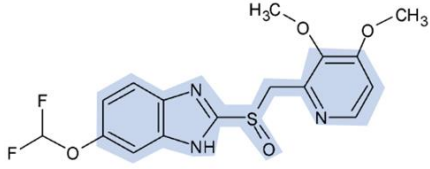
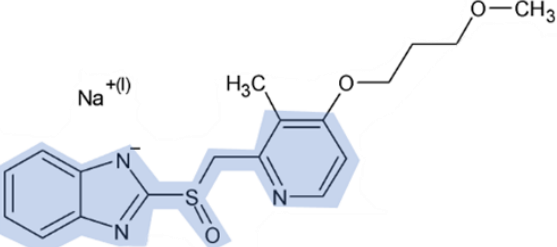
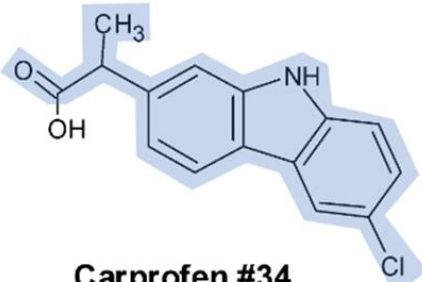
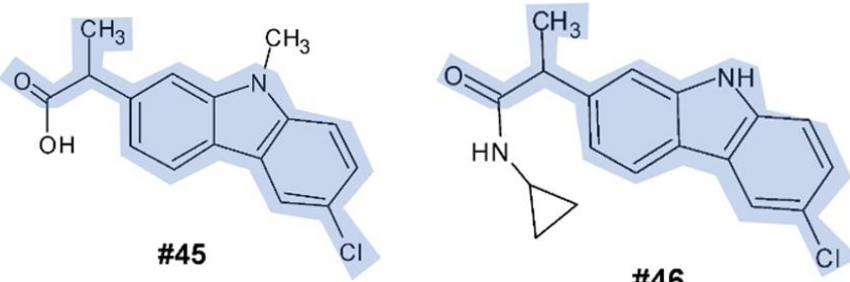
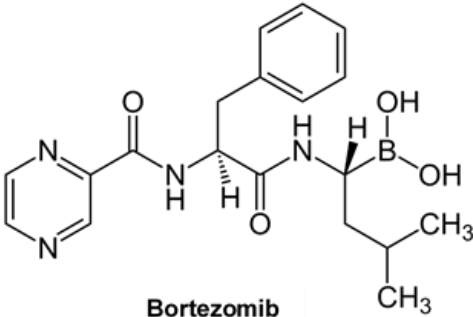
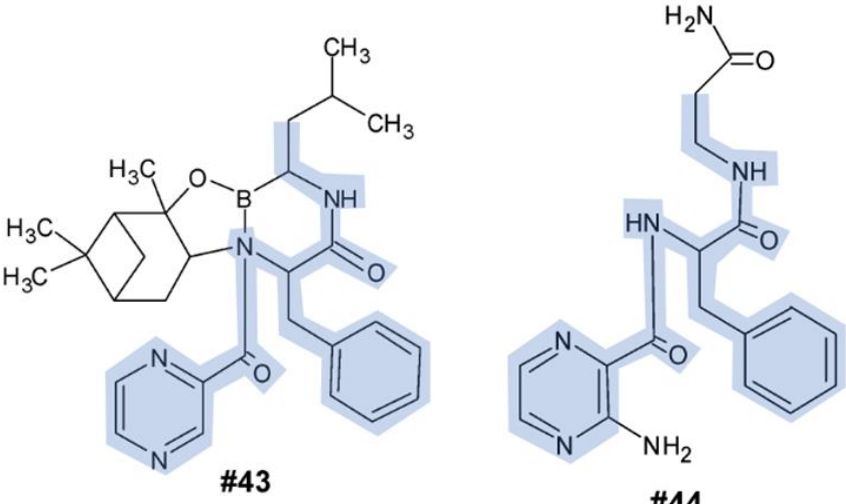
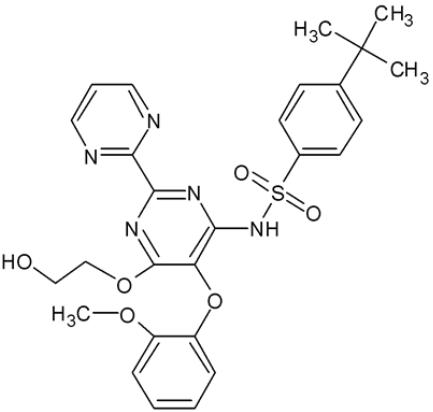
Compuesto Madre	Derivados
 <p>Isoniazid #30</p>	 <p>#38</p>
 <p>Praziquantel #31</p>	 <p>#54</p>
 <p>Pantoprazole #32</p>	 <p>#53</p>
 <p>Carprofen #34</p>	 <p>#45</p> <p>#46</p>

Tabla 1: (continuación)

Compuesto Madre	Derivados
 <p><b>Bortezomib</b></p>	 <p><b>#43</b>      <b>#44</b></p>
 <p><b>Bosentan #33</b></p>	<p>N/A</p>

En azul se remarca la estructura que comparte el compuesto madre con sus derivados. En rojo se remarca un grupo funcional diferente al azul que también comparten el compuesto Cangrelor y algunos de sus derivados.

## 6 Resultados

### 6.1 Docking Molecular

Como primer paso se validó y justificó la metodología utilizada mediante el redocking de MLN-4760 para corroborar la reproducibilidad comparando los valores de la desviación media de la raíz de los cuadrados, o en inglés root mean square deviation (RMSD) entre el docking realizado mediante esta metodología (MLN-4760 redockeado) y MLN-4760 cristalizado (Ver Figuras 18 y 19). El valor de RMSD fue obtenido mediante el software Dock RMSD de Zhang Group (Bell et. al., 2019) fue de 1.250 Å, lo que indica que la metodología aplicada es válida y reproducible.

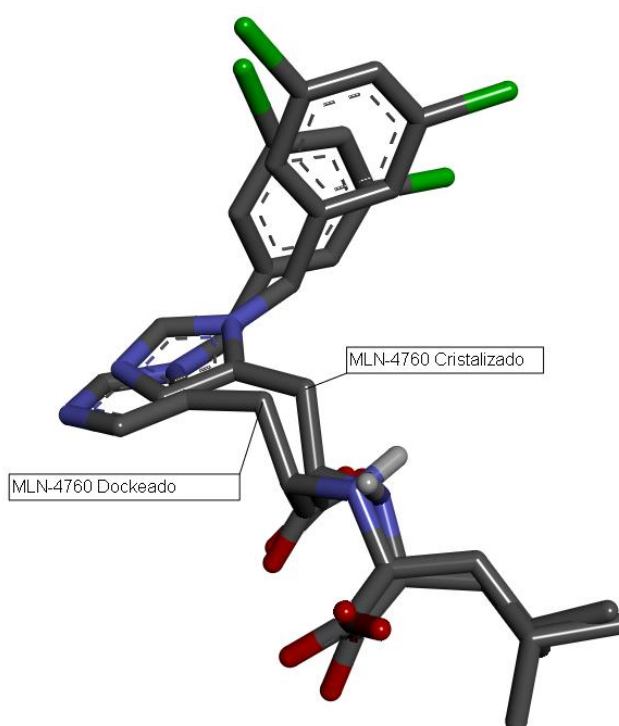


Figura 18: Superposición de MLN-4760 Dockeado en AutoDock Vina con MLN-4760 en su pose cristalizada en PDB ID: 1R4L. El bajo RMSD = 1.250 Å calculado teniendo en cuenta todos los átomos demuestra el alto desempeño de este algoritmo de docking, validando y justificando la metodología aplicada. La imagen fue obtenida utilizando Discovery Studio Visualizer, versión 21.1.0 (Dassault Systemes BIOVIA Corp., San Diego, CA, USA).

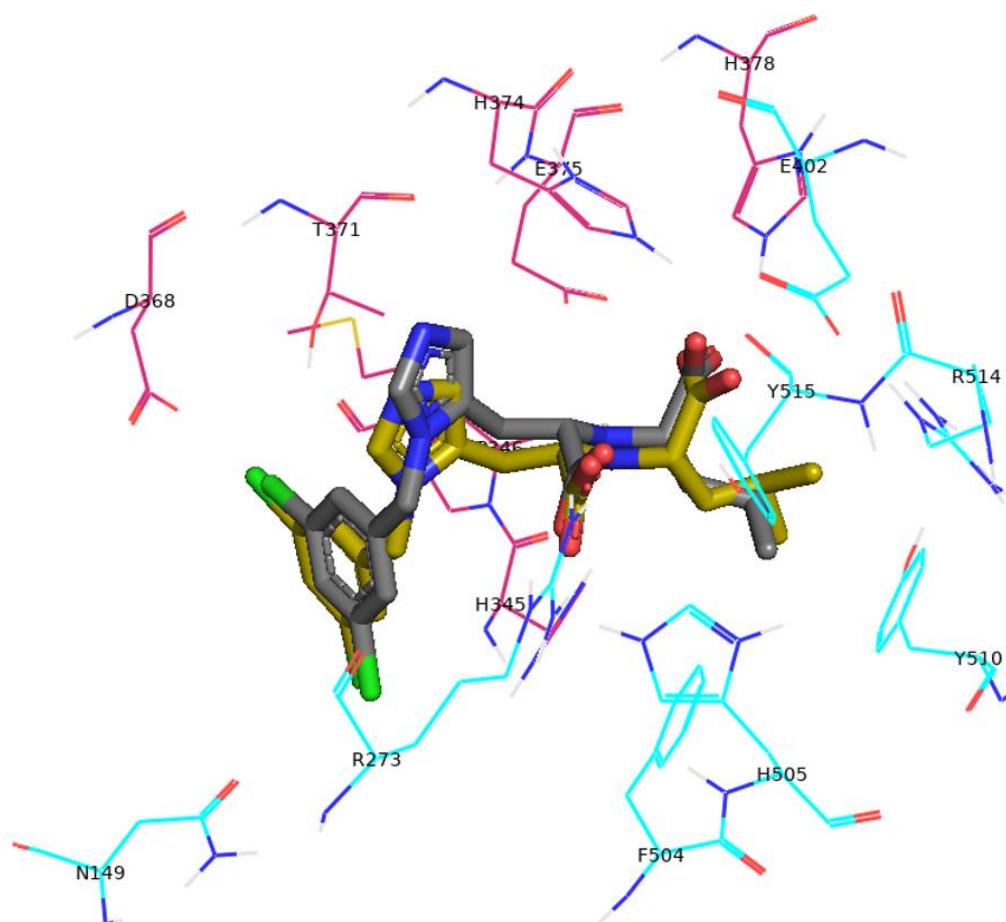


Figura 19: MLN-4760 dockeado (plateado) superpuesto con MLN-4760 cristalizado (dorado) en complejo con ACE2. Se pueden observar los residuos del subdominio I (magenta) y del subdominio II (Cyan) ubicados a 4 Å de distancia de MLN-4760 cristalizado. Imagen generada con The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

En base a la búsqueda de pockets realizada, se llevó a cabo un docking molecular donde más de 30 compuestos fueron posicionados en los tres pockets descritos previamente en la metodología para identificar *in silico* las interacciones que presentan en cada sitio. Del resultado de estas interacciones se obtuvieron las energías de unión y mejores poses en el espacio de cada uno de los compuestos en los respectivos pockets. A continuación, se presenta una tabla (Tabla 2) con los 10 compuestos que obtuvieron mejor energía de unión en cada pocket. En el Anexo I se puede encontrar la tabla con las energías de unión de todos los compuestos dockeados en todos los sitios. Estos compuestos fueron elegidos basándose en 11 compuestos madre, de los cuales se pensaron derivados con variaciones en grupos funcionales que podrían presentar afinidad por los residuos críticos en el sitio activo de ACE2. Los derivados mantienen el mismo esqueleto molecular que su compuesto madre (Tabla 1). Como se aclaró en la introducción, los compuestos madre fueron seleccionados luego de reanalizar los datos crudos del screening de una librería de fármacos aprobados en un ensayo de alphascreen que evalúa la interacción ACE2-Spike realizada por el NIH (Hanson et. al., 2020).

**Tabla 2: Los 10 compuestos con mejor energía de unión en cada sitio donde se evaluó el docking.**

Sitio activo (PDB ID 1R4L)		Sitio bisagra o "hinge" (PDB ID 1R42)		Sitio de interacción con RBD (PDB ID 6M0J)	
Compuesto	Energía de unión (kcal/mol)	Compuesto	Energía de unión (kcal/mol)	Compuesto	Energía de unión (kcal/mol)
Bictegravir	-12.0	Bictegravir	-10.1	Bictegravir	-9.0
Praziquantel	-10.3	Compuesto #42 (Derivado de Flutamida)	-9.3	Compuesto #46	-8.0
Compuesto #41 (Derivado de Flutamida)	-10.1	Compuesto #41 (Derivado de Flutamida)	-8.7	Compuesto #41 (Derivado de Flutamida)	-7.8
Compuesto #42 (Derivado de Flutamida)	-10.0	Praziquantel	-8.6	Compuesto #42 (Derivado de Flutamida)	-7.6
Cangrelor	-9.9	Bosentan	-8.5	Compuesto #52 (Derivado de Melatonina)	-7.5
Bosentan	-9.7	Compuesto #54 (Derivado de Praziquantel)	-8.5	Bosentan	-7.4
Compuesto #54 (Derivado de Praziquantel)	-9.6	Compuesto #52 (Derivado de Melatonina)	-8.4	Compuesto #40 (Derivado de Flutamida)	-7.4
Enalapril	-9.1	Cangrelor	-8.3	Cangrelor	-7.3
Compuesto #46 (Derivado de Carprofen)	-9.0	Compuesto #40 (Derivado de Flutamida)	-7.9	Pantoprazole	-7.3
Compuesto #47 (Derivado de Enalapril)	-8.8	Compuesto #47 (Derivado de Enalapril)	-7.9	Praziquantel	-7.2

Los resultados del docking muestran, para la gran mayoría de los compuestos, modos de unión similares en el sitio activo y el sitio bisagra de ACE2 (Ver Tabla 2). El compuesto que obtuvo la energía de unión más alta en los tres sitios de docking fue Bictegravir. Lamentablemente, este compuesto no estuvo presente en el ensayo de actividad enzimática, pero es una posibilidad a tener en cuenta para futuros ensayos de actividad enzimática. Otros compuestos que presentaron una elevada energía de unión en los tres sitios diferentes donde se realizó el

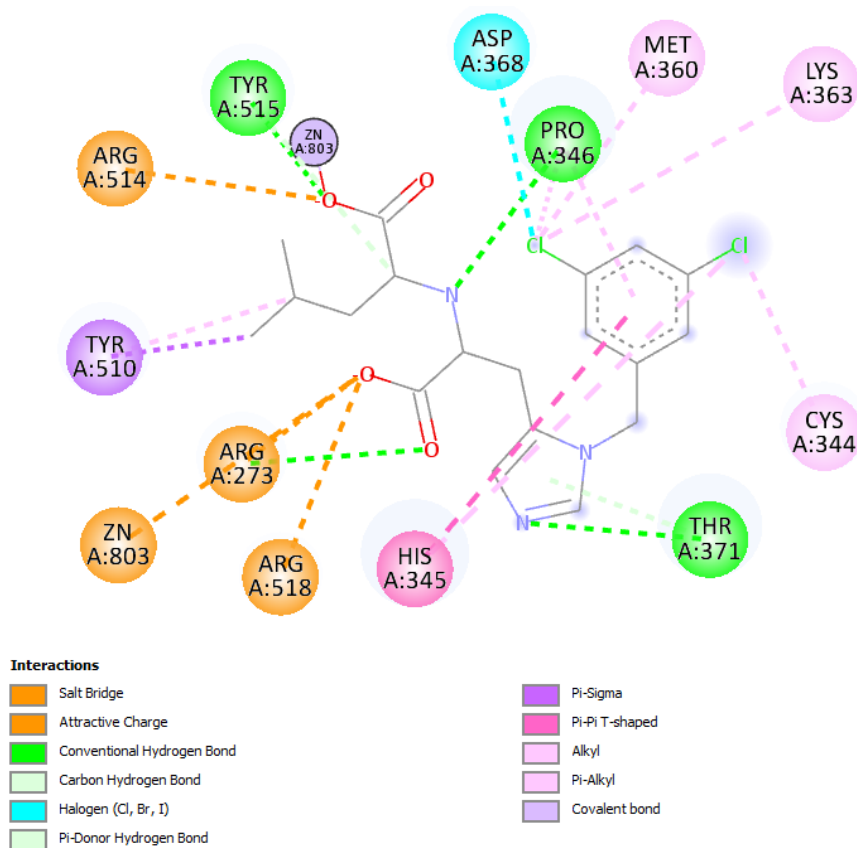
docking fueron los compuestos derivados de la Flutamida (#41 y #42), un antiandrógeno usado en el tratamiento de cáncer de próstata; Praziquantel, un antihelmíntico y antiparasitario de amplio espectro; Cangrelor, un antiagregante plaquetario utilizado durante varios procesos quirúrgicos; y Bosentan, un antagonista dual del receptor de la endotelina usado en el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

#### **6.1.1 Análisis de Interacciones entre los residuos del sitio activo y el inhibidor MLN-4760:**

Siendo un potente inhibidor selectivo de ACE2 ( $IC_{50} < 1$  nM), MLN-4760 forma interacciones fuertes como enlaces puente hidrógeno e interacciones iónicas con los átomos que constituyen el sitio activo del receptor (Ver Figura 20). Las cargas negativas presentes en los dos grupos carboxilato generan interacciones iónicas (puente salino/carga atractiva) con las cargas positivas presentes en las cadenas laterales de ARG 514, ARG 518 y ARG 273. Además, uno de los grupos carboxilato está coordinado con el ión  $Zn^{2+}$ . Los enlaces puente hidrógeno se dan entre la amina secundaria de MLN-4760 y la cadena principal de PRO 346, también entre el carboxilato del inhibidor unido al zinc y la cadena lateral de TYR 515, y finalmente, el grupo imidazol de MLN-4760 con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de THR 371. También se presentan interacciones hidrofóbicas favorables  $\pi$ - $\pi$  perpendiculares entre el anillo aromático del inhibidor y el grupo imidazol de la cadena lateral de HIS 345, el cual se mencionó previamente que es relevante para la actividad de la enzima. Otra interacción hidrofóbica que se da es  $\pi$ - $\sigma$  entre el grupo isobutil de MLN-4760 y el anillo aromático de la cadena lateral de TYR 510. La posición de MLN-4760 en el sitio activo es estabilizada aún más mediante interacciones de menor relevancia como enlace halógeno e interacciones hidrofóbicas débiles  $\pi$ -alquilo y alquilo-alquilo.

Sobre la base de las características previamente mencionadas del sitio activo de ACE2, el análisis de docking molecular arrojó prometedores compuestos candidatos con el potencial de interactuar con múltiples residuos entre los que se encuentran los más relevantes para la actividad enzimática, del subdominio I y II del dominio proteolítico. Es importante destacar que el top 10 de los compuestos con mayor energía de unión a todos los sitios activos presentan farmacología diferente, o desconocida en el caso de los derivados diseñados para este trabajo, a excepción del Enalapril y Bosentan, que son ambos antihipertensivos pero presentan diferentes mecanismos de acción. Desde este punto de vista, las moléculas evaluadas exhiben diversas discrepancias respecto a sus grupos funcionales, reflejando el propósito para el que fueron diseñadas así como también las variaciones que presentan sus derivados ensayados. Existe, sin embargo, un conjunto de interacciones comunes que ocurren entre los compuestos y los residuos del sitio activo de ACE2.





**Figura 20:** Visualización en 2D de las interacciones favorables que anclan el MLN-4760 al sitio activo de ACE2 (PDB ID: 1R4L). Las interacciones iónicas (puentes salinos) y cargas atractivas se representan con líneas naranjas punteadas. Los enlaces puente hidrógeno convencionales se representan con líneas verde lima punteadas. Los enlaces hidrógeno débiles se representan con líneas turquesa claro punteadas. Los enlaces halógenos se representan con líneas cian punteadas. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  y  $\pi$ - $\sigma$  se representan con líneas rosa y violeta punteadas respectivamente. Las interacciones  $\pi$ -alquilo y alquilo-alquilo se representan con líneas rosa claro punteadas. La imagen fue obtenida utilizando Discovery Studio Visualizer, versión 21.1.0 (Dassault Systemes BIOVIA Corp., San Diego, CA, USA).

### 6.1.2 Análisis de Interacciones entre los residuos del sitio activo y los compuestos dockeados:

En el sitio activo los residuos que presentaron el mayor número de interacciones con los 10 compuestos con mejor energía de unión fueron ARG 273 (13 interacciones totales, 11 enlaces puente hidrógeno y 3  $\pi$ -catión), HIS 345 (12 interacciones totales, 5 enlaces puente hidrógeno, 1  $\pi$ -catión), HIS 374 (10 interacciones totales, 2 enlaces puente hidrógeno, 1  $\pi$ -catión, 1 carga atractiva), PRO 346 (10 interacciones totales, 1 enlace puente hidrógeno), PHE 274 (10 interacciones totales, 1  $\pi$ -catión) y GLU 375 (7 interacciones totales, 2 enlaces puente hidrógeno, 2  $\pi$ -anión) (Ver Tabla 3). Se remarca la presencia de los enlaces puente hidrógeno y las interacciones electrostáticas como las interacciones  $\pi$ -catión/anión o cargas atractivas ya que son las interacciones más fuertes y directas que se pueden dar en los complejos ligando-

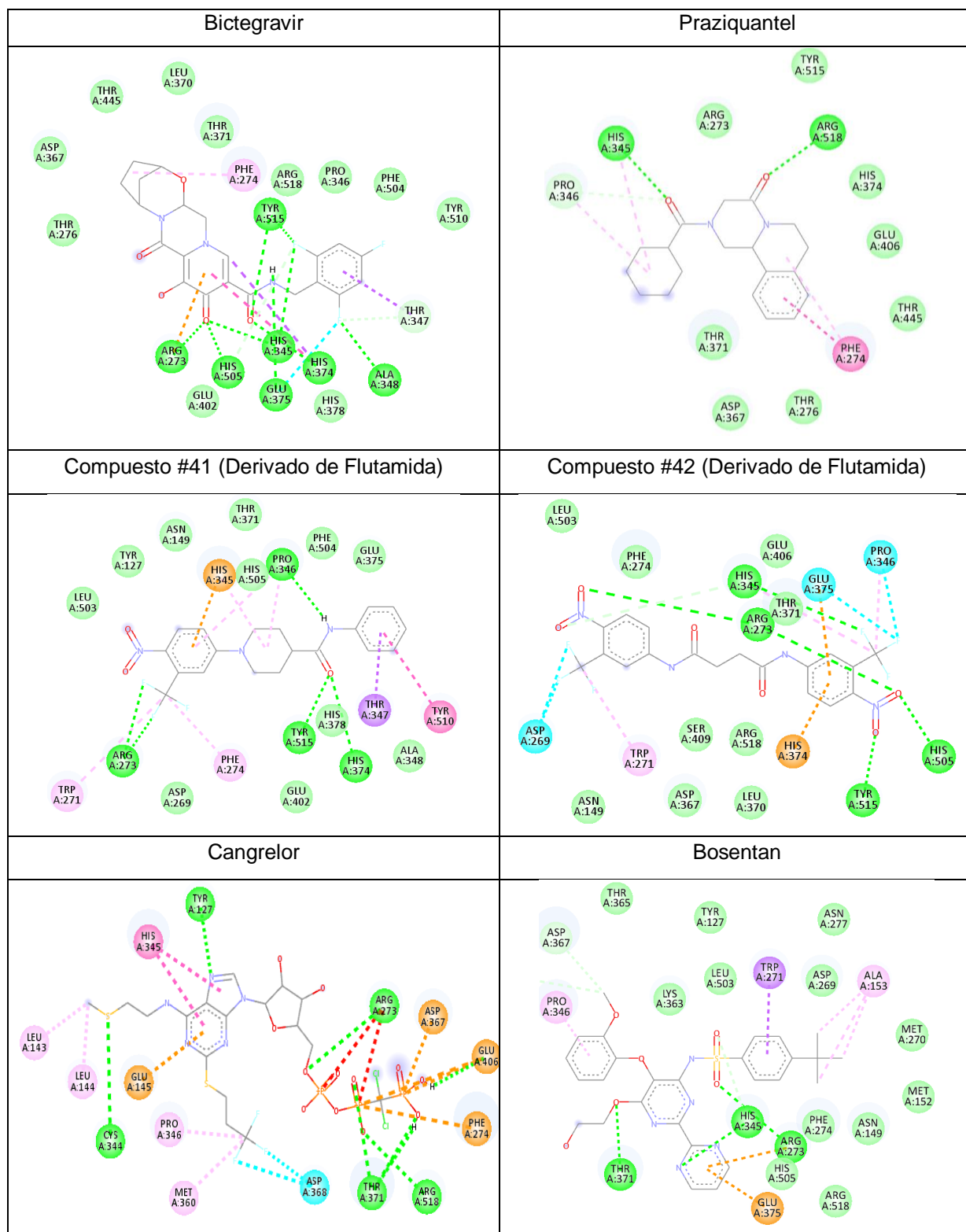
proteína. Se mencionó previamente que residuos como ARG 273, HIS 345 y GLU 375 son relevantes y hasta esenciales para la actividad de la enzima.

El tipo de interacción más directa y fuerte que prevalece entre residuos y compuestos es la de enlace puente de hidrógeno, habiendo 41 interacciones de este tipo para los 10 compuestos con mejor energía de unión, incluso algunas siendo más prominentes o no están presentes en el complejo MLN-4760/ACE2. Los compuestos presentan en general mayor cantidad de enlaces puente hidrógeno que los que presenta MLN-4760. El otro tipo de interacción directa y fuerte que le sigue son las interacciones iónicas ( $\pi$ -catión/anión, cargas atractivas), habiendo 15 en total entre los 10 compuestos. En contraste con MLN-4760, algunos compuestos como el #42 (Derivado de Flutamida) y Cangrelor presentan una densidad de carga positiva que aumenta sus chances de establecer interacciones ión-ión con las cadenas laterales negativamente cargadas de algunos residuos como GLU 375 y ASP 367. A la vez, algunos compuestos como Bictegravir y Bosentan presentan densidades de carga negativa y establecen interacciones ión-ión con las cadenas laterales positivamente cargadas de algunos residuos al igual que lo hace MLN-4760, como ARG 273 e HIS 374, y a la vez aparecen interacciones iónicas con otros residuos que MLN-4760 no presenta como es el caso de HIS 374 o ASP 367. Las interacciones electrostáticas (puentes salinos) que MLN-4760 presenta con los residuos ARG 514 y ARG 518, sin embargo, no son recurrentes en los compuestos dockeados, siendo que sólo uno de los diez forma interacciones electrostáticas con ARG 514 y ninguno con ARG 518. Cabe destacar que el residuo PHE 274 forma 7 interacciones  $\pi$ - $\pi$  (hidrofóbicas, en plano perpendicular y paralelo) con 5 de los 10 compuestos al establecer contactos con su cadena lateral aromática con otros grupos  $\pi$  en anillos aromáticos deslocalizados.

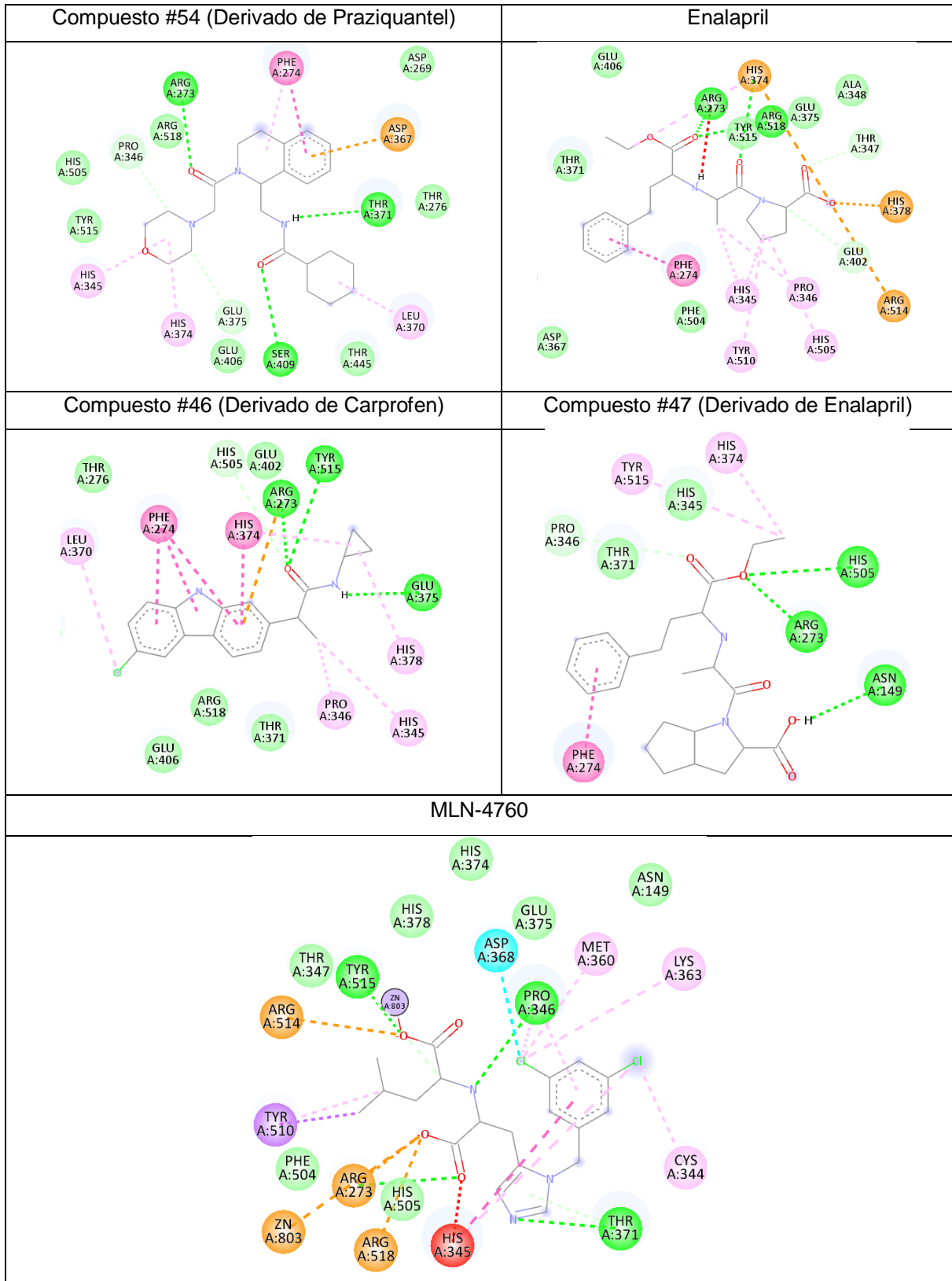
Los compuestos que presentan mejor energía de unión son los capaces de entablar interacciones polares como enlaces puente de hidrógeno e interacciones electrostáticas ( $\pi$ -catión,  $\pi$ -anión, cargas atractivas). Se destacan Bictegravir (-12 kcal/mol), Praziquantel (-10.3 kcal/mol), Compuesto #41 (Derivado de Flutamida, -10.1 kcal/mol), Compuesto #42 (Derivado de Flutamida, -10.0 kcal/mol) y Cangrelor (-9.9 kcal/mol). La relevancia de las interacciones hidrofóbicas como interacciones  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquilo y alquilo-alquilo es menor, pero no deja de ser una parte aportante a la energía de unión total, junto con fuerzas de Van der Waals.

El residuo crítico para la actividad ARG 273 es el más relevante ya que interacciona con 9 de los 10 compuestos con un enlace puente hidrógeno o con una interacción electrostática ( $\pi$ -catión). Este tipo de interacciones son directas y de mayor fuerza que las hidrofóbicas (alquilo-alquilo;  $\pi$ - $\pi$ ;  $\pi$ -alquilo). HIS 345 también interacciona con 9 de los 10 compuestos, y con 5 de ellos presenta enlace puente hidrógeno o interacciones electrostáticas, siendo el resto interacciones hidrofóbicas más débiles como  $\pi$ - $\pi$  y  $\pi$ -alquilo.

**Tabla 3: Interacciones en 2D de los 10 mejores compuestos con los residuos del sitio activo.**



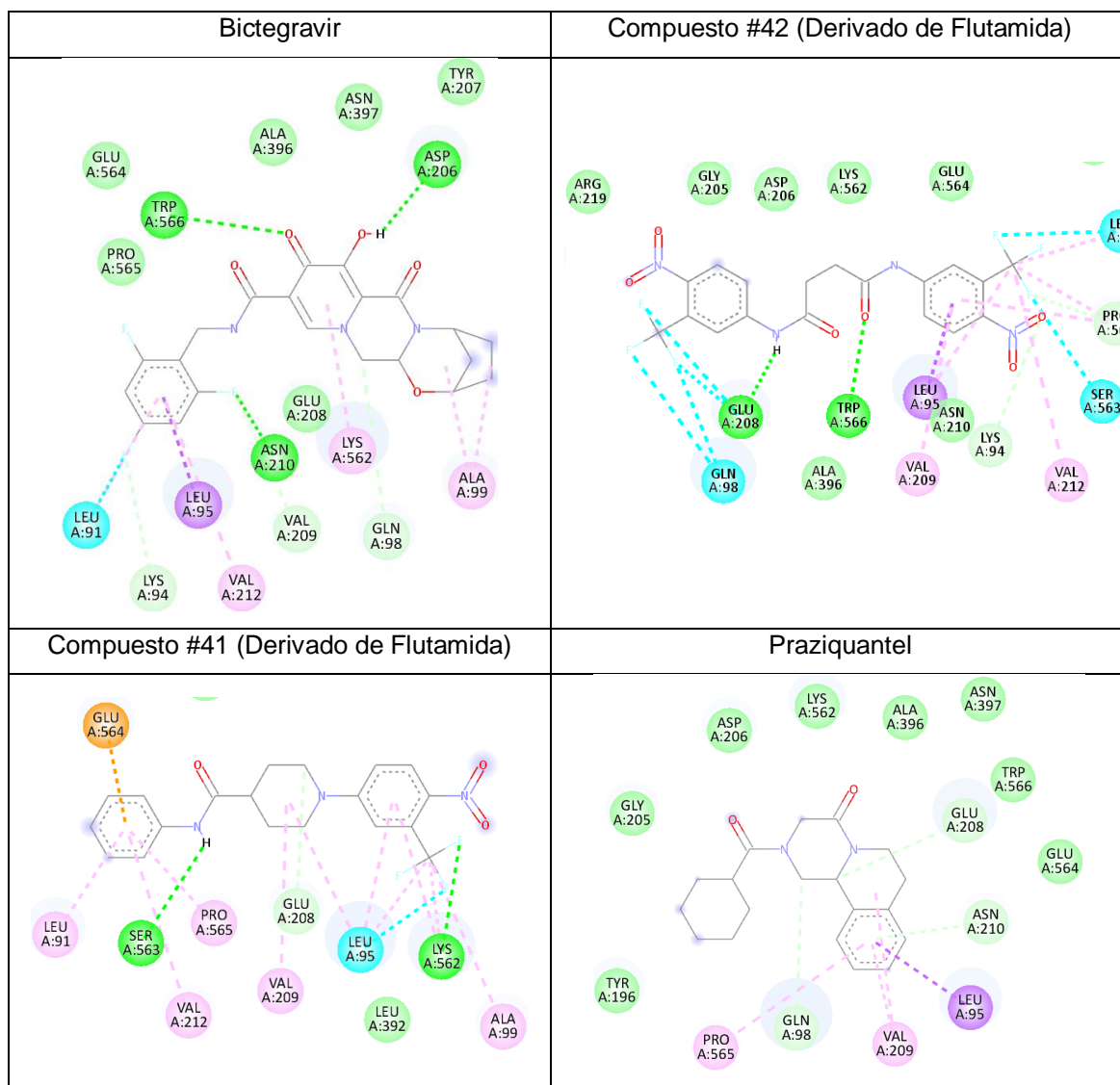
**Tabla 3 (continuación)**



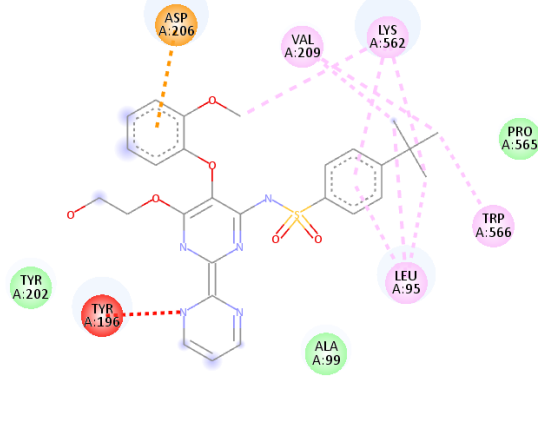
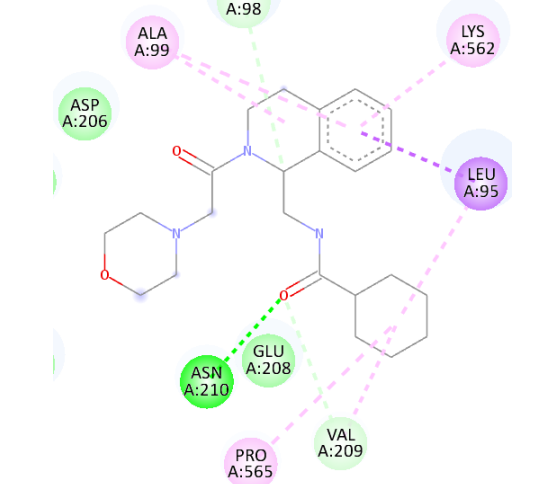
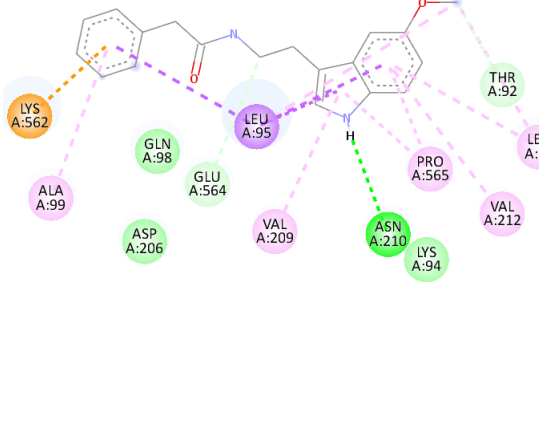
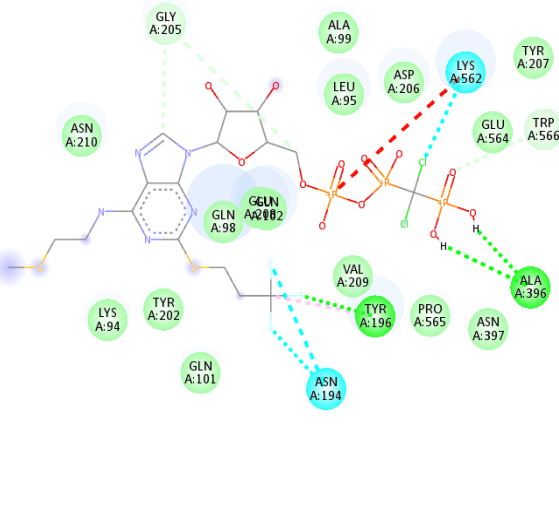
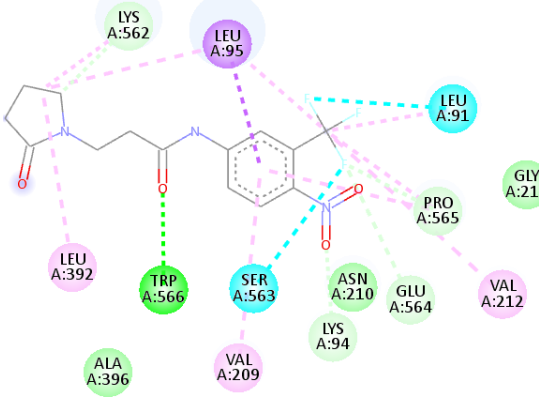
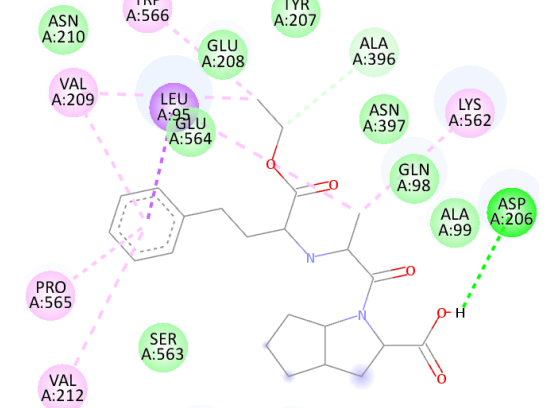
### 6.1.3 Análisis de interacciones entre los residuos del sitio bisagra o “hinge” y los compuestos dockeados:

En el sitio bisagra los residuos que presentaron el mayor número de interacciones con los 10 compuestos con mejor energía de unión son LEU 95 (20 interacciones totales, 8  $\pi$ - $\sigma$ , 11 alquilo-alquilo y  $\pi$ -alquilo), VAL 209 (13 interacciones totales, 11 alquilo-alquilo y  $\pi$ -alquilo), LYS 562 (13 interacciones totales, 1 enlace puente hidrógeno, 1  $\pi$ -catión, 9 alquilo-alquilo y  $\pi$ -alquilo), PRO 565 (12 interacciones totales, 10 alquilo-alquilo y  $\pi$ -alquilo) y LEU 91 (9 interacciones totales, 3 interacciones con halógenos, 6 alquilo-alquilo y  $\pi$ -alquilo) (Ver Tabla 4). La cadena lateral isobutilo del residuo LEU 95 es capaz de generar 8 enlaces  $\pi$ - $\sigma$  con 7 de los 10 compuestos.

**Tabla 4: Interacciones en 2D de los 10 mejores compuestos con los residuos del sitio bisagra.**



**Tabla 4 (continuación)**

Bosentan	Compuesto #54 (Derivado de Praziquantel)
	
Compuesto #52 (Derivado de Melatonina)	Cangrelor
	
Compuesto #40 (Derivado de Flutamida)	Compuesto #47 (Derivado de Enalapril)
	

A diferencia de las interacciones establecidas entre los compuestos y los residuos del sitio activo, en el sitio bisagra predominan las interacciones hidrofóbicas, siendo las de mayor cantidad las débiles interacciones alquilo-alquilo y  $\pi$ -alquilo, con 62 en total, seguidas por las interacciones C-H (17 en total) que son típicamente débiles y se dan cuando un grupo aceptor de electrones interactúa con un átomo de carbono donante de electrones, o más ocasionalmente entre un grupo  $\pi$  y un átomo donante. En contraste con las interacciones del sitio activo, aquí se presentaron tan solo 14 enlaces puente hidrógeno y 3 interacciones electrostáticas entre los 10 compuestos y los residuos, siendo ASN 210 el que más enlaces puente hidrógeno presenta (3 en total) entre los 10 compuestos.

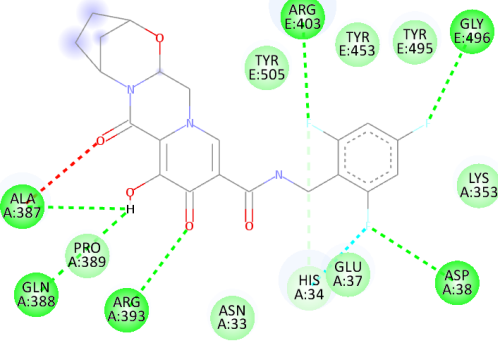
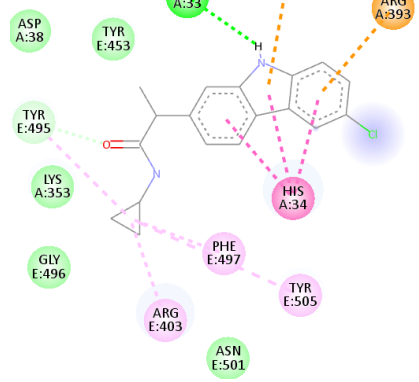
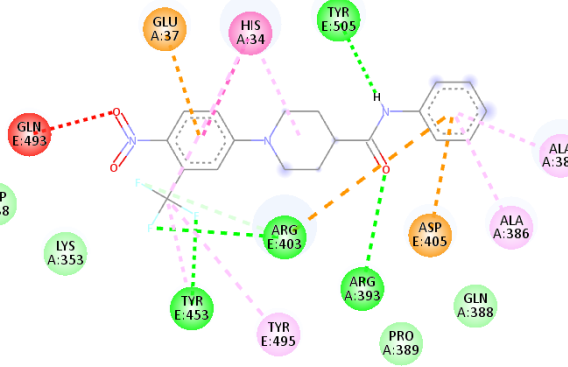
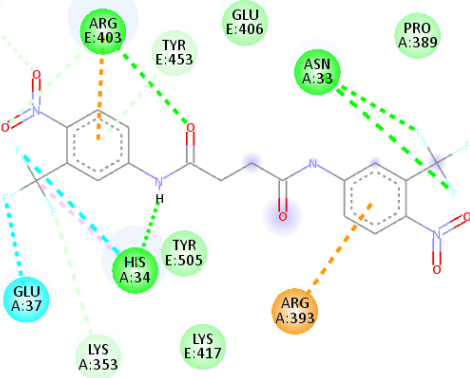
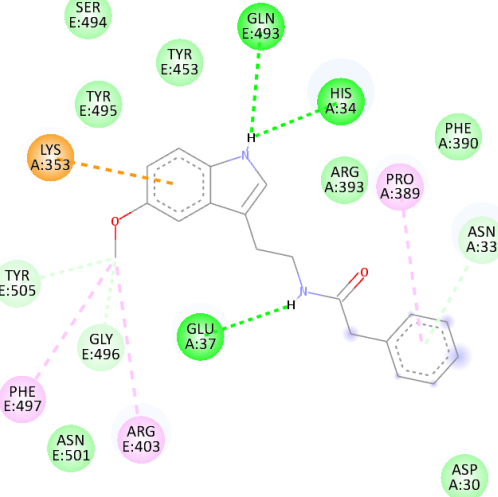
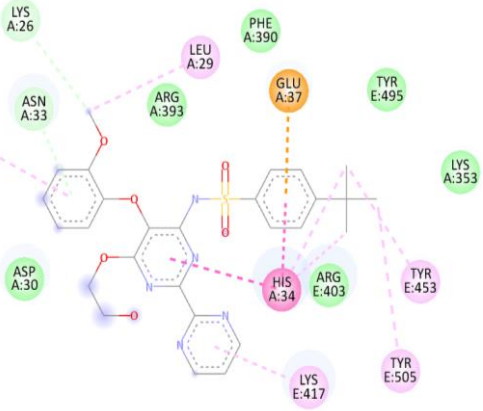
Los compuestos que mayor energía de unión presentan son los capaces de entablar interacciones polares como enlace puente de hidrógeno y los que mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas presentan (interacciones  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alquilo y alquilo-alquilo). Se destacan Bictegravir (-10.1 kcal/mol), Compuesto #42 (Derivado de Flutamida, -9.3 kcal/mol), Compuesto #41 (Derivado de Flutamida, -8.7 kcal/mol), Praziquantel (-8.6 kcal/mol) y Bosentan (-8.5 kcal/mol).

Se recuerda al lector que el sitio bisagra es el sitio donde se hipotetiza estructural y bioinformáticamente que se unen los compuestos activadores de la enzima. Estudios previos donde se realizó una búsqueda de activadores de la actividad enzimática demostraron modos de unión similares a los aquí obtenidos para la región bisagra de ACE2, justificando que la metodología fue correctamente desarrollada. Esos modos de unión similares de estudios previos contactan con los residuos del subdominio I LYS 94, LEU 95, GLU 98 y GLU 102 y del subdominio II TYR 202, ASP 206, VAL 209, ASN 210, PRO 565 y TRP 566 (Fiorillo et. al., 2022). En este trabajo se obtuvieron contactos con todos los residuos previamente mencionados excepto con GLU 102 y TYR 202.

#### **6.1.4 Análisis de interacciones entre los residuos del sitio de unión con RBD de Spike y los compuestos dockeados:**

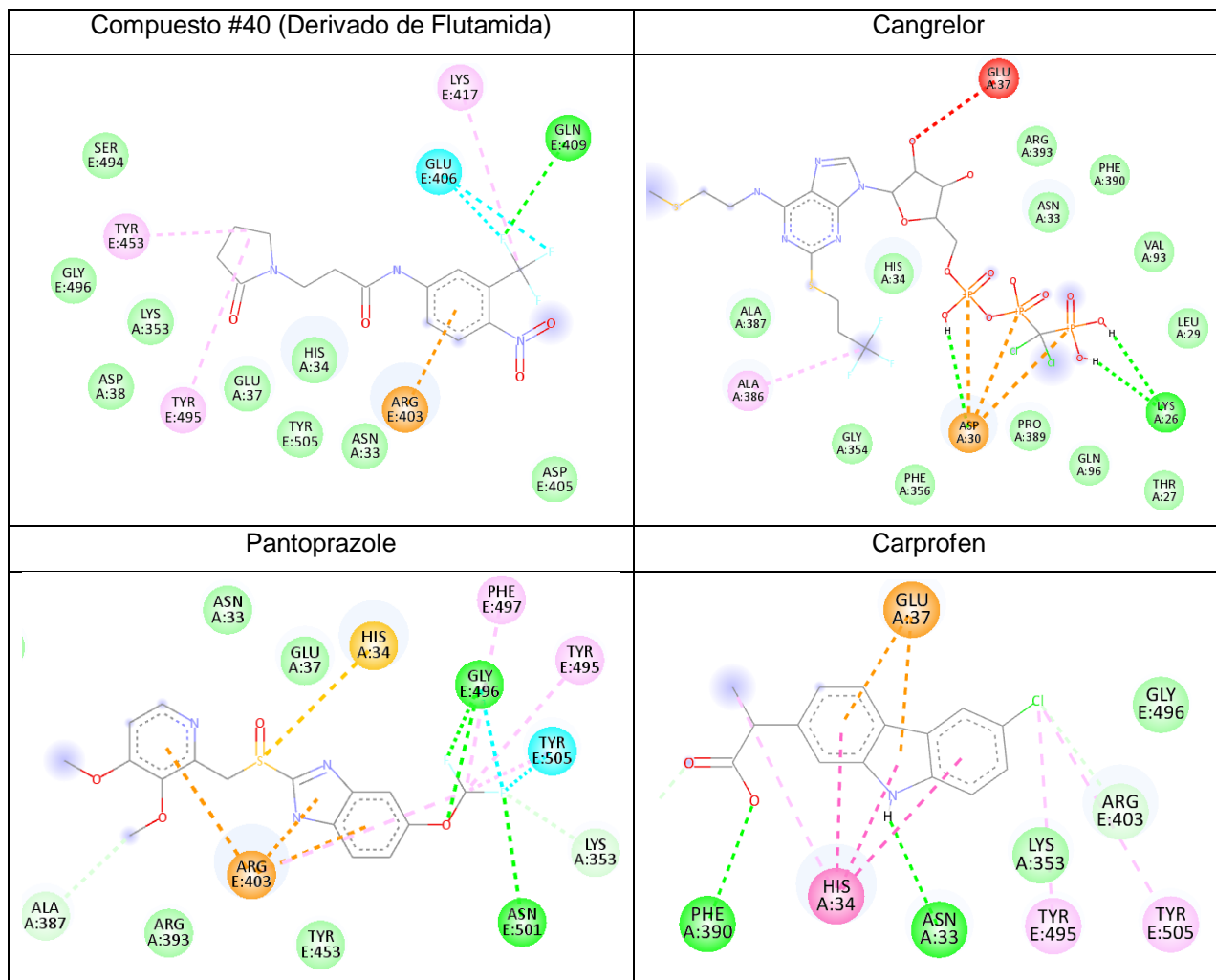
En el sitio de unión con RBD de Spike los residuos que presentaron el mayor número de interacciones con los 10 compuestos con mejor energía de unión son HIS 34 (18 interacciones totales, 6  $\pi$ - $\pi$ , 2 enlace puente hidrógeno, 2 interacciones C-H, 1  $\pi$ -sulfuro), ARG 403 (14 interacciones totales, 6  $\pi$ -catión, 3 enlaces puente hidrógeno, y 2 interacciones C-H), TYR 505 (6 interacciones totales, 1 enlace puente hidrógeno, 1 interacción C-H, 3 interacciones  $\pi$ -alquilo), TYR 495 (6 interacciones totales, 2 interacciones C-H, 4 interacciones  $\pi$ -alquilo), GLU 37 (5 interacciones totales, 3  $\pi$ -anión, 1 enlace puente hidrógeno) y ASN 33 (5 interacciones totales, 3 enlaces puente hidrógeno, 2 interacciones C-H) (Ver Tabla 5).

**Tabla 5: Interacciones en 2D de los 10 mejores compuestos con los residuos del sitio de unión con RBD de Spike.**

Bictegravir	Compuesto #46 (Derivado de Carprofen)
	
Compuesto #41 (Derivado de Flutamida)	Compuesto #42 (Derivado de Flutamida)
	
Compuesto #52 (Derivado de Melatonina)	Bosentan
	



**Tabla 5 (continuación)**



Las interacciones que predominan entre los ligandos y los residuos de este sitio son las del tipo polar y electrostáticas. El tipo de interacción más directa y fuerte que prevalece entre residuos y compuestos es la de enlace puente de hidrógeno, con 25 interacciones totales entre los 10 compuestos, seguida por las interacciones electrostáticas ( $\pi$ -catión,  $\pi$ -anión), con 16 interacciones totales entre los 10 compuestos. Se puede observar el mismo fenómeno que en el sitio activo, donde algunos compuestos eran capaces de generar interacciones electrostáticas con los que presentan cadenas laterales con carga negativa. Este es el caso de GLU 37, que establece estas interacciones con anillos aromáticos con densidades de carga positiva presentes en 3 de los 10 compuestos. Los residuos que presentan cadenas laterales con densidades de carga positiva como ARG 403 y ARG 393 son capaces de establecer interacciones  $\pi$ -catión con los anillos aromáticos presentes en compuestos como los Compuestos #41 y #42.

Los compuestos que mayor energía de unión presentan son los capaces de entablar interacciones polares como enlace puente de hidrógeno y las interacciones electrostáticas con los residuos cercanos. Se destacan Bictegravir (-9.0 kcal/mol), Compuesto #46 (Derivado de Carprofen, -8.0 kcal/mol), Compuesto #41 (Derivado de Flutamida, -7.8 kcal/mol), Compuesto

#42 (Derivado de Flutamida, -7.6 kcal/mol) y Compuesto #52 (Derivado de Melatonina, -7.5 kcal/mol). Los compuestos que más interacciones totales presentan con los residuos son Compuesto #41 (15 interacciones totales), Compuesto #42 (13 interacciones totales) y Pantoprazole (13 interacciones totales) donde en todos predominan las interacciones polares. Se remarca que para Pantoprazole a pesar de tener buena cantidad de interacciones, no obtiene un gran valor de energía de unión (puesto 9 de 10).

Los compuestos interaccionan con varios residuos identificados como los responsables de entablar interacciones enlace puente hidrógeno y puentes salinos entre ACE2 y el CTD de SARS-CoV-2. Por ejemplo, ACE2 Y el CTD de SARS-CoV-2 forman enlaces puente de hidrógeno y puentes salinos entre los residuos del CTD de SARS-CoV-2 TYR 453, ALA 475, ASN 487, GLU 484 y LYS 417 con HIS 34, SER 19, GLN 24, LYS 31 y ASP 30 respectivamente, pertenecientes a ACE2 (Wang et. al., 2020). Ocho de los 10 compuestos con mejor energía de unión interaccionan con HIS 34 (6 interacciones  $\pi$ - $\pi$ , 2 enlace puente hidrógeno) de ACE2, y cuatro de los 10 compuestos interaccionan con TYR 453 (enlaces puente hidrógeno, interacciones C-H e interacciones hidrofóbicas) del CTD de SARS-CoV-2. Otros residuos como GLU 37 de ACE2 y TYR 505 del CTD de SARS-CoV-2 forman interacciones entre sí para la unión de Spike (Wang et. al., 2020). Se han encontrado varios compuestos en el docking que generan interacciones electrostáticas ( $\pi$ -anión) con GLU 37, como Compuesto # 41 (Derivado de Flutamida, también hace enlace puente hidrógeno con TYR 505), Compuesto #46 (Derivado de Carprofen) y Bosentan, gracias a sus anillos aromáticos que interaccionan con la cadena lateral negativamente cargada de GLU 37.

## 6.2 Ensayo de Actividad Enzimática

Se evaluaron los efectos de los compuestos utilizados en el docking molecular sobre la actividad enzimática de ACE2 utilizando la técnica del péptido fluorescente Mca-APK-Dnp descrita en la sección de metodología. El ensayo funcionó correctamente observándose una completa inhibición por MLN-4760 tal como es esperable para un inhibidor selectivo tan potente (Ver Figura 21). Se pueden encontrar las actividades de todos los compuestos en todos los ensayos en forma de gráfico de barras. Se llevaron a cabo 3 ensayos con diferentes concentraciones de péptido sustrato y enzima, donde se logró observar diferentes comportamientos para los compuestos ensayados (Ver Figura 21). Interesantemente, no se identificaron inhibidores de ACE2, solo se pudo observar una leve inhibición en dos de los ensayos para la Flutamida. Por el contrario, se identificaron 12 compuestos que lograron aumentar la actividad enzimática de ACE2 en más del 50% en los tres diferentes ensayos: Bosentan, Compuesto #37, Compuesto #39, Compuesto #40, Compuesto #43, Compuesto #47, Compuesto #48, Compuesto #52, Pantoprazole, Compuesto #53, Compuesto #55 y Compuesto #45.

Figura 21: Evaluación de los efectos de los compuestos dockeados sobre la actividad de ACE2. A) Ensayo I, Condiciones: Péptido sustrato 20  $\mu$ M, ACE2 con dominio cuello 0.89 nM, compuestos 50  $\mu$ M. B) Ensayo II, Condiciones: Péptido sustrato 7  $\mu$ M, ACE2 con dominio cuello 0.34 nM, compuestos 50  $\mu$ M. C) Ensayo III, Condiciones: Péptido sustrato 7  $\mu$ M, ACE2 sin dominio cuello 2.8 nM, compuestos 50  $\mu$ M. Se representa la actividad en comparación con un control negativo donde solo se agregó el solvente (DMSO). Cada color representa al compuesto madre y a su familia de derivados.

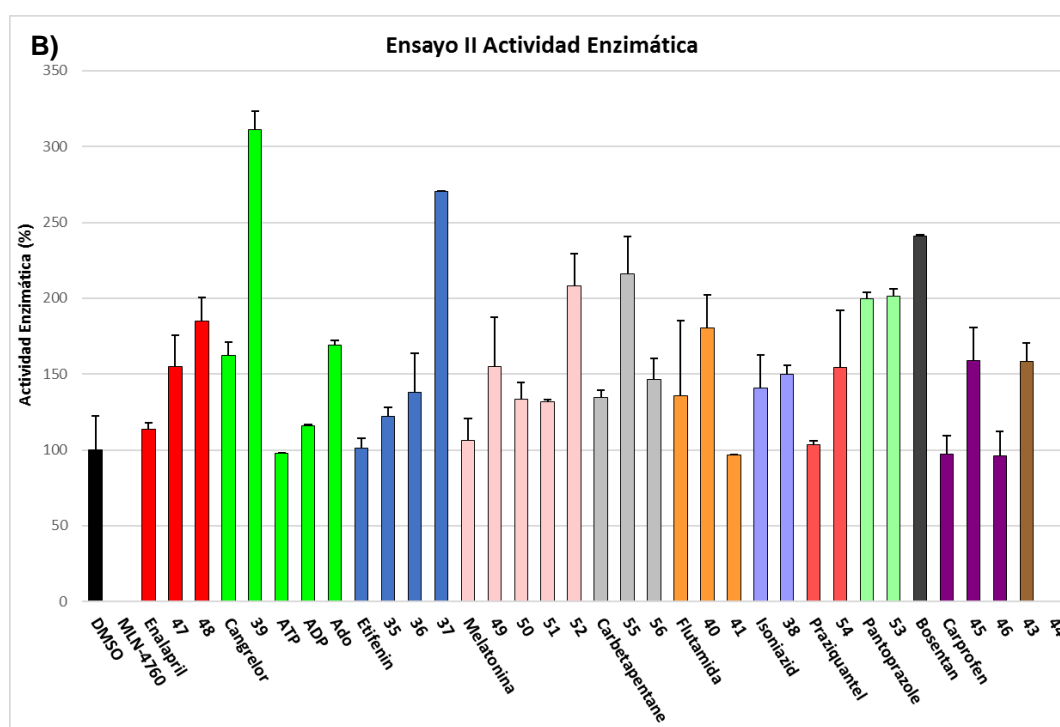
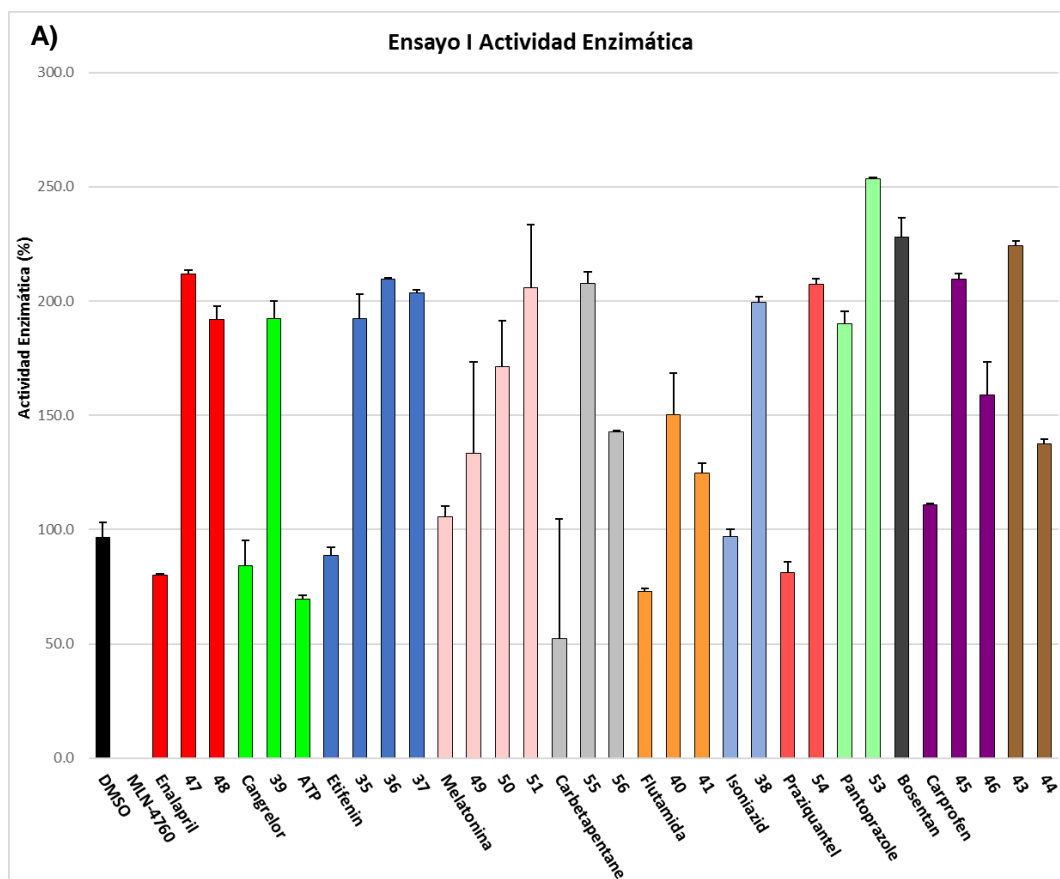
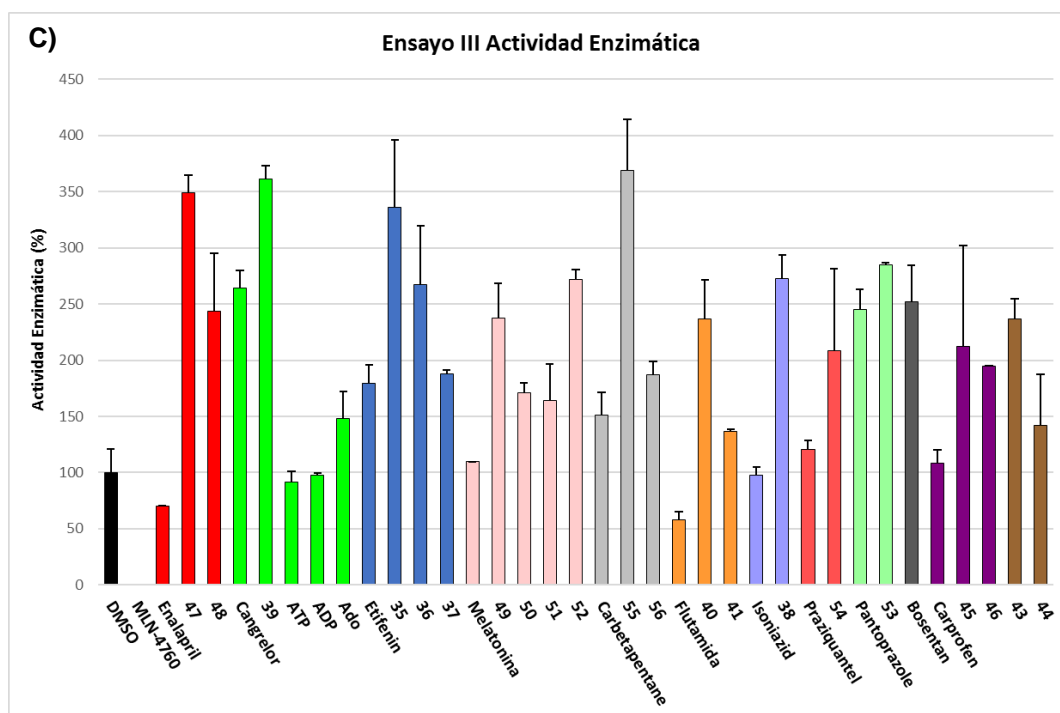


Figura 21: Continuación.



En la Tabla 6 se pueden observar los compuestos con mejor modulación de la actividad enzimática de ACE2 y comparar los niveles de activación con las energías de unión obtenidas para los dockings moleculares realizados en los tres sitios. Teniendo en consideración que los compuestos tienen efectos de aumento de la actividad enzimática, es poco probable que el sitio de unión real sea el sitio activo dado que en dicho caso se comportarían como inhibidores competitivos, tal como es el caso de MLN-4760. Sin embargo, es probable que la unión de los compuestos al sitio bisagra o al sitio de unión a Spike module alostéricamente la actividad enzimática.

Tabla 6: Los compuestos con mejor regulación de la actividad enzimática en ningún orden particular. N/A-N/A-N/A representa los compuestos que no pudieron ser preparados para un docking debido a su estructura molecular.

Nombre	Energía de unión (kcal/mol) (sitio activo/ bisagra/ interacción RBD)	Actividad Enzimática de ACE2 (%)		
		Ensayo I	Ensayo II	Ensayo III
Bosentan	-9.7/-8.5/-7.4	228±8	240±0	251±32
Compuesto #37 (Derivado de Etifenin)	-8.1/-7.0/-5.6	203±1	270±0	187±3
Compuesto #39 (Derivado de Cangrelor)	-8.2/-7.2/-6.1	192±7	311±12	361±11
Compuesto #40 (Derivado de Flutamida)	-8.6/-7.9/-7.4	150±18	180±21	236±34
Compuesto #43 (Derivado de Bortezomib)	N/A-N/A-N/A	224±2	158±12	236±18
Compuesto #47 (Derivado de Enalapril)	-8.8/-7.9/-7.0	211±1	154±20	349±15
Compuesto #48 (Derivado de Enalapril)	-8.0/-6.8/-6.2	192±5	185±15	243±51
Compuesto #52 (Derivado de Melatonina)	-8.3/-8.4/-7.5	N/A	208±21	271±8
Pantoprazole	-8.4/-7.7/-7.3	190±5	199±3	245±17
Compuesto #53 (Derivado de Pantoprazole)	N/A-N/A-N/A	253±0	201±4	285±2
Compuesto #55 (Derivado de Carbetapentane)	N/A-N/A-N/A	207±4	216±24	369±45
Compuesto #45 (Derivado de Carprofen)	-8.4/-7.4/-6.7	209±2	159±21	212±89

## 7 Discusión

En este trabajo, se intentó comprender cómo ciertas moléculas pueden ser desarrolladas, modificadas o reutilizadas para sondear la dinámica de ACE2 y modular su actividad enzimática. Con esto en consideración, se dockearon 30 compuestos (ver Anexo I), algunos, fármacos ya conocidos, y otros, derivados de éstos, en 3 sitios estructurales de la proteína distintos y relevantes tanto para la actividad enzimática como para la interacción con el RBD de Spike, en sus estructuras abierta y cerrada (Ver Estructura y Dinámica de ACE2). Estos compuestos fueron luego analizados *in vitro* en un ensayo de actividad enzimática donde se pudo identificar al menos 12 compuestos que generaron un aumento de la actividad en más del 90% en los tres ensayos realizados. Se destaca de entrada que los valores de energía de unión para el sitio activo (PDB ID:1R4L) son mayores que para los otros dos sitios donde se realizó el docking. Esto se puede deber a que Autodock Vina está programado para reconocer fácilmente un docking ligando-proteína en un sitio catalítico.

### 7.1 Docking Molecular

#### 7.1.1 Sitio Activo

Los ensayos de docking molecular permitieron obtener valores de energía de unión para los compuestos evaluados iguales y mayores que MLN-4760, al menos en el sitio activo. En el sitio activo la gran mayoría de los mejores hits obtenidos comparten interacciones con los residuos con los que MLN-4760 interactúa, siendo que, a la vez, algunos de esos residuos son críticos para la actividad enzimática, como ARG 273, HIS 345, HIS 505 y GLU 375. Esto indica que los compuestos evaluados se posicionan en los mismos subsitios del sitio activo en los que MLN-4760 se une, a pesar de sus diferencias en la orientación espacial, tamaño y polaridad. Se destacan Bictegravir, Compuesto #41 y Compuesto #42 (ambos derivados de Flutamida) que se hallan dentro del top 4 de las más altas energías de unión en todos los sitios. Esto puede ser debido a su gran variedad en densidades de carga positivas y negativas distribuidas a lo largo de la molécula, permitiéndoles entablar tanto enlaces puente hidrógeno con residuos polares como interacciones electrostáticas  $\pi$ -anión/catión debido a sus anillos aromáticos con densidades de carga generadas por sustituciones con grupos nitro o halógenos. El subsitio S1 del sitio activo descrito por Towler et. al., 2004 es mayoritariamente polar y es donde el ión  $Zn^{2+}$  se compleja. Un compuesto capaz de entablar enlaces puente hidrógeno o puentes salinos con los grupos amino de las cadenas laterales de ARG 273 y ARG 514, con los nitrógenos de los grupos imidazol de la cadena lateral de HIS 345 e HIS 505, con el ión  $Zn^{2+}$  y con el grupo fenol de la cadena lateral de TYR 515 encajaría bien allí. Grupos con densidades de carga negativa encajarían bien en este subsitio siendo relevantes a la hora de pensar un posible inhibidor, junto con el grupo isobutilo similar cadena lateral de Leucina presente en MLN-4760, que establece interacciones hidrofóbicas ( $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ - $\pi$ , alquilo) con TYR 510 en varios de los

compuestos dockeados. Por otro lado y haciendo contraste con su par, el subsitio S1' presenta cercanía con residuos como ASP 368 y GLU 145, generando densidades de carga negativa con sus cadenas laterales con grupos carboxílicos, por lo que un anillo aromático con densidad de carga positiva generada por una sustitución con halógenos puede ser una opción viable a la hora de pensar un inhibidor. Es importante no dejar de lado la importancia de simular la unión peptídica HIS-LEU presente en MLN-4760, con el grupo imidazol de la histidina, siendo el lugar donde el inhibidor es "clivado" por la enzima.

### **7.1.2 Sitio bisagra**

El sitio bisagra, según bibliografía previa, es teóricamente el lugar donde los compuestos capaces de incrementar la actividad enzimática realizan su unión. Se evaluaron las interacciones de estos compuestos con esta capacidad para ver si compartían interacciones en común con algunos residuos del mismo. Se observó, al igual que en el análisis de los compuestos con mejor energía de unión al sitio bisagra, que son las interacciones hidrofóbicas las predominantes. Las zonas hidrofóbicas de los compuestos se posicionan en cercanías de los residuos LEU 95, LYS 562, VAL 209 y TRP 566, con los cuales generan interacciones  $\pi$ - $\sigma$  alquilo-alquilo/ $\pi$ -alquilo. A la vez, las pocas interacciones polares que hay se concretan con la interacción del residuo ASP 206. Al hacer un análisis de polaridad de los compuestos capaces de aumentar la actividad enzimática, se observó que la gran mayoría son de polaridad baja, lo que es un indicio de por qué presentan tanta afinidad por el sitio bisagra, el cual es dominado por interacciones hidrofóbicas según lo observado en el docking, reforzando la hipótesis de que el sitio bisagra es el lugar donde se unen los activadores de ACE2.

### **7.1.3 Sitio de Interacción con Spike**

Se presentaron compuestos con una energía de unión relativamente alta (mayor que -6.0 kcal/mol) para el sitio de interacción con el CTD de SARS-CoV-2, y que compartan interacciones polares con los residuos de ACE2 que hacen contactos polares con CTD de SARS-CoV-2 puede indicar que estos compuestos son capaces de competir con la proteína Spike en la unión con ACE2, no sólo uniéndose a ACE2 y generando un cambio conformacional que desfavorece la interacción con Spike, sino también interaccionando polarmente con residuos del CTD de SARS-CoV-2.

## **7.2 Actividad Enzimática**

Se encontraron compuestos que aumentan significativamente la actividad enzimática en los tres ensayos, y que, a la vez, presentan buena energía de unión en el sitio bisagra, lo cual da indicios de que pueden llegar a ser posibles activadores. Estos compuestos son Bosentan (-8.5 kcal/mol de energía de unión en sitio bisagra, más del 100% de incremento de actividad en los tres ensayos y que a la vez es un top 5 en todos los sitios evaluados), Compuesto #39 (Derivado de Cangrelor, -7.2 kcal/mol de energía de unión en sitio bisagra e incremento de actividad del más del 100% en los tres ensayos), Compuesto #52 (Derivado de Melatonina, -8.4

kcal/mol de energía de unión en sitio bisagra e incremento de actividad de más del 100% en dos ensayos), Pantoprazole (-7.7 kcal/mol de energía de unión en sitio bisagra e incremento de actividad de más del 90% en los tres ensayos) y Compuesto #45 (Derivado de Carprofen, -7.4 kcal/mol de energía de unión en sitio bisagra e incremento de actividad de más del 100% en 2 ensayos). Estos compuestos son diversos en sus estructuras, yendo desde compuestos de tamaño pequeño (Compuesto #52) a grande (Compuesto #39) y compuestos hidrofóbicos (Bosentan, Compuesto #37, Compuesto #45) a compuestos más polares (Compuesto #47, Compuesto #48), lo que no da una idea general de cómo debería ser un supuesto activador de la enzima. Todos los compuestos capaces de incrementar la actividad enzimática más de un 90% presentan energías de unión relativamente altas (mayores a -6.0 kcal/mol) en todos los sitios evaluados en el docking molecular. Esto da indicios para plantear la hipótesis que puede haber mecanismos nuevos no conocidos que generen un incremento de la actividad enzimática, y no se deba específicamente a la interacción alostérica entre el sitio bisagra y el sitio activo como se indica según otros autores. En el ensayo III de actividad enzimática se obtuvieron valores mayores de aumento de actividad para los compuestos que en los otros ensayos. Esto se puede atribuir a dos razones, este ensayo se llevó a cabo con ACE2 sin dominio cuello a diferencia de los otros ensayos. Por otro lado, se utilizó una concentración de enzima mucho mayor que en los ensayos previos. Cualquiera de estos dos factores podría explicar este comportamiento.

A pesar de observar un aumento significativo de la actividad enzimática en presencia de 12 compuestos, no es sabido en qué sitio realizan su unión con ACE2. La bibliografía previa propone que estructuralmente, el sitio bisagra es el lugar más adecuado para la unión de activadores, que mediante un posible mecanismo alostérico generando cambios conformacionales en el sitio activo, regula la actividad de la enzima. Una forma de verificar si estos compuestos se unen al sitio bisagra sería mediante cristalografía de rayos X, por ejemplo, con un compuesto prometedor que de indicios de unión como lo son un alto valor de energía de unión en el sitio bisagra y el aumento de la actividad enzimática *in vitro*. Esto permitiría obtener una "foto" de la interacción entre el compuesto y la enzima, con detalles de qué residuos son críticos para su interacción. Una opción sencilla sería realizar una mutación en algún residuo del sitio bisagra que se crea crítico. Por ejemplo, los compuestos Bosentan y el Compuesto #39 generan un aumento significativo en la actividad enzimática (más del 100% de aumento) y a la vez comparten interacciones hidrofóbicas (alquilo-alquilo,  $\pi$ -alquilo) con el residuo LEU 95 según el docking. Otros compuestos como Compuesto #52, Compuesto #40 y Compuesto #47 también interaccionan con LEU 95 (interacción  $\pi$ - $\sigma$ ) y son capaces de generar un aumento significativo de la actividad enzimática. Si se mutara a LEU95 y se haría nuevamente un ensayo de actividad enzimática y no se logra observar el mismo aumento de la actividad visto con ACE2 nativa, probablemente sea porque la unión con LEU95 si era crítica para el aumento de la actividad, y reforzaría la hipótesis del sitio bisagra como el lugar de unión de los activadores de ACE2. Es importante no descartar que si los ensayos recién mencionados no dan frutos, quizás el mecanismo de activación sea distinto al planteado en



base a la bibliografía conocida, lo cual abriría nuevas líneas de investigación para profundizar el conocimiento sobre la regulación molecular de ACE2.

Ensayos de actividad enzimática realizados por nuestra colaboradora, la Dra. Gironacci (IQUIFIB, UBA-CONICET), utilizando el sustrato original de la enzima (Ang 1-7), validaron los resultados de incremento de actividad enzimática para el Compuesto #39, y a la vez arrojó un alto incremento en la actividad enzimática para el Compuesto #41, que se encuentra en el top 4 de los compuestos con mejor energía de unión en todos los sitios evaluados. Al lograr obtener resultados similares con la utilización de otra metodología para el análisis de la actividad enzimática, refuerza los resultados obtenidos para el Compuesto #39. Llama la atención que el compuesto madre de #39, el Cangrelor, no genere un aumento tan significativo de la actividad como su análogo #39. La diferencia más notable que presentan entre sí es que #39 no contiene un grupo trifosfato a diferencia de Cangrelor. Este grupo, al ser tan voluminoso, puede generar un impedimento estérico notable a la hora de interaccionar con un sitio como es el bisagra, de pequeño volumen. A la vez, Cangrelor presenta mayor energía de unión para el docking en todos los sitios, lo cual es contradictorio de lo mencionado sobre su tamaño. Sin embargo, un grupo trifosfato puede aumentar drásticamente el número de interacciones polares del compuesto con la proteína. Además, según ensayos AlphaLISA no publicados realizados por un colaborador, se detectó que los compuestos madre de #39 y #41 (Cangrelor y Flutamida respectivamente) eran capaces de irrumpir la unión con el RBD de Spike. Que el Compuesto #39 sea derivado de Cangrelor (un anticoagulante, contrarresta la patología observada en varios casos de COVID-19 como trombosis) y que su compuesto madre (Cangrelor) irrumpa la unión con el RBD de Spike, le da fuerza a la hipótesis de que puede ser un posible activador de ACE2, y que a la vez rompa la interacción con el RBD de Spike. Se planean seguir los resultados de esta investigación con ensayos *ex vivo* (utilizando órganos aislados) para ver si los compuestos que generan activación *in vitro* de ACE2 según estos ensayos, pueden inducir la relajación de la arteria umbilical. Resultados positivos permitirán iniciar ensayos *in vivo* donde se evaluará la potencia de los compuestos para normalizar los parámetros de presión arterial y funcionalidad cardíaca en un modelo de hipertensión murina.

En nuevos ensayos de actividad enzimática de ACE2 realizados con otras condiciones (buffer MES pH = 6.8; concentración de compuestos a evaluar: 100µM) (datos no publicados) se logró validar la activación del Compuesto #39 y de Bosentan, junto con una potente inhibición por parte del Bictegravir (no evaluado en nuestro trabajo).

## 8 Conclusiones

Las conclusiones que se pueden derivar de este trabajo son varias. Lo primero que se destaca es que el Docking Molecular resultó ser una herramienta predictiva para algunos de los compuestos que generan modulación de actividad en ACE2. Esto se puede observar en el caso del Bosentan y Bictegravir, siendo un compuesto que están en el top 5 de valores más altos de energías de unión en todos los sitios evaluados y a la vez logran modular la actividad de ACE2 de manera significativa. Por otro lado, compuestos con un alto valor de energía de unión no resultaron relevantes para la actividad enzimática, como el caso de los Compuestos #41 y #42. Finalmente, compuestos con un valor de docking no destacable (en los sitios bisagra y de interacción con Spike) lograron una modulación significativa de la actividad de ACE2, como es el caso de Compuesto #48 y Compuesto #37. Esto indica que un análisis *in silico* junto con un ensayo de actividad *in vitro* son capaces de orientar en la dirección correcta en la búsqueda de moduladores de esta enzima.

No hay un farmacóforo o patrón en las moléculas capaces de modular la actividad de ACE2. Los mejores moduladores presentan diferentes tamaños y polaridades, impidiendo establecer una conexión con alguna estructura determinada.

Mediante los ensayos *in silico* de docking molecular se logró validar cuales son los aminoácidos más relevantes a la hora de establecer interacciones con posibles moduladores en todos los sitios evaluados, junto con su tipo de interacción (electrostática, puente de hidrógeno, etc.) predominante.

No se puede confirmar ni descartar que ACE2 sea capaz de modular su actividad alostéricamente. Se obtuvieron indicios de compuestos capaces de modular la actividad analizados en diferentes condiciones con diferentes metodologías.

## 9 Bibliografía

- Banu, N.; Panikar, S. S.; Leal, L. R.; Leal, A. R. (2020). Protective Role of ACE2 and Its Downregulation in SARS-CoV-2 Infection Leading to Macrophage Activation Syndrome: Therapeutic Implications. *Life Sci.* 2020, 256, 117905.
- Bell, E.W., Zhang, Y. (2019). DockRMSD an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *Journal of Cheminformatics*, 11:40.
- Blat, Y. (2010). Non-competitive inhibition by active site binders. *Chem. Biol. Drug Des* 2010, 75 (6), 535–540.
- Byrnes JJ, Gross S, Ellard C, Connolly K, Donahue S, Picarella D (2009). Effects of the ACE2 inhibitor GL1001 on acute dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Inflamm Res.* 2009 Nov;58(11):819-27.
- Danilczyk U, Penninger JM (2006). Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res.* 2006 Mar 3;98(4):463-71.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.*;87(5):E1-9.
- Dutta K. Allosteric Site of ACE-2 as a Drug Target for COVID-19 (2022). *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2022;5(3):179-182.
- Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, Diz DI, Gallagher PE (2005). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin converting enzyme 2. *Circulation.* 2005; 111:2605–2610.
- Fiorillo B, Marchianò S, Moraca F, Sepe V, Carino A, Rapacciuolo P, Biagioli M, Limongelli V, Zampella A, Catalanotti B, Fiorucci S (2022). Discovery of Bile Acid Derivatives as Potent ACE2 Activators by Virtual Screening and Essential Dynamics. *J Chem Inf Model.* ;62(1):196-209.
- Fyhrquist F., Saijonmaa O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.*; 264(3):224-36.
- Gao K., Oerlemans R., Groves M.R. (2020). Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophys Rev.* 2020 Feb;12(1):85-104.

- Gheblawi M., Wang K., Viveiros A., Nguyen Q., Zhong J.C., Turner A.J., Raizada M.K., Grant M.B., Oudit G.Y. (2020). Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res*; 126(10):1456-1474.
- Gross, L., Sacerdoti, M., Piiper, A., Zeuzem, S., Leroux, A., & Biondi, R. (2020). ACE2, the Receptor that Enables Infection by SARS-CoV-2: Biochemistry, Structure, Allostery and Evaluation of the Potential Development of ACE2 Modulators. *ChemMedChem*, 1682-1690.
- Guy, J. L.; Jackson, R. M.; Jensen, H. A.; Hooper, N. M.; Turner, A. J. (2005). Identification of critical active-site residues in angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) by site-directed mutagenesis. *FEBS J.* 2005, 272 (14), 3512–3520.
- Hernández Prada J.A., Ferreira A.J., Katovich M.J., Shenoy V., Qi Y., Santos R.A., Castellano R.K., Lampkins A.J., Gubala V., Ostrov D.A., Raizada M.K. (2008). Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension* (5):1312-7.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8.
- Huentelman, M. J., Zubcevic, J., Prada, J. A., Xiao, X., Dimitrov, D. S., Raizada, M. K., & Ostrov, D. A. (2004). Structure-Based Discovery of a Novel Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitor. *Hypertension*, 903-906.
- Huentelman M.J., Grobe J.L., Vazquez J., Stewart J.M., Mecca A.P., Katovich M.J., Ferrario C.M., Raizada M.K. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol.* 2005;90:783–790.
- Khelfaoui, H., Harkati, D., & Saleh, B. A. (2020). Molecular docking, molecular dynamics simulations and reactivity, studies on approved drugs library targeting ACE2 and SARS-CoV-2 binding with ACE2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2021 Nov; 39(18):7246-7262.
- Kulemina L.V., Ostrov D.A. (2011). Prediction of off-target effects on angiotensin-converting enzyme 2. *J Biomol Screen.* 2011 Sep;16(8):878-85.
- Kumar, S.; Thambiraja, T. S.; Karuppanan, K.; Subramaniam, G (2021). Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein. *J. Med. Virol* 2021.

- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215-220.
- Lei, Y.; Zhang, J.; Schiavon, C. R.; He, M.; Chen, L.; Shen, H.; Zhang, Y.; Yin, Q.; Cho, Y.; Andrade, L.; et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. *Circ. Res.* 2021, 128 (9), 1323–1326.
- Lu, G., Wang Q., Gao, G. F. (2015). Bat-to-human: spike features determining ‘host jump’ of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. *Trends in Microbiology*, Volume 23, Issue 8, Pages 468-478, ISSN 0966-842X.
- Lui, I.; Zhou, X.; Lim, S.; Elledge, S.; Solomon, P.; Rettko, N.; Zha, B.; Kirkemo, L.; Gramespacher, J.; Liu, J.; Muecksch, F.; Cetrulo Lorenzi, J. C.; Schmidt, F.; Weisblum, Y.; Robbiani, D.; Nussenzweig, M.; Hatziioannou, T.; Bieniasz, P.; Rosenberg, O.; & Wells, J. (2020). Trimeric SARS-CoV-2 Spike interacts with dimeric ACE2 with limited intra-Spike avidity. *bioRxiv* 2020.05.21.109157
- Matsuyama, S.; Nao, N.; Shirato, K.; Kawase, M.; Saito, S.; Takayama, I.; Nagata, N.; Sekizuka, T.; Kato, H.; Kato, F.; Sakata, M.; Tahara, M.; Kutsuna, S.; Ohmagari, N.; Kuroda, M.; Suzuki, T.; Kageyama, T.; Takeda, M. (2020). Enhanced Isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2- Expressing Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020, 117, 7001–7003.
- Nussinov, R.; Tsai, C.-J. (2012) The different ways through which specificity works in orthosteric and allosteric drugs. *Current pharmaceutical design* 2012, 18 (9), 1311–1316.
- Paz Ocaranza, M., Riquelme, J.A., García, L. (2020). Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 17, 116–129.
- 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. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605-12.
- Poglitsch M., Domenig O., Schwager C., Stranner S., Peball B., Janzek E., Wagner B., Jungwirth H., Loibner H., Schuster M. (2012). Recombinant Expression and Characterization of Human and Murine ACE2: Species-Specific Activation of the Alternative Renin-Angiotensin-System. *Int J Hypertens.* 2012.
- Prabakaran P, Xiao X, Dimitrov DS. (2004) A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 314:235–241.
- Rajapaksha, Indu G & Mak, Kai & Huang, Ping & Burrell, Louise & Angus, Peter & Herath, Chandana. (2018). The small molecule drug diminazene aceturate inhibits liver injury and biliary fibrosis in mice. *Scientific Reports.* 2018 Jul 5;8(1):10175.

- Scardino, V., Bollini, M., & Cavasotto, C. (2021). Combination of pose and rank consensus in docking-based virtual screening: the best of both worlds. *Chemrxiv*, 2.
- Sheikh A, Robertson C, Taylor B (2021). BNT162b2 and ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine Effectiveness against Death from the Delta Variant. *N Engl J Med.*;385(23):2195-2197.
- Y.-H. Shin, K. Jeong, J. Lee, H. J. Lee, J. Yim, J. Kim, S. Kim, S. B. Park (2022) Inhibition of ACE2-Spike Interaction by an ACE2 Binder Suppresses SARS-CoV-2 Entry *Angew. Chem. Int. Ed.* 2022, 61, e202115695; *Angew. Chem.* 2022, 134, e202115695.
- Te Velthuis, A. J., van den Worm, S. H., Sims, A. C., Baric, R. S., Snijder, E. J., & van Hemert, M. J. (2010). Zn(2+) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathogens*, 6.
- Terali, K., Baddal, B. & Gulcan, O. (2020). Prioritizing potential ACE2 inhibitors in the COVID-19 pandemic: Insights from a molecular mechanics-assisted structure-based virtual screening experiment. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 100. 107697.
- Towler, P., Staker, B., Prasad, S., Menon, S., Tang, J., Parsons, T., Pantoliano, M. (2004). ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 17996-18007.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). Autodock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31, 455-461.
- Verdecchia, P.; Cavallini, C.; Spanevello, A.; Angeli, F. (2020) The Pivotal Link between ACE2 Deficiency and SARS-CoV-2 Infection. *Eur. J. Intern. Med.* 2020, 76, 14– 20.
- World Health Organization (2022). COVID-19 Weekly Epidemiological Update. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---31-august-2022>
- Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, Lu G, Qiao C, Hu Y, Yuen KY, Wang Q, Zhou H, Yan J, Qi J (2020) Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell.*;181(4):894-904.e9.
- Wenthur, C. J.; Gentry, P. R.; Mathews, T. P.; Lindsley, C. W. (2014). Drugs for allosteric sites on receptors. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol* 2014, 54, 165–184.
- Wiese, O.; Allwood, B.; Zemlin, A. (2020). COVID-19 and the renin angiotensin system (RAS): A spark that sets the forest alight? *Medical hypotheses*, 144, 110231.

- Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 367(6483):1260-1263.
- Xiao, F. and K.D. Burns (2017). Measurement of Angiotensin Converting Enzyme 2 Activity in Biological Fluid (ACE2). *Methods Mol Biol*. 1527: 101-115 (2017).
- Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 367(6485):1444-1448 (2020).
- Zhang, L., Zhang, Y., Qin, X. et al. (2022) Recombinant ACE2 protein protects against acute lung injury induced by SARS-CoV-2 spike RBD protein. *Crit Care* 26, 171 (2022).
- Zhou, P., Yang, XL., Wang, XG. et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020).

## Anexo I: Energías de unión para todos los compuestos en los diferentes sitios de docking.

Sitio Activo (PDB ID: 1R4L)	
Compuesto	Energía de unión (-)(kcal/mol)
Bictegravir	12.0
Praziquantel	10.3
Compuesto #41 (Flutamida)	10.1
Compuesto #42 (Flutamida)	10.0
Cangrelor	9.9
Bosentan	9.7
Compuesto #54 (Praziquantel)	9.6
Enalapril	9.1
Compuesto #46	9.0
Compuesto #47	8.8
Carprofen	8.6
Compuesto #40 (Flutamida)	8.6
Pantoprazole	8.4
Compuesto #45	8.4
Compuesto #44	8.3
Compuesto #52	8.3
Compuesto #39	8.2
Compuesto #37	8.1
Compuesto #49	8.1
Compuesto #48	8.0
Compuesto #36	7.8
Compuesto #51	7.8
Flutamide	7.8
Carbetapentane	7.7
Etifenin	7.7
Melatonin	7.3
Compuesto #50	7.3
Compuesto #35	7.0
Compuesto #38	6.8
Isoniazid	6.0

Sitio Bisagra (PDB ID: 1R42)	
Compuesto	Energía de unión (-)(kcal/mol)
Bictegravir	10.1
Compuesto #42 (Flutamida)	9.3
Compuesto #41 (Flutamida)	8.7
Praziquantel	8.6
Bosentan	-8.5
Compuesto #54 (Praziquantel)	8.5
Compuesto #52	8.4
Cangrelor	8.3
Compuesto #40 (Flutamida)	7.9
Compuesto #47	7.9
Compuesto #46	7.8
Pantoprazole	-7.7
Compuesto #49	7.7
Compuesto #51	7.5
Compuesto #45	7.4
Carprofen	-7.3
Compuesto #44	7.3
Compuesto #39	7.2
Compuesto #50	7.2
Enalapril	7.1
Compuesto #37	7.0
Melatonin	-7.0
Etifenin	-6.8
Compuesto #36	6.8
Compuesto #48	6.8
Compuesto #35	6.7
Flutamide	-6.6
Carbetapentane	-6.4
Isoniazid	-5.6
Compuesto #38	5.5

Sitio interacción con Spike (PDB ID:6M0J)	
Compuesto	Energía de unión (-)(kcal/mol)
Bictegravir	9.0
Compuesto #46	8.0
Compuesto #41 (Flutamida)	7.8
Compuesto #42 (Flutamida)	7.6
Compuesto #52	7.5
Bosentan	7.4
Compuesto #40 (Flutamida)	7.4
Cangrelor	7.3
Pantoprazole	-7.3
Carprofen	-7.2
Praziquantel	-7.2
Compuesto #49	7.2
Compuesto #51	7.1
Compuesto #47	7.0
Compuesto #54	7.0
Compuesto #50	6.9
Enalapril	6.8
Compuesto #45	6.7
Flutamide	-6.3
Melatonin	-6.2
Compuesto #48	6.2
Carbetapentane	-6.1
Compuesto #39	6.1
Compuesto #36	5.9
Compuesto #37	5.6
Compuesto #44	5.6
Etifenin	-5.2
Isoniazid	-5.2
Compuesto #35	5.0
Compuesto #38	5.0