



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS *IN SILICO* DE LA PROTEASA M^{pro} DEL VIRUS SARS-CoV-2 Y SU INTERACCIÓN CON COMPUESTOS ANÁLOGOS (*IN HOUSE*) DEL ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFEICO COMO POSIBLES AGENTES ANTIVIRALES.

INFORME DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.I. MANUEL ALEJANDRO HERNÁNDEZ SERDA

TUTOR:

DR. ENRIQUE R. ÁNGELES ANGUIANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CIUDAD DE MÉXICO, JULIO DE 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS *IN SILICO* DE LA PROTEASA M^{pro} DEL VIRUS SARS-CoV-2 Y SU INTERACCIÓN CON COMPUESTOS ANÁLOGOS (*IN HOUSE*) DEL ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFEICO COMO POSIBLES AGENTES ANTIVIRALES.

INFORME DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

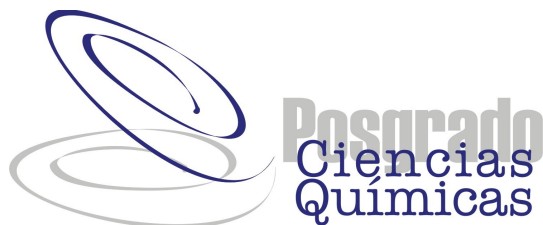
PRESENTA:

Q.I. MANUEL ALEJANDRO HERNÁNDEZ SERDA

TUTOR:

DR. ENRIQUE R. ÁNGELES ANGUIANO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



CIUDAD DE MÉXICO, JULIO DE 2022.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Vocal	Dr. Rodolfo Gómez Balderas
Vocal	Dr. Marcelino Arciniega Castro
Secretario	Dr. José Luis Medina Franco

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1 de la Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada nivel Maestría (**CVU 995278**).

Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT: **IN2020**, Cátedras de investigación: **CI2201** y DGTIC: **LANCAD-UNAM-DGTIC-034**.

Parte de los resultados fueron publicados en el siguiente artículo:

Vázquez-Valadez, V.H.; **Hernández-Serda, A.**; Jiménez-Cabiedes, M.F.; Aguirre-Vidal, P.; González-Tapia, I.; Carreño-Vargas, L.; Alarcón-López, Y.A.; Espejel-Fuentes, A.; Martínez-Soriano, P.; Lugo Álvarez, M.; Velázquez-Sánchez, A.M.; Marko Markarian, N.; Angeles, E.y Abrahamyan, L. **Evaluation of Inhibitory Activity In Silico of In-House Thiomorpholine Compounds between the ACE2 Receptor and S1 Subunit of SARS-CoV-2 Spike.** Pathogens 2021,10, 1208. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091208>

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, Rosa María Serda Castro y J. Jesús Hernández García † ; y a mis hermanos. Por todo el cariño y las enseñanzas que cada quien me ha brindado a su manera. Agradecido por la vida y por mi familia.
- Al Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano, por su confianza, paciencia y motivación para la elaboración de este y otros proyectos.
- A la Dra. Ana María Velázquez Sánchez, por procurar la paz. Por sus acertados consejos y reflexiones que siempre tendré presente en el ámbito profesional y en la vida misma.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para concluir el presente trabajo (CVU 995278).
- A la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Josefina Tenopala, Jesús Gumaro, *et al.*; por su apoyo y asistencia en todos los procesos administrativos.
- A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, por las asignaciones de recursos en la supercomputadora Miztli.
- A los miembros del jurado por las observaciones que mejoraron este trabajo y por el tiempo invertido en ello.
- A Elizabeth Rul, por ser mi luz en este mundo caótico. Gracias por tu franqueza y por nunca soltar mi mano.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Química Medicinal que confiaron y me alentaron a no rendirme. Los LQM.
- A mis compañeros y amigos, Joseline Yreta, Enrique Aguilar, Mario Alanis; con quien crucé camino durante el programa.

Índice general

Abreviaturas	v
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
Resumen	viii
1 Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 Terapia combinada	2
2.2 Inhibidores de proteasa principal (M^{pro})	3
2.3 Inhibidores de Glucoproteína S (Spike)	4
2.4 Modelado molecular de sistemas biológicos	5
2.5 Estudio de Energía Libre de Unión	7
3 Objetivos	8
3.1 Objetivo General	8
3.2 Objetivos Particulares	8
4 Metodología	9
4.1 Dinámica molecular de M^{pro} y estudio EDA	9
4.2 Acoplamiento molecular de serie LQM 700 con M^{pro}	10
4.3 Preparación de sistemas Spike y ECA2	12
4.4 Dinámica molecular de complejos ECA2-LQM300 y cálculo de energía libre con BFEE2	13
5 Resultados y Discusión	15
5.1 Sistema M^{pro}	15
5.1.1 Preparación de M^{pro}	15
5.1.2 Cribado virtual M^{pro} - LQM700	19
5.2 Sistema Spike-ECA2	21
5.2.1 Dinámica molecular sistema S1 - ECA2	21
5.2.2 Energía libre de unión para complejo ECA2-LQM300	23
6 Conclusiones	25

Abreviaturas

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CP	Cytoplasmic Domain (Dominio citoplasmático)
CTD	C-Terminal Domain (Dominio C-Terminal)
ECA2	Enzima convertidora de angiotensina 2
FP	Fusion Peptide (Peptido de fusión)
HR1	Heptad Repeat 1
kDa	kilodalton
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
MOE	Molecular Operating Environment
M^{pro}	Proteasa principal
NAMD	Not just Another Molecular Dynamics program
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTD	N-Terminal Domain (Dominio N-Terminal)
PD	Peptidase Domain (Dominio de peptidasa)
PDB	Protein Data Bank
ProDy	Protein Dynamics & Sequence Analysis
RBD	Receptor Binding Domain (Dominio de unión al receptor)
RBM	Receptor Binding Motif (Motivo de unión al receptor)
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
TM	Transmembrane (Dominio transmembrana)
TMPRSS2	Transmembrane serine protease 2 (Proteasa transmembrana de serina 2)
VMD	Visual Molecular Dynamics

Índice de figuras

1	Comparación de las estructuras de los inhibidores α -cetoamidas y los compuestos de la serie LQM 700	4
2	Representación esquemática de los componentes de la función potencial empleada en la Mecánica Molecular	6
3	Diagrama del ciclo termodinámico para los cálculos de energía libre de unión	7
4	Sistema M^{pro} en caja de solvatación a condiciones periódicas para dinámica molecular.	10
5	RMSD de la trayectoria de M^{pro} APO (6M03)	15
6	RMSD de la trayectoria de M^{pro} HOLO (5R83)	16
7	RMSD de la trayectoria de M^{pro} HOLO (6Y2F)	16
8	Resultado para dos coordenadas en el análisis de la dinámica esencial para la simulación del sistema M^{pro}	17
9	Resultado para tres coordenadas en el análisis de la dinámica esencial para la simulación del sistema M^{pro}	18
10	Resultado para 3 coordenadas en el análisis de la dinámica esencial para la simulación de los sistemas M^{pro} APO (6M03) y HOLO (5R83)	18
11	Representación en tubos para los aminoácidos del sitio catalítico M^{pro}	19
12	Racimo de modos de unión para el ligando 5R83 (lado izquierdo) y para el ligando LQM 778 (lado derecho)	20
13	RMSD para el sistema S1-ECA2 sin ligando	21
14	RMSD para los sistemas S1-ECA2-LQM300	22
15	RMSF para los sistema S1-ECA2-LQM300.	22
16	Enlaces de hidrógeno intraestructurales para la proteína ECA2	23
17	Variación de la distancia entre los aminoácidos Asn 63 y Asn 121 frente al tiempo de la simulación ACE2-LQM304 (izquierda) y ACE2-LQM322	24

Índice de tablas

1	Estructuras de los ligandos en los sistemas 5R83 y 6Y2F	9
2	Protocolo para dinámica molecular	10
3	Estructuras de la serie LQM 700	11
4	Compuestos de la serie LQM 300 utilizados en este estudio.	13
5	Residuos involucrados en el sitio activo de M^{pro}	19
6	Resultados de energía libre de unión en el acoplamiento molecular de los ligandos de la serie LQM 700 y los otros ligandos previamente reportados.	20
7	Resultados para energía libre de enlace, calculados con BFEE2 para los sistemas ECA2-LQM300 estudiados.	24

Resumen

En el presente trabajo se propone un grupo de estructuras químicas (derivados del ácido cafeico) como posibles agentes antivirales enfocándose en la inhibición de la enzima M^{pro} del virus SARS-CoV-2. Sin embargo, la investigación realizada fue más amplia ya que durante el desarrollo del tema propuesto en el título de este informe, estuve investigando el mecanismo de infección del virus SARS-CoV-2. Con la finalidad de evaluar una segunda serie de moléculas (derivados metil tiomorfolínicos) y proponer más compuestos con posible actividad antivirica enfocados en evitar la entrada del virus a la célula.

Se presentan los resultados del grupo de compuestos LQM 700 (derivados del ácido cafeico) como posibles inhibidores de la M^{pro} , también una segunda propuesta de antivirales, los cuales son el grupo de moléculas LQM 300 (derivados tiomorfolínicos) que interfieren en el mecanismo de entrada del virus SARS-CoV-2.

Los compuestos derivados del ácido cafeico (LQM 700) se proponen como agentes antivirales ya que poseen cierta similitud con estructuras de compuestos α -cetoamida ya reportados con actividad antiviral en familias de SARS-CoV. En cuanto a los compuestos metiltiomórficos (LQM 300), fueron previamente diseñados como agentes antihipertensivos presentando afinidad por el receptor ECA1 de humano demostrada experimentalmente. Utilizando técnicas de modelado molecular se evaluaron estas dos series de compuestos en dos distintos mecanismos de infección del virus SARS-CoV-2.

Se evaluó la afinidad de 5 compuestos de la serie LQM 300 por el receptor ECA2 en complejo con la subunidad S1 de la proteína espiga del SARS-CoV-2 utilizando simulaciones de dinámica molecular y se determinó que el compuesto LQM 322 posee la mejor interacción por la ECA2. Para el estudio de la serie LQM 700 se evaluaron 51 compuestos utilizando un cribado virtual, encontrando que los compuestos con mejor afinidad son LQM 778 y LQM 769. En estudios más rigurosos se corroborarán estos resultados para proponerlos como candidatos a terapia en el tratamiento de la enfermedad covid-19.

Capítulo 1

Introducción

La aparición del coronavirus en la provincia de Wuhan y su posterior expansión a nivel global ha provocado daños incommensurables a la salud y economía global debido a ello, es preciso que todos los países trabajen en colaboración para proteger a la población de futuras consecuencias debidas a la proliferación de este virus. A lo largo de esta pandemia han aparecido variantes genéticas del SARS-CoV-2 que han estado emergiendo y circulando por el mundo, sobretodo en países donde no se han tenido políticas públicas que protejan a la población. Hasta la fecha se tiene registro de 11 variantes bajo monitoreo (VBM) y una variante de preocupación (VOC) la llamada ómicron, con 7 linajes hasta la fecha (B.1.1.529, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5).¹

El protocolo actual para la enfermedad de covid-19 dicta que los pacientes con alto riesgo de progresión de la enfermedad sean tratados con una preparación de anticuerpos monoclonales o con un medicamento antiviral. Estos tratamientos² recientemente aprobados no quedan exentos de que, a largo plazo, una potencial resistencia sea desarrollada por parte del virus.

La experiencia pasada demuestra que el uso de un fármaco en lugar de una combinación de ellos eleva las probabilidades de que los virus desarrollen resistencia con el tiempo, lo que podría conducir a una pandemia de virus resistentes a los fármacos.³

Uno de los papeles de la química medicinal es el entendimiento de las enfermedades para colaborar en la producción de entidades químicas con propósitos medicinales y así contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes que presentan dichas enfermedades. El desarrollo de fármacos es un procedimiento amplio y costoso, así que, para agilizar este proceso se involucran técnicas de simulación computacional, lo cual se ha vuelto una parte imprescindible ya que permite identificar y optimizar compuestos como posibles candidatos a fármacos antes del proceso de ser sintetizados.

En este trabajo se utilizaron diversas técnicas computacionales para analizar y evaluar dos blancos biológicos del SARS-CoV-2: la proteasa principal M^{pro} y la glucoproteína *spike*. Se investigaron los comportamientos *in silico* de los complejos correspondientes para estimar la eficacia que tendrían dos series de compuestos: LQM 300's y LQM 700's como propuesta a dos vías de tratamiento para la enfermedad covid-19.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Terapia combinada

Los fármacos antivirales actúan dirigiéndose a un sitio específico encontrado en el virus. Cuando un virus desarrolla cambios en el sitio que los medicamentos antivirales utilizan para actuar, ese virus puede mostrar una susceptibilidad reducida o nula al mismo medicamento antiviral. Los medicamentos antivirales pueden no funcionar con la respuesta deseada contra los virus con susceptibilidad reducida.

Los virus de la gripe, a lo largo del tiempo, han mostrado una susceptibilidad reducida a uno o más medicamentos antivirales empleados como la amantadina y la rimantadina, este último antiviral, usado para la prevención y tratamiento de la gripe en 1976, fue utilizado hasta que cuatro años después, en 1980, las primeras evidencias de la resistencia de los virus a la amantadina extenderían su periodo de incremento en la frecuencia hasta principios de la década de los 2000. Desde entonces los centros para el control y prevención de enfermedades (CDC) ya no recomiendan su uso, desde 2011, debido a la resistencia generalizada a esta clase de antivirales entre los virus de la gripe A en circulación. Así mismo, se discontinuó su uso para tratar la gripe aviara causada por el virus de la influenza H5N1.^{4,5}

Debemos tener en cuenta las lecciones de anteriores epidemias de gripe y VIH sobre la resistencia a los medicamentos. Durante los primeros días de la investigación sobre el VIH, el fármaco azidotimidina, conocido como AZT, se prescribía a los pacientes con VIH como monoterapia con resultados positivos iniciales. Sin embargo, ese enfoque acabó provocando una resistencia en algunos pacientes y la transmisión de un virus evolucionado.⁶ Fue esta experiencia la que condujo al desarrollo del estándar para el tratamiento del VIH: la terapia antirretroviral combinada.⁷

Las terapias combinadas han tenido un valor incalculable para la quimioterapia contra el cáncer y las infecciones víricas crónicas, como el VIH, mediante la terapia antirretrovírica de gran actividad (HAART), para reducir el potencial de resistencia y también para restringir los niveles de infección debido a la escasa eficacia de los antivirales para eliminar el virus.⁶

Este tipo de combinaciones suelen dirigirse a una vía común o relacionada con la enfermedad como: impedir que el virus haga copias de sí mismo en el organismo, reducir el daño que puede causar, retrasar el desarrollo de enfermedades subsecuentes y prevenir la transmisión del virus así como evitar su entrada a la célula del huésped.⁸ También, pueden combinarse fármacos para tratar dos patologías diferentes de la enfermedad, lo que puede ser especialmente importante en el caso de la covid-19. Lamentablemente, la eficacia de la combinación de intervenciones para aumentar la eficacia antiviral no es predictiva y requiere pruebas.

Actualmente, no hay ninguna terapia combinada aprobada para el tratamiento de la covid-19. Como el virus sigue evolucionando y mutando para evadir y suprimir nuestros sistemas inmunitarios adquiridos e innatos, se recomienda explorar el uso de una terapia combinada para combatir la resistencia a los medicamentos. El virus covid-19 ya ha evolucionado para crear las variantes conocidas como delta u ómicron, siendo esta última resistente a todos los anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA, excepto el sotrovimab.⁹

Sin embargo, investigadores de Nueva Gales del Sur Australia han identificado serios problemas con el sotrovimab como tratamiento. En un estudio¹⁰ determinaron la secuencia del virus aislado de pacientes tratados con sotrovimab. De 100 pacientes iniciales 23 dieron positivo a la infección por el SARS-CoV-2, de ellos se recogieron muestras de virus y notaron que para cuatro de los pacientes habían encontrado 5 mutaciones para dos aminoácidos de la glucoproteína S que son las siguientes: E340K/A/V y P337L/T. Los análisis de las mutaciones en esta región de la espiga, el dominio de unión al receptor, indican que las mutaciones observadas disminuyen la neutralización del sotrovimab en casi 300 veces.

Los investigadores australianos señalan que, antes de la llegada de los ensayos clínicos con sotrovimab, las mutaciones en el aminoácido 340 que confieren resistencia eran extremadamente raras. Comentan que la incidencia de estas mutaciones en el aminoácido 340 está aumentando en las cepas del virus de todo el mundo, sin embargo no se sabe si esto es espontáneo por el gran aumento en el número de personas infectadas debido a ómicron, o es resultado de la presión selectiva ejercida por dicho fármaco.

Tenemos que seguir las estrategias utilizadas para el VIH y crear combinaciones de fármacos seguras y potentes que se dirijan a una amplia gama de blancos con un alto índice terapéutico. Todavía hay muchas dianas inexploradas para el desarrollo de fármacos contra el SARS-CoV-2.¹¹ Es importante ampliar la gama de objetivos blanco para el desarrollo de fármacos mucho más allá de la proteasa común a las muchas enzimas y proteínas reguladoras específicas del SARS-CoV-2.

2.2 Inhibidores de proteasa principal (M^{pro})

Reportes sobre el desarrollo de agentes antivirales contra miembros de la familia *Coronaviridae*, indican que las principales proteínas proteasas (M^{pro}) pueden considerarse como objetivos blancos para el desarrollo de nuevas moléculas. De acuerdo a lo anterior, estudios clínicos en individuos infectados a los que se les administró lopinavir y ritonavir inhibidores de la proteasa, mostraron mejoría.¹²

Se ha publicado una serie de alfa-cetoamidas que inhiben las principales proteasas de los coronavirus de diversos géneros.¹³ Así mismo, en la FES Cuautitlán, se han sintetizado una serie compuestos análogos del éster fenetílico de ácido cafeico (CAPE) denominada la serie LQM 700. Estos compuestos poseen actividad inhibitoria comprobada sobre diferentes líneas celulares como : HeLa y MDA-MB-231.¹⁴ Las estructuras de la serie LQM 700 antes mencionadas tienen similitud con la serie de inhibidores de proteasa¹⁵ como lo muestra en la Figura 1

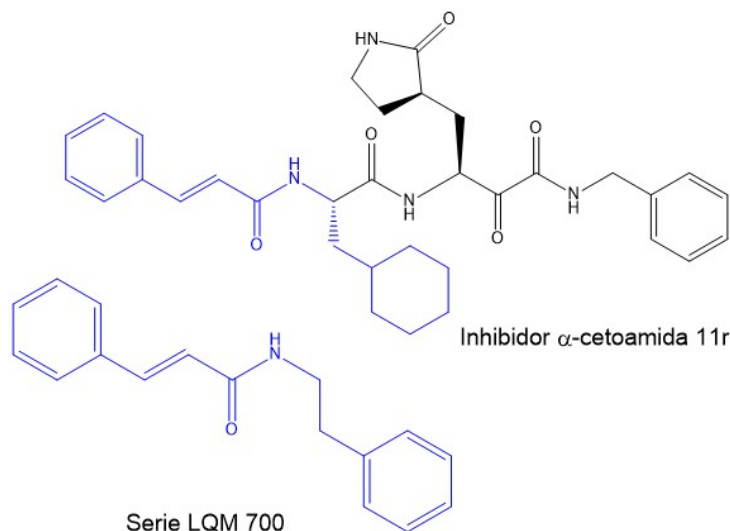


Figura 1: Comparación de las estructuras de los inhibidores α -cetoamidas¹⁵ y los compuestos de la serie LQM 700

2.3 Inhibidores de Glucoproteína S (Spike)

La proteína espiga del SARS-CoV-2 es una glucoproteína homotrimérica en donde cada unidad (180 kDa, 1273 aminoácidos) está formada por dos fragmentos principales: S1, que comprende los aminoácidos (AA) 14 a 685, y que representa la región más variable. Así como el segmento S2 (AA 686-1273), en el cual se conservada la estructura y la secuencia.¹⁶

El fragmento S1 consiste en un dominio N-terminal (NTD; AA 14-305), un dominio de unión al receptor (RBD; AA 319-541), y un motivo de unión al receptor (RBM; AA 437-508). En cuanto a la fragmento S2, contiene un péptido de fusión (FP; AA 788-806), dos dominios de repetición heptada de aminoácidos (HR1; AA 912-984 y HR2; AA 1163-1213), un dominio transmembrana (TM; AA 1214-1237), y un dominio citoplasmático (CP; AA 1238-1273).¹⁷

Para entrar en las células del huesped, los viriones del SARS-CoV-2 se unen al dominio peptidasa (PD) de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) a través del dominio de unión al receptor (RBD) de su segmento S1, y esto es seguido por una escisión de los segmentos S1/S2, que puede ser realizada por proteasas como la proteasa transmembrana de serina 2 (TMPRSS2). Este último proceso desencadena un corte adicional del fragmento S2, lo que le permite exponer el péptido de fusión y con cambios conformacionales, el virus puede fusionarse

con la membrana de la célula huésped.^{18 19}

Al día de hoy existen varios reportes en donde se resolvió estructuralmente la interacción de una fracción del segmento S1 del Spike viral del SARS CoV-2 con la enzima convertidora de angiotensina 2 humana. En estos estudios se han identificado las regiones específicas de interacción y la repercusión de las mutaciones correspondientes en esa misma interacción.²⁰

2.4 Modelado molecular de sistemas biológicos

La química computacional fue impulsada en los años setenta por las principales compañías farmacéuticas del mundo interesadas en el diseño de moléculas con actividad farmacológica.²¹ La química computacional engloba aquellas técnicas computacionales que son utilizadas para comprender la estructura y las propiedades de moléculas y materiales; involucra el uso de algoritmos matemáticos, estadística, creación de modelos, simulación computacional y manejo de largas bases de datos.

Con los avances tecnológicos en cómputo, como dispositivos más rápidos y más baratos; así como en el desarrollo de modelos y métodos numéricos más eficientes para describir sistemas químicos, la química computacional se ha vuelto una herramienta complementaria a las técnicas experimentales tradicionales.²¹

En el estudio de sistemas químicos el éxito recae en la calidad del modelo utilizado, desde un enfoque computacional es necesario un modelo matemático eficaz para calcular la energía del sistema como función de su estructura.

La mecánica molecular utiliza modelos en los cuales los átomos son las partículas más pequeñas del sistema en lugar de considerar electrones y núcleos como lo hace la química cuántica. Esto permite realizar el cálculo de energía de sistemas bioquímicos y su ambiente con el uso de modelos matemáticos y su apropiada optimización de parámetros para lograr la exactitud química deseada.²²

El uso de funciones empíricas para calcular la energía de sistemas bioquímicos logra cumplir con las demandas requeridas. Las ecuaciones matemáticas reproducen las interacciones físicas y electrostáticas que dictan la estructura y propiedades de las moléculas. En la figura 2 se muestra la representación gráfica de las relaciones entre átomos que se consideran: distancia de enlace "b", ángulos de enlace " θ ", ángulos diedros " χ " e interacciones a larga distancia entre dos pares de átomos " r_{ij} ".

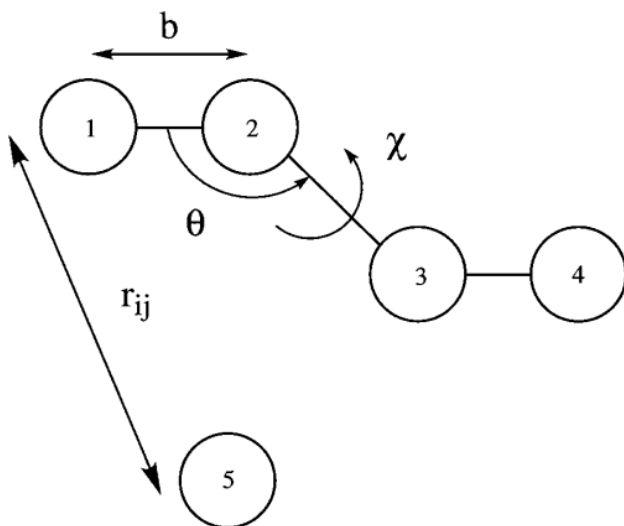


Figura 2: Representación esquemática de los componentes de la función potencial empleada en la Mecánica Molecular

La función potencial es el conjunto de ecuaciones que permiten calcular la energía potencial "U" de un sistema químico como función de su estructura tridimensional "R". La energía total puede separarse en los términos intramoleculares e intermoleculares.

$$U_{R\ total} = U_{R\ intra} + U_{R\ inter}$$

Las funciones matemáticas para definir las interacciones intramoleculares involucran tres términos correspondientes a las variaciones de enlace, ángulos de tres enlaces y ángulos diedros.

$$U_{R\ intra} = \sum_{\text{enlace}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{ángulo}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} K_\chi[1 + \cos(n\chi - \sigma)]$$

Donde: los términos "b", " θ " y " χ " se obtienen de la estructura tridimensional del sistema, las constantes K_b , K_θ y K_χ representan las constantes de fuerza asociadas, las cuales se determinan experimentalmente o con el empleo de cálculos más precisos de química cuántica. Los parámetros de " b_0 ", " θ_0 " y " χ_0 " corresponden a los valores de equilibrio en Ångströms para cada uno de los términos.

En cuanto al componente de la función potencial que busca reproducir las interacciones a larga distancia, se involucran dos términos correspondientes a las interacciones de tipo van der Waals y de tipo electrostático.

$$U_{R\ inter} = \sum_{\text{pares de átomos}} \left(\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}} \right)$$

Donde: ϵ_{ij} es la profundidad del "pozo de potencial" para la interacción entre un par átomos y $R_{min,ij}$ el radio mínimo de interacción y q_i es la carga atómica.

2.5 Estudio de Energía Libre de Unión

Se realizaron una serie de simulación para los sistemas ACE 2 – LQM 300 para evaluar la energía libre de enlace por el método de transformaciones alquímicas (FEP, Free energy Perturbation). El método FEP se implementó utilizando la herramienta BFEE2.²³

Este software denominado BFEE2 permite generar los sistemas necesarios para determinar la energía libre de unión dado un complejo proteína - ligando. Para un ciclo termodinámico simple. Ejemplo Proteína-Ligando Se deberían generar los sistemas:

1. Complejo Proteína-Ligando solvatado.
2. Ligando solvatado.
3. Proteína solvatada.

En los enfoques alquímicos para determinar la energía libre de unión se requiere una simulación del complejo proteína-ligando en su estado "desacoplado" como se muestra en el estado B de la figura 3 para ello se definen ciertos potenciales de restricción de acuerdo a las variables colectivas.²³

En un primer paso se calcula la energía de libre "desacoplamiento" del ligando respecto al disolvente. Después, se determina la energía libre de acoplamiento del ligando con la proteína en su estado desacoplado, para producir estos sistemas se realiza una superposición. Finalmente el ligando se acopla al sistema y se eliminan las restricciones para obtener la energía libre del complejo en su estado desacoplado a acoplado.

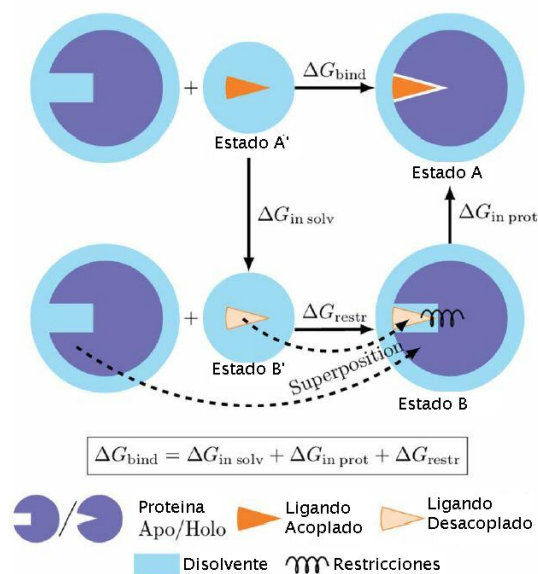


Figura 3: Diagrama del ciclo termodinámico para los cálculos de energía libre de unión $\Delta G_{\text{unión}}$ Tomado de Khalak 2021

Con este enfoque se toman en cuenta las contribuciones de interacción a larga distancia (electrostáticas, vdW, de solvatación), y también las contribuciones entrópicas como es el cambio de conformación del ligando para la determinación de la energía libre de unión (BFE)

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo General

Generar modelos moleculares para dos objetivos blanco del SARS-CoV-2: proteína espiga (spike) y proteasa principal (M^{pro}) para evaluar dos series de compuestos LQM 300 y LQM 700 respectivamente, mediante el uso de herramientas de la química computacional para identificar posibles inhibidores de las proteínas antes mencionadas y contribuir al desarrollo de una terapia combinada.

3.2 Objetivos Particulares

- Realizar simulaciones de dinámica molecular de la proteasa principal M^{pro} y llevar a cabo un análisis de dinámica esencial (EDA) con la finalidad de obtener estructuras tridimensionales representativas de la proteína en diferentes conformaciones.
- Generar sistemas proteína-ligando empleando como receptor el modelo M^{pro} y como ligandos los compuestos de la serie LQM 700 utilizando técnicas de acoplamiento molecular para proponer un modo de unión para cada molécula de la serie.
- Elaborar y validar modelos tridimensionales para los sistemas ECA2-LQM300, spike-ECA2 y spike-ECA2-LQM300, utilizando técnicas de modelado molecular y acoplamiento molecular (proteína-ligando y proteína-proteína) para definir modos de unión.
- Realizar simulaciones de dinámica molecular de los sistemas ECA2-LQM300, spike-ECA2 y spike-ECA2-LQM300 y evaluar su estabilidad con los parametros de desviación y fluctuación RMSD y RMSF para cada una simulación.
- Evaluar la energía libre de enlazamiento para los complejos ECA2 -LQM300 mediante estudios de dinámica molecular aplicando un modelo alquímico de acoplamiento para identificar el compuesto de mayor afinidad al receptor.

Capítulo 4

Metodología

4.1 Dinámica molecular de M^{pro} y estudio EDA

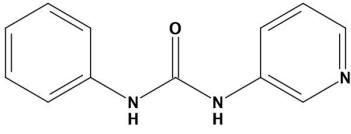
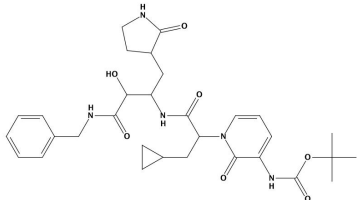
Para el estudio de inhibición la proteína principal del SARS-CoV-2 el primer paso en fue realizar 3 simulaciones de dinámica molecular y de ellas obtener estructuras promedio que representen la variabilidad conformacional de dicha M^{pro} .

Para generar los sistemas se partió de modelos tridimensionales archivados en la base de datos PDB²⁴ los códigos de identificación fueron los siguientes:

- 6M03 Corresponde a la forma APO de la proteína. Sin ligando.
- 5R83 Complejo no covalente con el ligando K0G. Forma HOLO.
- 6Y2F Complejo covalente con ligando O6K (α -cetoamida). Forma HOLO.

En la tabla 1 se muestran las estructuras de los ligandos para los sistemas con forma HOLO de M^{pro} .

Tabla 1: Estructuras de los ligandos en los sistemas 5R83 y 6Y2F

PDB 5R83 (K0G) N-fenil-N'-piridin-3-ilurea	PDB 6Y2F (O6K) α -cetoamida
	

Se realizó una limpieza y preparación de los modelos para la simulación de dinámica molecular utilizando el software MOE 2020.01.²⁵ Se eliminaron las cadenas que no correspondían a la proteína y al ligando (iones, disolvente: agua, DMSO, etc.). Se completaron cadenas para los aminoácidos faltantes en la estructura tridimensional. Después se solvató el sistema en una caja cúbica de agua a condiciones periódicas (P1, 95 Å por lado) se agregaron contraiones de

Na^+ y Cl^- . Una vez solvatado se realizó una minimización estructural de todo el sistema. En la figura 4 se observa el sistema solvatado.

Se generaron los archivos de entrada para ejecutar las simulaciones de dinámica molecular en el software NAMD 2.13²⁶ utilizando el campo de fuerza de Amber se realizó el protocolo mostrado en la tabla 2

Tabla 2: Protocolo para dinámica molecular

Etapa	Tiempo	Condiciones
Calentamiento	1 ns	Gradiente de temperatura de 0K a 300K
Equilibrio	4 ns	300 K y 101 kPa
Producción	100 ns	300 K y 101 kPa

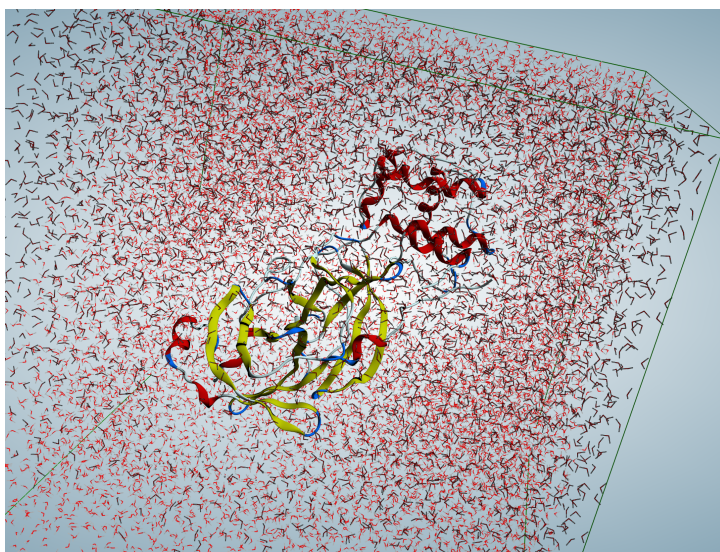


Figura 4: Sistema M^{pro} en caja de solvatación a condiciones periódicas para dinámica molecular.

Se evaluó la estabilidad estructural 3D calculando el parámetro de raíz desviación cuadrática media (RMSD) de trayectoria graficando los resultados en función del tiempo de simulación. Se analizaron los resultados de dinámica molecular implementando el análisis de dinámica esencial²⁷ (Essential Dynamics Analysis) con el objetivo de identificar una parte o segmento de la dinámica, que se utilizará para generar una estructura promedio. Para ello se empleó el módulo ProDy²⁸ desarrollado en el lenguaje Python.²⁹ El cálculo de la estructura promedio se realizó usando un algoritmo (script) *in house* en el software VMD 1.9.3³⁰

4.2 Acoplamiento molecular de serie LQM 700 con M^{pro}

Tomando las tres estructuras promedio de la M^{pro} se realizó un cribado virtual con las 51 moléculas que forman la serie LQM 700 que se muestran en la tabla 3 utilizando Autodock

VINA³¹ como motor de acoplamiento molecular. Se definió una caja de búsqueda alrededor del sitio activo, con centro en el átomo de azufre del residuo Cys 145. El tamaño de la caja de búsqueda fue de 30 Å por lado, se delimitaron las poses a un rango de energía de 1 $\frac{kcal}{mol}$ y se analizaron los clusters.

Tabla 3: Estructuras de la serie LQM 700

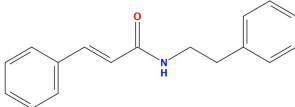
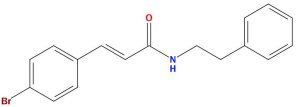
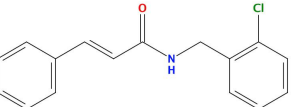
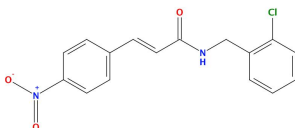
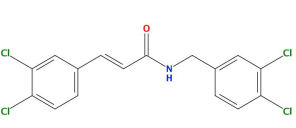
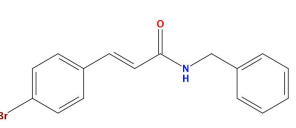
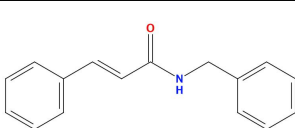
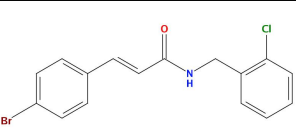
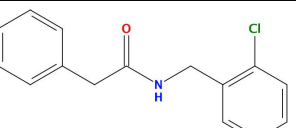
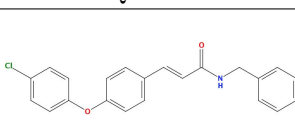
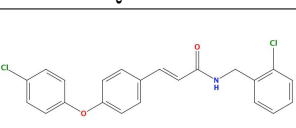
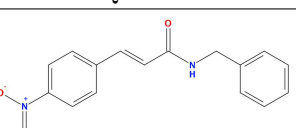
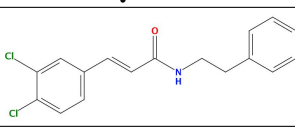
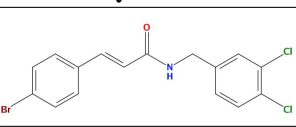
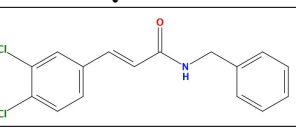
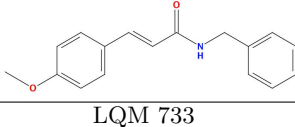
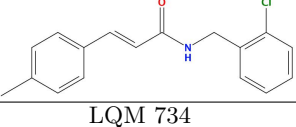
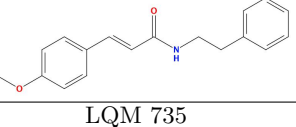
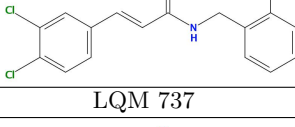
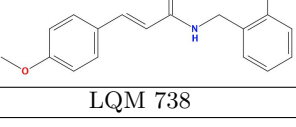
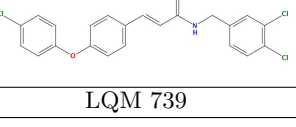
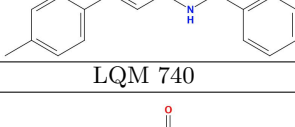
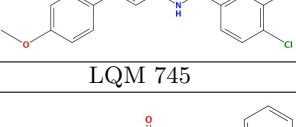
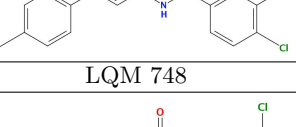
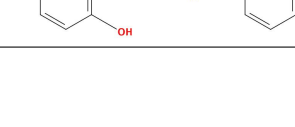
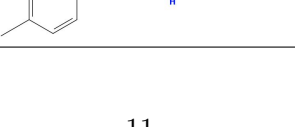
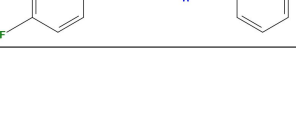
LQM 701	LQM 702	LQM 706
		
LQM 707	LQM 708	LQM 709
		
LQM 715	LQM 716	LQM 717
		
LQM 720	LQM 721	LQM 721
		
LQM 723	LQM 725	LQM 726
		
LQM 728	LQM 731	LQM 732
		
LQM 733	LQM 734	LQM 735
		
LQM 737	LQM 738	LQM 739
		
LQM 740	LQM 745	LQM 748
		

Tabla 3 (Continuación): Estructuras de la serie LQM 700

LQM 749	LQM 752	LQM 753
LQM 754	LQM 755	LQM 761
LQM 762	LQM 763	LQM 764
LQM 765	LQM 766	LQM 767
LQM 768	LQM 769	LQM 770
LQM 771	LQM 772	LQM 773
LQM 774	LQM 775	LQM 776
LQM 777	LQM 778	LQM 779

4.3 Preparación de sistemas Spike y ECA2

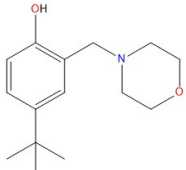
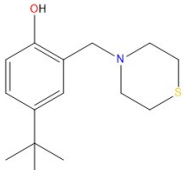
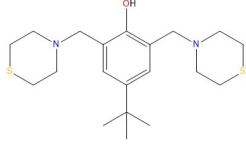
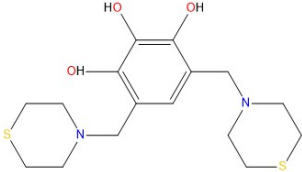
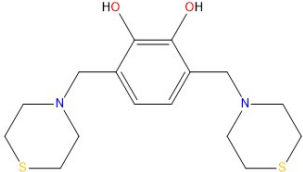
Para poder estudiar el efecto que tienen los compuestos LQM 300 en la infección por el virus SARS-CoV-2 se propone estudiar el mecanismo que involucra al receptor del humano ECA2, la

enzima convertidora de angiotensina ya que esta ha sido indentificada como el receptor celular que utiliza el virus para entrar a la celula del huesped.³² Los sistemas se generaron utilizando solamente la región de la glucoproteína spike que tiene reconocimiento molecular con la ECA2 la cual se denomina domino de unión al receptor (RBD).³³ esta también se le identifica como subunidad S1.

Para la preparación del complejo ECA2-S1 se empleó como punto de partida el modelo con código PDB: 7KMB, que contiene la interacción del dominio RBD, subunidad S1 de SARS-CoV-2 con la ECA2 de humano. Sin embargo este modelo no contiene al cofactor de zinc Zn^{+} de la ECA2. Por lo que se recurrió al modelo con código PDB: 3SCL para modelar principalmente al cofactor Zn^{+} . Empleando el software MOE 2020.01, se realizó una superposición de la estructura de ECA2 en ambos modelos. Se eliminó el modelo de 3SCL conservando el ion Zn^{+} . Se terminó de preparar el sistema de modo análogo el de la dinámica molecular de M^{pro} : se eliminaron las cadenas que no correspondían a las proteínas y al cofactor, se completaron cadenas para los aminoácidos faltantes en la estructura tridimensional.

Se prepararon 6 sistemas con el modelo de interacción ECA2 - S1, uno de ellos sin ligante y a los otros 5 se les agregó una estructura de la serie de compuestos LQM 300 (Tabla 4). Se eligieron solo 5 moléculas ya que en estudios previos^{34,35} se habían identificado como inhibidores de la ECA1.

Tabla 4: Compuestos de la serie LQM 300 utilizados en este estudio.

LQM 304	LQM 318	LQM319
		
LQM 322		LQM 324
		

4.4 Dinámica molecular de complejos ECA2-LQM300 y cálculo de energía libre con BFEE2

Desde que se identificó a la ECA2 como receptor de reconocimiento para el mecanismo de entrada el SARS-CoV-2³⁶ se ha estudiado la interacción de esta enzima con la glucoproteína spike³⁷ incluso se han propuesto un reposicionamiento de inhibidores ya conocidos de la ECA2 como tratamiento para el covid-19.^{38,39} Para que un fármaco se considere posible candidato contra el SARS-CoV-2 tiene que debilitar esta interacción spike-ECA2, así impidiendo la entrada del virus a las células del huésped.

Bloquear la entrada del virus mediante la inhibición de la ECA2 es más conveniente que inhibir las etapas posteriores del ciclo de vida del SARS-CoV-2. En esta etapa del estudio identificamos las moléculas LQM 300 como inhibidores de ECA2. Para ello es necesario determinar la energía libre de interacción de los complejos ECA2-LQM300.

Para evaluar la energía libre de unión se empleó el software llamado BFEE2²³. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular con los 5 sistemas ECA2-LQM300 utilizando NAMD 2.13. La preparación de los archivos y el tratamiento post-simulación se realizó con la herramienta BFEE2.

Los sistemas se prepararon (formación del complejo y solvatación) utilizando el lenguaje script *tcl* de VMD 1.9.3.³⁰ Se empleó el servidor CHARMM-GUI⁴⁰ para generar los archivos topológicos necesarios del ligando y de la proteína.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1 Sistema M^{pro}

5.1.1 Preparación de M^{pro}

El análisis estructural de enzimas en complejo con algún ligando, ya sea agonista o antagonista, es de gran relevancia para conocer la respuesta biológica que puede provocar dicha interacción en un organismo. La función de las proteínas está estrechamente relacionada a su estructura tridimensional y es sabido, que las proteínas no se comportan como estructuras estáticas ya que pueden optar distintos estados conformacionales. Un ejemplo de ello es el llamado modelo de los dos estados⁴¹ en donde se asume que solo ciertas conformaciones de un receptor pueden provocar una respuesta biológica efectiva y a menudo esta conformación (activa) se ve inducida por el ligando. Es por ello que estudiar un receptor como un ensamble de conformaciones nos da una mejor perspectiva del reconocimiento que esta ocurriendo con un ligando.

En el estudio del blanco biológico M^{pro} los primeros resultados obtenidos son trayectorias de las simulaciones de dinámica molecular de los 3 sistemas preparados APO (6M03) HOLO (5R83 y 6Y2F).

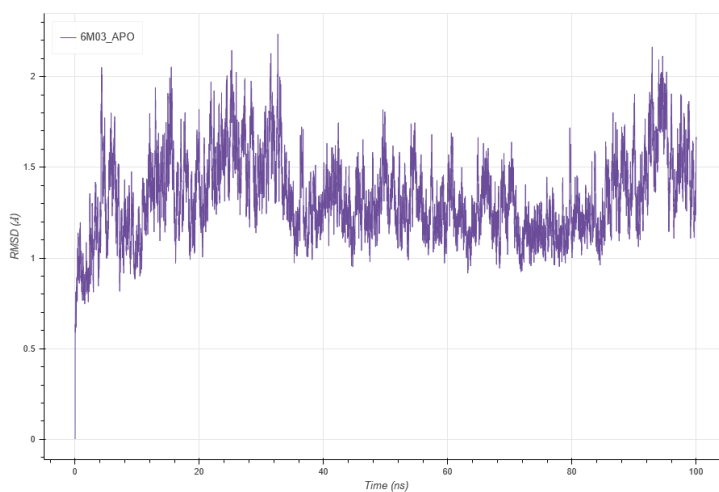


Figura 5: RMSD de la trayectoria de M^{pro} APO (6M03)

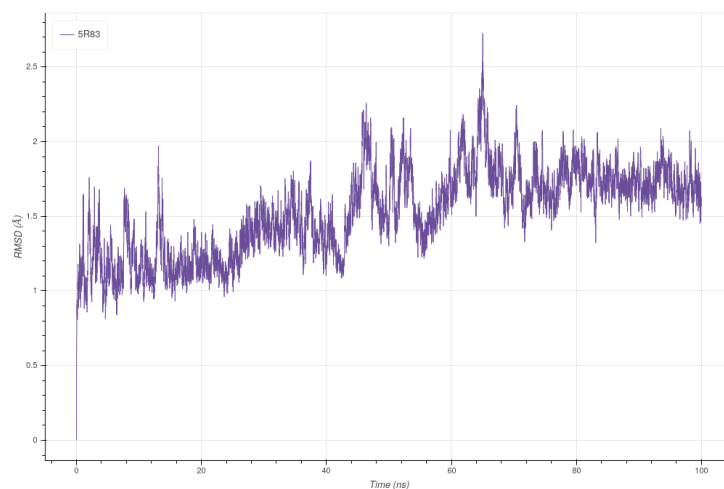


Figura 6: RMSD de la trayectoria de M^{pro} HOLO (5R83)

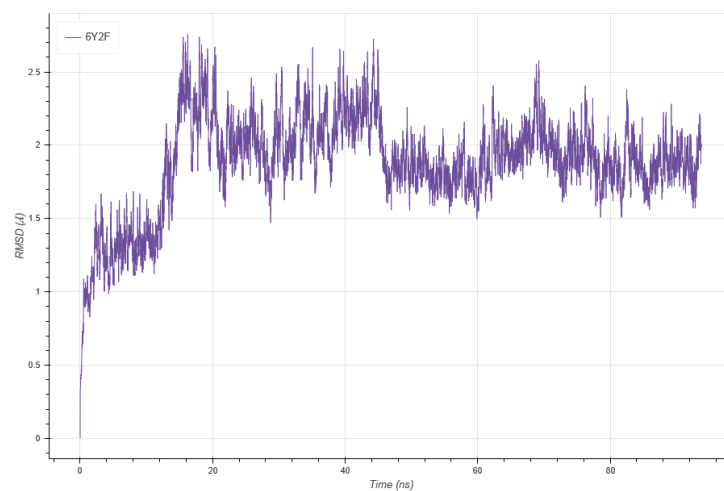


Figura 7: RMSD de la trayectoria de M^{pro} HOLO (6Y2F)

Una vez conociendo que las trayectorias de dinámica molecular fueron estables a lo largo del tiempo de simulación, se procedió a realizar el análisis de dinámica esencial. Este es un análisis de componentes principales utilizando como entrada las coordenadas cartesianas de la trayectoria ponderadas por la masa atómica. Para llevar a cabo este análisis es necesario hacer un ajuste el cual consiste en eliminar los movimientos de traslación y rotación para analizar solamente el movimiento interno del sistema.⁴²

Para analizar una dinámica molecular se utilizan coordenadas internas como, contactos entre átomos, distancias de enlace y ángulos. Se gráfica la trayectoria de acuerdo a estas coordenadas como se observa en la figura 8.

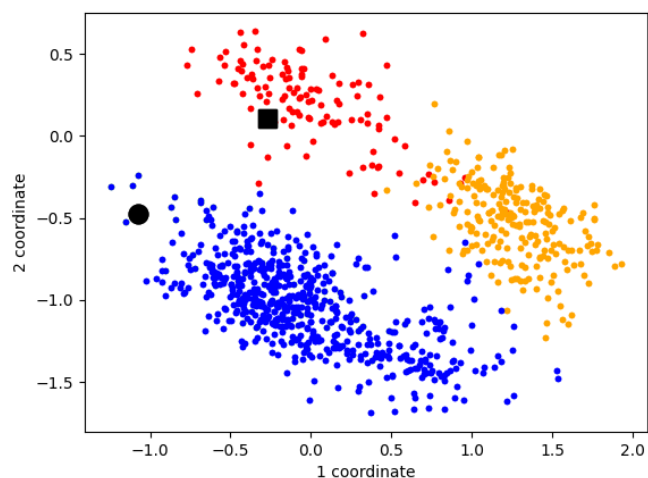


Figura 8: Resultado para dos coordenadas en el análisis de la dinámica esencial para la simulación del sistema M^{pro}

El recuadro negro es la dinámica molecular corresponde al inicio de la trayectoria ($t=0$ ns) y el círculo negro corresponde al punto final de la simulación ($t = 100$ ns). Se iluminan tres colores de acuerdo a la agrupación en racimos (clustering). Los datos en color rojo corresponden a los primeros 15 ns de la trayectoria. Los puntos de color naranja corresponden al intervalo de tiempo de 15 ns a 50 ns. Por último, el racimo de color azul corresponde a la simulación de 50 ns hasta 100 ns en que termina la simulación.

Para el caso del sistema HOLO (6Y2F) que contiene un ligando de α - *cetoamida* se logró identificar 3 diferentes racimos correspondientes a 3 distintas conformaciones que puede adoptar la proteína durante la simulación. Se seleccionó la correspondiente al color azul para calcular una estructura representativa de este sistema.

El orden en que se asignan número a las coordenadas es de acuerdo a su relevancia en el análisis siendo la coordenada 1 aquella que nos da más información sobre nuestro conjunto de datos. Si agregamos una tercera variable (coordenada) a la gráfica observamos una mejor separación de los datos en la trayectoria. Como se ve en la figura 9.

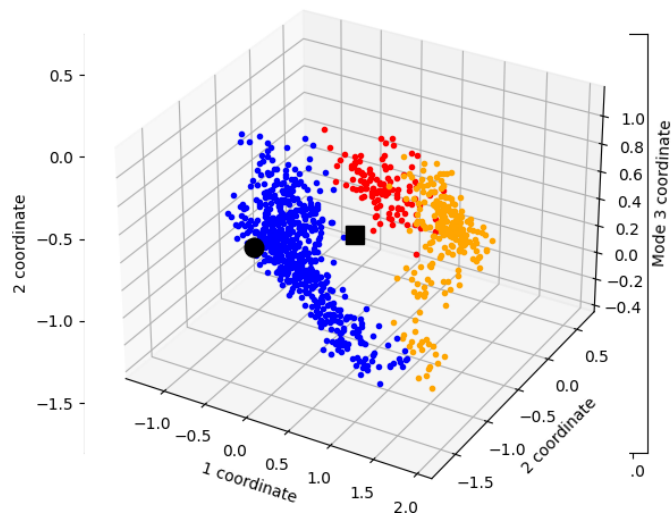


Figura 9: Resultado para tres coordenadas en el análisis de la dinámica esencial para la simulación del sistema M^{pro}

En la figura 10 se observa las gráficas para los tres componentes principales de la dinámica esencial, para las simulaciones de los sistemas 6M03 y 5R83.

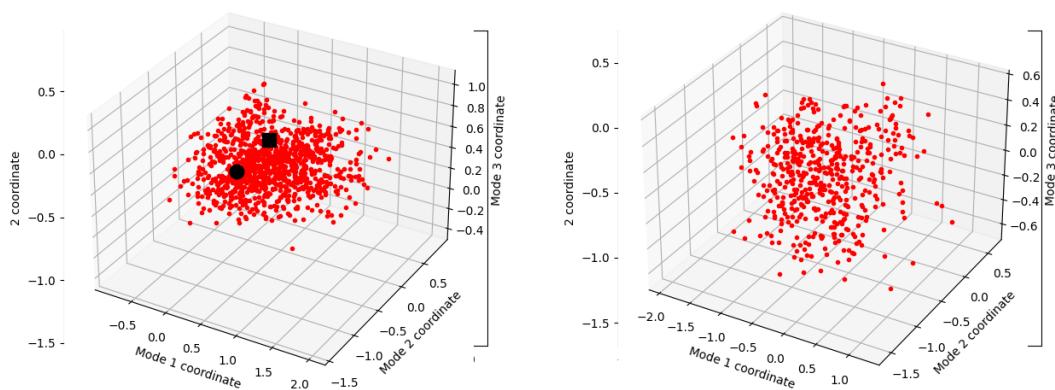


Figura 10: Resultado para 3 coordenadas en el análisis de la dinámica esencial para la simulación de los sistemas M^{pro} APO (6M03) y HOLO (5R83)

Para los sistemas APO (6M03) y HOLO (5R83), toda la trayectoria de la etapa de producción (100 ns) se agrupó en un único racimo. El cual se tomó para calcular una estructura representativa de la M^{pro} .

Las conformaciones generadas se someten a una optimización energética para su uso posterior en acoplamiento molecular.

5.1.2 Cribado virtual M^{pro} - LQM700

Para estudiar el modo de unión de los 51 compuestos de la serie LQM 700 en complejo con el ensamble de conformaciones de M^{pro} se realizó un cribado virtual utilizando el motor de acoplamiento molecular Autodock VINA.³¹ La caja de búsqueda se delimitó alrededor de los residuos que conforman el sitio activo de la M^{pro} ⁴³ se muestran los residuos en la figura 11 y se enlistan los mismos en la tabla 5.

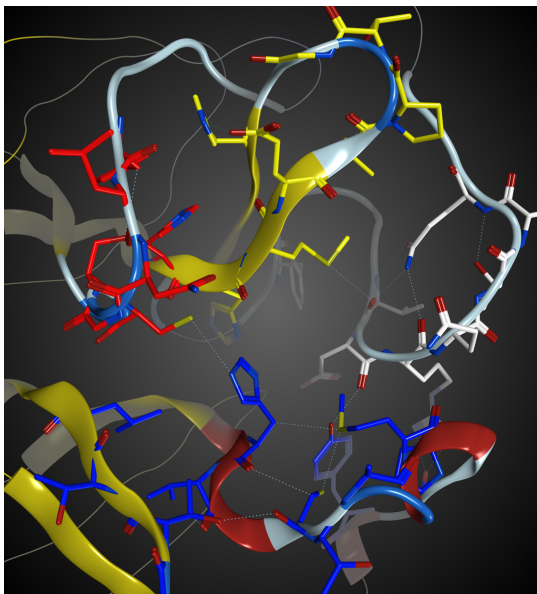


Figura 11: Representación en tubos para los aminoácidos del sitio catalítico M^{pro} .

Tabla 5: Residuos involucrados en el sitio activo de M^{pro} .

Loop	Residuos
Azul	(Thr 24 - Leu 27), (His 41 - Val 42), (Cys 44 - Ser 46), Met 49, Pro 52, Tyr 54
Rojo	(Phe 140 - Cys 145), His 163
Amarillo	(His 164 - Gly 170), His 172
Blanco	Phe 181, (Phe 185 - Ala 194)

Los resultados de acoplamiento molecular se presentan como una lista ordenada de acuerdo a la energía de unión estimada para cada pose encontrada. Para este trabajo se seleccionaron aquellas poses con una energía de unión no mayor a una unidad (kcal/mol) de la pose con mejor puntaje, que tuvieran similitud en orientación y que cayeran dentro del sitio activo.

Se aplicó el mismo protocolo de acoplamiento para 5 ligandos que ya se encontraban cocrystalizados a una estructura de M^{pro} y archivadas en la base de datos de RCSB PDB. A manera de validación del protocolo de acoplamiento se verificó que se reprodujera el modo de unión de dichos ligandos en complejo con M^{pro} .

En la figura 12 se visualizan los modos de unión para el ligando del archivo PDB: 5R83 y para el compuesto LQM 778 en una de las conformaciones de M^{pro} .

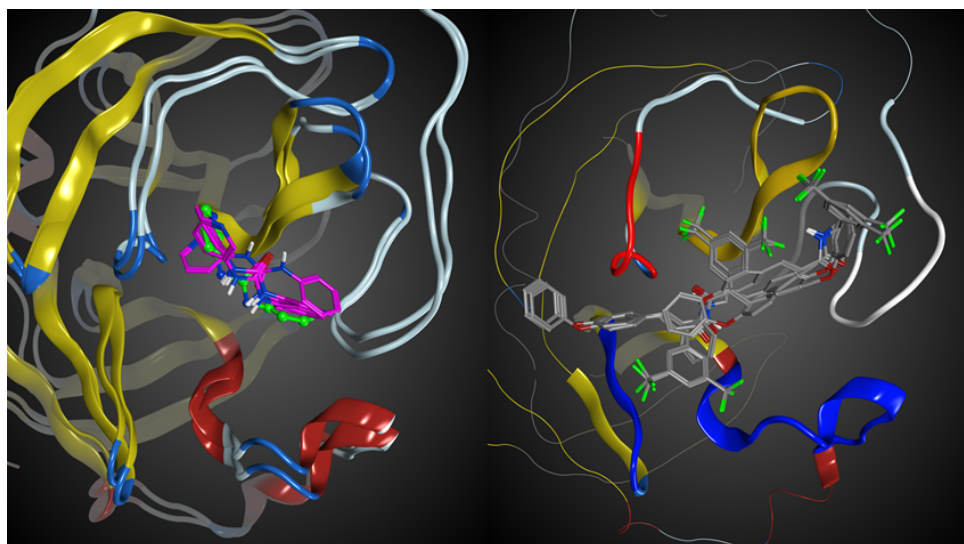


Figura 12: Racimo de modos de unión para el ligando 5R83 (lado izquierdo): modo de unión proveniente de cristalografía en verde y poses obtenidas por el protocolo de acoplamiento molecular en rosa. Racimo para el ligando LQM 778 (lado derecho): poses encontradas en el acoplamiento.

En la Tabla 6 se muestran solo los resultados de los 5 compuestos LQM 700 con mejor energía de acoplamiento definida en los clústers.

Tabla 6: Resultados de energía libre de unión en el acoplamiento molecular de los ligandos de la serie LQM 700 y los otros ligandos previamente reportados.

Ligando	M^{pro} APO (6M03) $\Delta G_{unión} / (\text{kcal/mol})$	M^{pro} HOLO (5R83) $\Delta G_{unión} / (\text{kcal/mol})$	M^{pro} HOLO (6Y2F) $\Delta G_{unión} / (\text{kcal/mol})$
LQM 778	-6.83 ± 0.30	-7.08 ± 0.33	-6.20 ± 0.21
LQM 753	-		-5.88 ± 0.29
LQM 769	-6.75 ± 0.32	-6.79 ± 0.27	-5.76 ± 0.29
LQM 776	-6.58 ± 0.30	-	
LQM 735	-6.48 ± 0.28	-6.57 ± 0.26	
LQM 752	-		-5.68 ± 0.39
LQM 754	-6.47 ± 0.28	-	-5.67 ± 0.34
LQM 775	-	-6.45 ± 0.32	
LQM 720	-	-6.29 ± 0.28	
PDB 5R81	-5.47 ± 0.31	-5.41 ± 0.34	-4.05 ± 0.25
PDB 5R83	-5.16 ± 0.37	-5.26 ± 0.28	-4.19 ± 0.27
PDB 5R84	-5.12 ± 0.29	-5.23 ± 0.33	-4.61 ± 0.27
PDB 5R80	-4.97 ± 0.29	-4.70 ± 0.34	-3.68 ± 0.24
PDB 5R82	-4.23 ± 0.24	-4.13 ± 0.29	-3.52 ± 0.24

5.2 Sistema Spike-ECA2

5.2.1 Dinámica molecular sistema S1 - ECA2

Para los estudios de dinámica molecular se realizaron simulaciones relativamente cortas (40 ns) lo cual fue suficiente para alcanzar una estabilidad estructural de acuerdo al valor de desviación cuadrática media que se puede observar en la figura 13. El sistema sin ligando alcanzó un RMSD promedio de 2 Å.

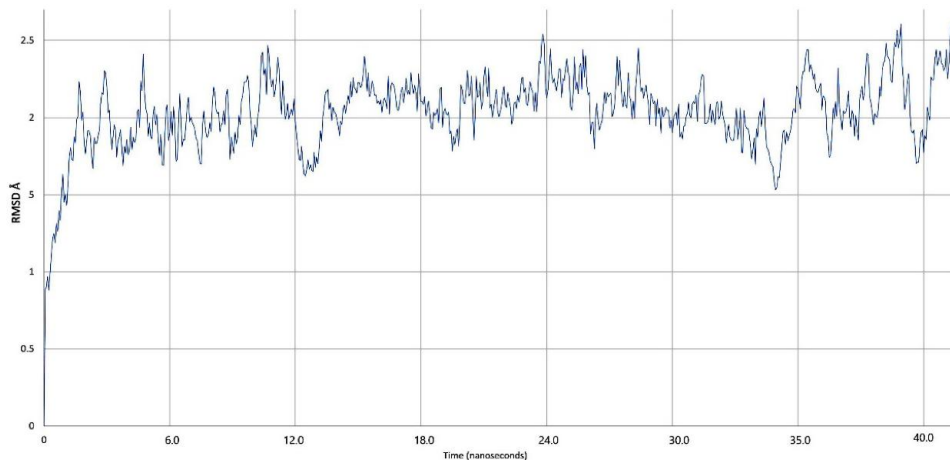


Figura 13: RMSD para el sistema S1-ECA2 sin ligando

Para el caso de los sistemas con las moléculas LQM 300 en el sitio activo de la ECA2, el gráfico de RMSD (figura 14) no mostró una desviación mayor que el sistema sin ligando. Teniendo valores máximos de 2.5Å para el complejo con LQM 324. El sistema S1-ECA2-LQM322 fue el sistema que alcanzó una estabilidad espacial más rápido y a valores más pequeños, en promedio RMSD 1.5Å.

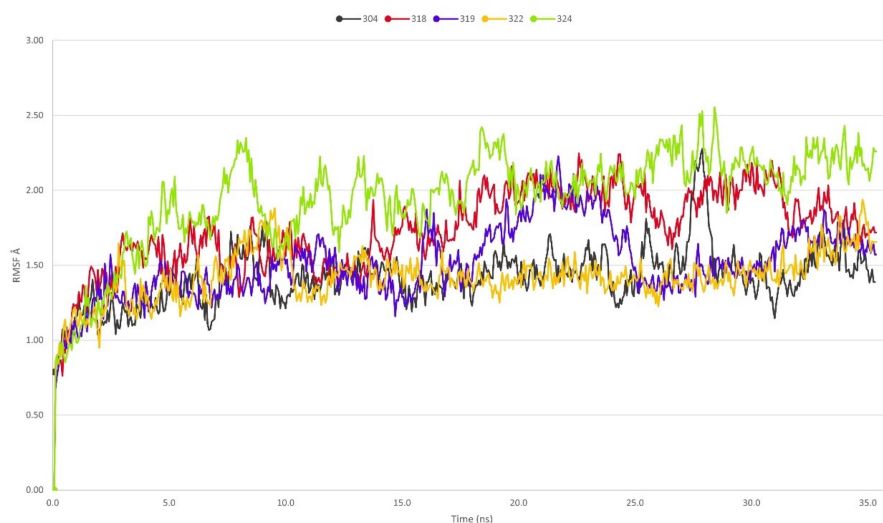


Figura 14: RMSD para los sistemas S1-ECA2-LQM300. Cada color representa un sistema según los siguientes colores: LQM304: negro, LQM318: rojo, LQM319: morado, LQM322: amarillo y LQM324 verde.

Se calculó el parámetro de fluctuación cuadrática media (RMSF) que se observa en la figura 15, estos valores corresponden a la desviación cuadrática media de cada carbono alfa de la estructura de ECA2, respecto de su valor promedio, a lo largo de la trayectoria y miden por lo tanto, la magnitud de las fluctuaciones relativas de los átomos en la trayectoria. Es decir, aquellos aminoácidos con valores altos de RMSF poseen mayor flexibilidad durante el tiempo de simulación. Los valores en la figura 15 no presentan fluctuaciones importantes que sugirieran que los sistemas se desestabilizaban o que pierdan su integridad estructural.

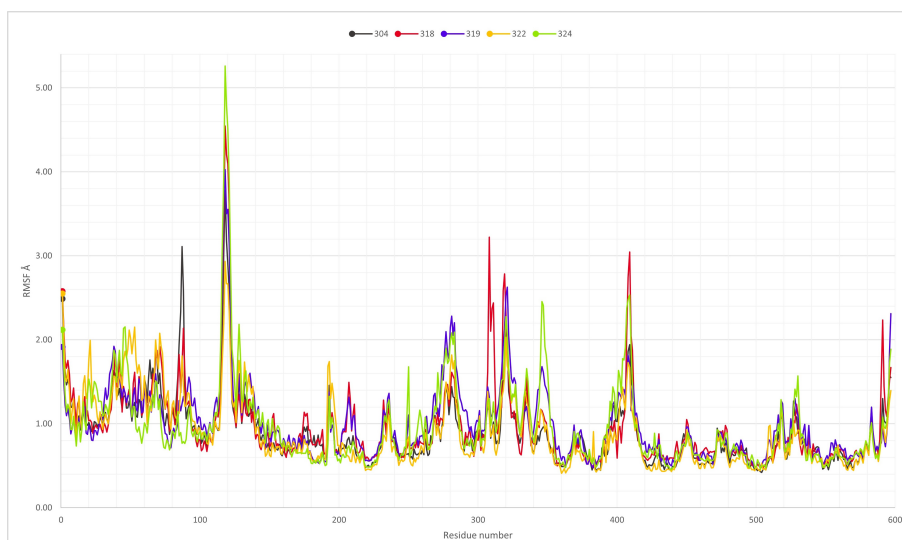


Figura 15: RMSF para los sistema S1-ECA2-LQM300. Cada color representa un sistema según los siguientes colores: LQM304: negro, LQM318: rojo, LQM319: morado, LQM322: amarillo y LQM324 verde.

Otra forma de verificar la estabilidad de la proteína durante la dinámica es el conteo de puentes de hidrógeno intra-estructurales. Es decir, si los puentes de hidrógeno disminuyen puede indicar una des-naturalización estructural de la macro-molécula durante la dinámica y esto se puede deber a diversos factores.

De acuerdo con este parámetro en los casos de estudio se identificaron los puentes de hidrógeno y no se encontró que existiera una des-estabilización de la proteína.

Se presenta en la figura 16 de enlaces de hidrógeno intra-estructurales para ECA2 en el sistema S1-ECA2-LQM322.

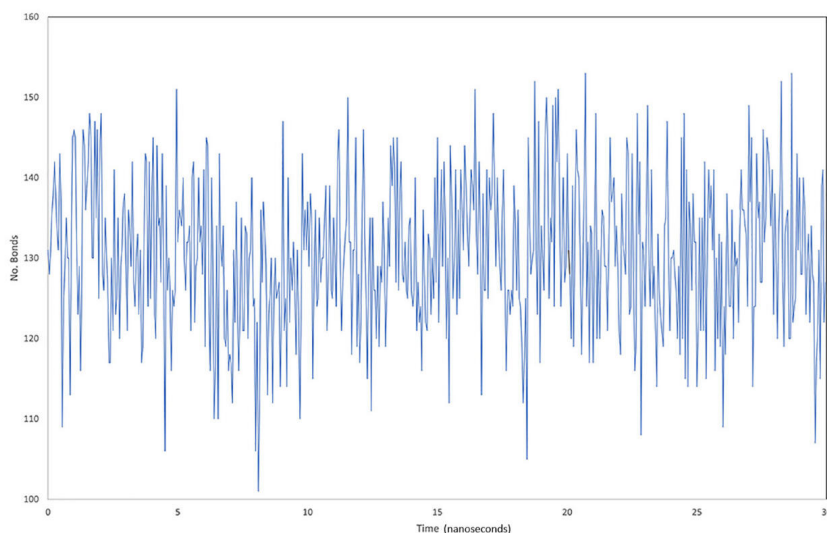


Figura 16: Enlaces de hidrógeno intraestructurales para la proteína ECA2

5.2.2 Energía libre de unión para complejo ECA2-LQM300

En el desarrollo de fármacos un parámetro de gran importancia es la afinidad de un fármaco por alguna diana biológica de interés. La afinidad se puede explicar como la fuerza medida con la cual se forma un complejo biomolecular. La afinidad está relacionada a la energía libre de enlazamiento lo cual indica que tan favorable es la interacción. Para este estudio una interacción favorable entre ECA2 y LQM300 nos indica una posible atenuación o inhibición del mecanismo de entrada del virus a la célula del hospedero.

Fue necesario realizar estudios complementarios que nos permitan tener una interpretación adecuada de la interacción enzima-ligando (ECA2-LQM300). En el caso del presente trabajo, se utilizó BFEE2 para estimar la energía libre.²³ El Binding Free Energy Estimator (BFEE2) es un software codificado en Python que automatiza los cálculos de energía libre de unión absoluta a través de la vía alquímica o geométrica utilizando simulaciones de dinámica molecular.

Se obtuvieron los valores de energía libre como se muestra en la tabla 7

Tabla 7: Resultados para energía libre de enlace, calculados con BFEE2 para los sistemas ECA2-LQM300 estudiados.

Sistema ECA2-LQM	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)
319	-5.71 ± 0.41
322	-5.59 ± 0.26
304	-4.91 ± 0.21
318	-4.89 ± 0.20
324	-4.89 ± 0.29

Los sistemas con valores de energía libre de mayor magnitud (negativa) serán aquellos en los cuales el ligando tiene una mayor afinidad por el receptor. Así pues los compuestos LQM 319 y LQM 322 son los que poseen una mejor interacción con la ECA2. Esto se ve reflejado a que durante la dinámica de estos compuestos la ECA2 se mantuvo en una conformación "cerrada" respecto a las demás simulaciones.

Esto lo analizamos al calcular la distancia entre los residuos Asn 63 y Asn 121 de la ECA2 los cuales se encuentran en la periferia del sitio de unión. En la gráfica 17 se observa esta distancia de entre estos residuos comparando los sistemas con ligando ACE2-LQM304 y ACE2-LQM322. La distancia promedio entre estos residuos para la simulación con LQM 304 fue 17 Å y para la simulación con LQM 322 fue 14 Å.

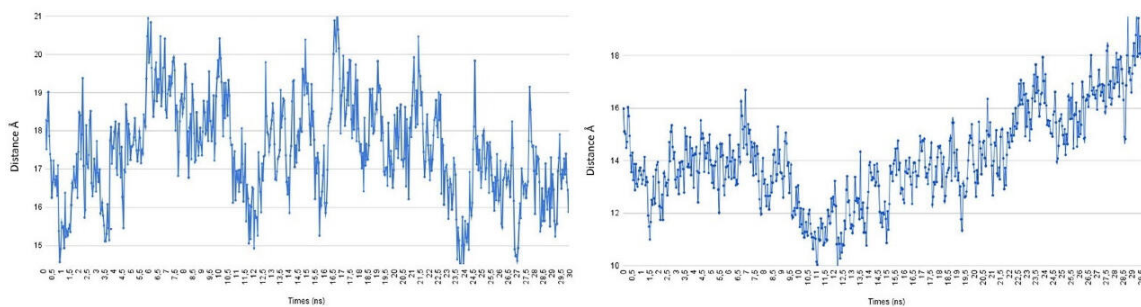


Figura 17: Variación de la distancia entre los aminoácidos Asn 63 y Asn 121 frente al tiempo de la simulación ACE2-LQM304 (izquierda) y ACE2-LQM322

Capítulo 6

Conclusiones

- Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de la M^{pro} en su forma monomérica y mediante la metodología de Dinámica Esencial (EDA) se analizó la trayectoria para generar una estructura representativa, tomando en cuenta su variabilidad conformacional en las condiciones de simulación (solvatación con agua, 300 K de temperatura).
- Utilizando la estructura promedio de M^{pro} se realizó un cribado virtual con los 50 compuestos que conforman la serie LQM700, centrando el sitio de búsqueda en el aminoácido Cys145. Comparando los resultados de energía de afinidad se observó que 20 compuestos de los 50 que conforman la serie LQM 700 mostraron un mejor valor de afinidad que los ligandos que previamente ya se habían reportado como inhibidores de M^{pro} .
- Los compuestos que mostraron una energía de afinidad favorable, por acoplamiento molecular, fueron principalmente LQM 778 y LQM 769. Los cuales sobresalieron en el acoplamiento de las tres conformaciones de M^{pro} .
- Se construyeron los modelos respectivos a la inhibición de la enzima ECA2 de humano con 5 diferentes ligandos: LQM322, LQM319, LQM324, LQM318 y LQM304, que pertenecen a una serie de compuestos derivados tiomorfolínicos. Así también, se generaron los sistemas spike-ECA2-LQM300 considerando una subunidad S1 de la glucoproteína correspondiente al dominio RBD.
- Del análisis de interacción entre la subunidad S1 del glucoproteína del SARS-CoV-2 y el receptor humano ECA2, se predijo que al utilizar el compuesto LQM 322 como inhibidor en ECA2 la interacción entre las proteínas del sistema disminuyó (en comparación con el sistema spike-ECA2 sin inhibidor). Prediciendo que las interacciones y estabilidad del complejo Spike-ECA podrían verse afectadas al utiliza el compuesto mencionado.
- Al comparar los sistemas en los que están presentes los compuestos LQM300 como inhibidores, utilizando los parámetros RMSD, RMSF, y el número de enlaces de hidrógeno por residuo, se identificó que la interacción proteína-proteína se ve significativamente alterada con el compuesto LQM322. Así mismo, para los demás sistemas con compuestos LQM también se predice una alteración en la interacción, sin embargo este estudio aún requiere de confirmación experimental.

- Se efectuó un estudio de dinámica molecular aplicando el modelo alquímico usando la herramienta BFEE2 para predecir las energías de enlace para cada compuesto. Las interacciones menos favorables de los compuestos con ECA2 corresponden a LQM 304, LQM 318 y LQM 324 que tiene la menor energía libre de unión como consecuencia de una cavidad más amplia (conformación abierta) en ECA2 durante la simulación de dinámica molecular. Por su parte, los compuestos LQM319 y LQM322 son los que exhiben una mejor energía libre de unión estimada en el complejo.
- Se predijeron las variaciones en el número promedio de enlaces de hidrógeno en los sistemas de ECA2-LQM300. Estas observaciones indican cual de los complejos ECA2-inhibidor presenta una mejor estabilidad predicha durante el tiempo de simulación ya que, los enlaces de hidrógeno contribuyen directamente a la estabilidad. Evaluando la interacción spike-ECA2 en conjunto con las energías de interacción podemos proponer que compuestos tienen una afinidad adecuada y se consideran candidatos idóneos para ser evaluados mediante un método experimental (*in vitro*).

Referencias Bibliográficas

- [1] Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2. (Fecha de consulta 6 de febrero de 2022); <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/about-variants.html>.
- [2] National Institutes of Health, COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. (Fecha de consulta 15 de abril de 2022); <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/anti-sars-cov-2-antibody-products/anti-sars-cov-2-monoclonal-antibodies/>.
- [3] Shyr, Z. A.; Cheng, Y. S.; Lo, D. C.; Zheng, W. *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 2367–2376.
- [4] Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, . Influenza Antiviral Drug Resistance. (Fecha de consulta 15 de abril de 2022); <https://www.cdc.gov/flu/treatment/antiviralresistance.htm>.
- [5] Jacob, A.; Sood, R.; Chanu, K. V.; Bhatia, S.; Khandia, R.; Pateriya, A. K.; Nagarajan, S.; Dimri, U.; Kulkarni, D. D. *Microb. Pathog.* **2016**, *91*, 35–40.
- [6] Akinbolade, S.; Coughlan, D.; Fairbairn, R.; McConkey, G.; Powell, H.; Ogunbayo, D.; Craig, D. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2022**, *88*, 1590–1597.
- [7] Deeks, S. G.; Lewin, S. R.; Havlir, D. V. *Lancet* **2013**, *382*, 1525–1533.
- [8] National Cancer Institute, Combination Antiretroviral Therapy. (Fecha de consulta 15 de abril de 2022); <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/combination-antiretroviral-therapy>.
- [9] Patrizia, C. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Limits Use of Certain Monoclonal Antibodies to Treat COVID-19 Due to the Omicron Variant. (Fecha de consulta 15 de abril de 2022); <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-limits-use-certain-monoclonal-antibodies-treat-covid-19-due-omicron>.
- [10] Rockett, R.; Basile, K.; Maddocks, S.; Fong, W. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1477–1479.
- [11] Wierbowski, S. D.; Liang, S.; Liu, Y.; Chen, Y.; Gupta, S.; Andre, N. M.; Lipkin, S. M.; Whittaker, G. R.; Yu, H. *Nat. Methods* **2021**, *18*, 1477–1488.
- [12] Zumla, A.; Chan, J. F. W.; Azhar, E. I.; Hui, D. S. C.; Yuen, K.-Y. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 327–347.

- [13] Zhang, L.; Lu, D.; Liu, Z. *Biophys. Chem.* **2008**, *133*, 71–80.
- [14] Martínez-Soriano, P. A.; Macías-Pérez, J. R.; Velázquez, A. M.; Camacho-Enriquez, B. d. C.; Pretelín-Castillo, G.; Ruiz-Sánchez, M. B.; Abrego-Reyes, V. H.; Villa-Treviño, S.; Angeles, E. *Green Sustain. Chem.* **2015**, *05*, 81–91.
- [15] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 145996541, alpha-Ketoamide inhibitor 11r. (Fecha de consulta 26 de febrero de 2022); <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/145996541>.
- [16] Huang, Y.; Yang, C.; feng Xu, X.; Xu, W.; wen Liu, S. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 1141–1149.
- [17] Xia, S.; Zhu, Y.; Liu, M.; Lan, Q.; Xu, W.; Wu, Y.; Ying, T.; Liu, S.; Shi, Z.; Jiang, S.; Lu, L. *Cell. Mol. Immunol.* **2020**, *17*, 765–767.
- [18] Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*.
- [19] 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. *Cell* **2020**, *181*, 271–280.e8.
- [20] Sakkiah, S.; Guo, W.; Pan, B.; Ji, Z.; Yavas, G.; Azevedo, M.; Hawes, J.; Patterson, T. A.; Hong, H. *Front. Chem.* **2021**, *8*, 1–11.
- [21] Cuevas, Gabriel; Cortés, F. *Prof. Psychol.*, 1st ed.; Fondo de Cultura Económica: México, 2003; p 172.
- [22] MacKerell Jr, A. In *Comput. Biochem. Biophys.*; Becker, O. M., MacKerell, A. D. J., Roux, B., Watanabe, M., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2010; pp 7–38.
- [23] Fu, H.; Chen, H.; Cai, W.; Shao, X.; Chipot, C. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 2116–2123.
- [24] Berman, H. M.; Westbrook, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [25] Chemical Computing Group, U. L. C. Molecular Operating Environment (MOE), 2020.09. 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7. 2022.
- [26] Phillips, J. C. et al. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153*, 044130.
- [27] Amadei, A.; Linssen, A. B. M.; Berendsen, H. J. C. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1993**, *17*, 412–425.
- [28] Bakan, A.; Nevins, N.; Lakdawala, A. S.; Bahar, I. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 2435–2447.
- [29] Van Rossum, Guido and Drake, F. L. *Python 3 Reference Manual*; CreateSpace: Scotts Valley, CA, 2009.
- [30] Schulten, W. H.; Dalke, A.; Klaus, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.

- [31] Trott, O.; Olson, A. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.
- [32] Yang, J.; Petitjean, S. J.; Koehler, M.; Zhang, Q.; Dumitru, A. C.; Chen, W.; Derclaye, S.; Vincent, S. P.; Soumillon, P.; Alsteens, D. *Nat. Commun.* **2020**, *11*.
- [33] Delgado, J. M.; Duro, N.; Rogers, D. M.; Tkatchenko, A.; Pandit, S. A.; Varma, S. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2021**, *89*, 1134–1144.
- [34] Vázquez-Valadez, V. H.; Carrillo C., I.; Ramírez C., N.; Velázquez-S., A. M.; Abrego, V. H.; Castañares, R. L.; Angeles, E. *J. Mex. Chem. Soc.* **2018**, *62*, 75–85.
- [35] Vázquez-Valadez, V. H.; Abrego, V.; Martínez, P. A.; Torres, G.; Zúñiga, O.; Escutia, D.; Vilchis, R.; Velázquez, A. M.; Martínez, L.; Ruiz, M.; Camacho, B.; López-Castañares, R.; Angeles, E. *Open Med. Chem. J.* **2013**, *7*, 30–38.
- [36] Wan, Y.; Shang, J.; Graham, R.; Baric, R. S.; Li, F. *J. Virol.* **2020**, *94*.
- [37] Aminu, S.; Ibrahim, M. A.; Sallau, A. B. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2021**, *10*.
- [38] Shin, Y. H.; Jeong, K.; Lee, J.; Lee, H. J.; Yim, J.; Kim, J.; Kim, S.; Park, S. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2022**, *61*.
- [39] Ahmad, I.; Pawara, R.; Surana, S.; Patel, H. *Top. Curr. Chem.*; Springer International Publishing, 2021; Vol. 379; pp 1–49.
- [40] Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1859–1865.
- [41] Leff, P. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16*, 89–97.
- [42] Sittel, F.; Jain, A.; Stock, G. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*.
- [43] Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerhering, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R. *Science.* **2020**, *368*, 409–412.

Article

Evaluation of Inhibitory Activity In Silico of In-House Thiomorpholine Compounds between the ACE2 Receptor and S1 Subunit of SARS-CoV-2 Spike

Victor H. Vázquez-Valadez¹, Alejandro Hernández-Serda², Ma. Fernanda Jiménez-Cabiedes³, Pablo Aguirre-Vidal³, Ingrid González-Tapia³, Laura Carreño-Vargas³, Yoshio A. Alarcón-López³, Andrea Espejel-Fuentes³, Pablo Martínez-Soriano², Miguel Lugo Álvarez³, Ana María Velázquez-Sánchez², Nathan Marko Markarian⁴, Enrique Angeles² and Levon Abrahamyan^{4,*}



Citation: Vázquez-Valadez, V.H.; Hernández-Serda, A.; Jiménez-Cabiedes, M.F.; Aguirre-Vidal, P.; González-Tapia, I.; Carreño-Vargas, L.; Alarcón-López, Y.A.; Espejel-Fuentes, A.; Martínez-Soriano, P.; Lugo Álvarez, M.; et al. Evaluation of Inhibitory Activity In Silico of In-House Thiomorpholine Compounds between the ACE2 Receptor and S1 Subunit of SARS-CoV-2 Spike. *Pathogens* **2021**, *10*, 1208. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091208>

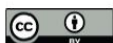
Academic Editor: Tomomi Takano

Received: 6 August 2021

Accepted: 13 September 2021

Published: 17 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Departamento de Ciencias Biológicas FES Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. 1 de Mayo SN Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México CP 54750, Mexico; hugounam83@gmail.com
 - ² Departamento de Ciencias Químicas FES Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. 1 de Mayo SN Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México CP 54750, Mexico; asdfgfamail@gmail.com (A.H.-S.); arturin_sirio@yahoo.com.mx (P.M.-S.); velquezanamara@gmail.com (A.M.V.-S.); angeles@unam.mx (E.A.)
 - ³ Laboratorio de Química Medicinal y Teórica FESC, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. 1 de Mayo SN Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México CP 54750, Mexico; feanda980420@gmail.com (M.E.J.-C.); pyogenes2heli@gmail.com (P.A.-V.); ingridrew1@gmail.com (I.G.-T.); lauracarrevar@gmail.com (L.C.-V.); yoshalar@gmail.com (Y.A.A.-L.); andrea.espejel95@gmail.com (A.E.-E.); mlugoa@gmail.co (M.L.Á.)
 - ⁴ Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA) and Research Group on Infectious Diseases in Production Animals (GREMIP), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; nathan.marko.markarian@umontreal.ca
- * Correspondence: levon.abrahamyan@umontreal.ca

Abstract: At the end of 2019, the world was struck by the COVID-19 pandemic, which resulted in dire repercussions of unimaginable proportions. From the beginning, the international scientific community employed several strategies to tackle the spread of this disease. Most notably, these consisted of the development of a COVID-19 vaccine and the discovery of antiviral agents through the repositioning of already known drugs with methods such as de novo design. Previously, methylthiomorphic compounds, designed by our group as antihypertensive agents, have been shown to display an affinity with the ACE2 (angiotensin converting enzyme) receptor, a key mechanism required for SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) entry into target cells. Therefore, the objective of this work consists of evaluating, in silico, the inhibitory activity of these compounds between the ACE2 receptor and the S1 subunit of the SARS-CoV-2 spike protein. Supported by the advances of different research groups on the structure of the coronavirus spike and the interaction of the latter with its receptor, ACE2, we carried out a computational study that examined the effect of in-house designed compounds on the inhibition of said interaction. Our results indicate that the polyphenol LQM322 is one of the candidates that should be considered as a possible anti-COVID-19 agent.

Keywords: SARS-CoV-2; thiomorpholine derivatives; spike; antivirals

1. Introduction

In December 2019, a new type of disease has been reported in the city of Wuhan (Hubei Province, China), where many cases of atypical pneumonia were diagnosed [1]. The causative agent of this disease was soon determined to be due to a novel coronavirus, initially named “2019-nCoV” and known today as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). With its rapidly increasing number of cases and deaths, coronavirus disease 19 (COVID-19) spread to several countries and was declared a pandemic

by the World Health Organization on 11 March 2020 [2]. Although sanitary measures have been implemented by several countries to combat infection rates, such as social distancing, quarantine, contact tracing, and testing, COVID-19 has claimed more than 4 million lives and has been responsible for approximately 200 million cases worldwide as of 11 July 2021 [3]. The emergence and expansion of SARS-CoV-2 has indeed caused immeasurable damage to the global health and economy sectors, which is why it is of great importance for all countries to collaborate to fight against this deadly disease.

The novel coronavirus, SARS-CoV-2, is a capped single stranded positive sense RNA (ssRNA) coronavirus that belongs to the *Betacoronavirus* genus [4] of the *Sarbecovirus* subgenus, part of the *Coronaviridae* family of the *Nidovirales* order. Like other coronaviruses, its genome is about 30 kilobases (kb) in length and contains a 5' untranslated region (UTR) and a 3' poly (A)-tail at the 3' UTR, allowing it to have a similar structure to the host cell mRNAs [5–7]. Besides both 5' and 3' UTRs, its genome also contains the overlapping ORF1a and 1b genes that encode 15–16 non-structural proteins (nsps), many of which assemble into a replication/transcription complex (RTC) [8]. Furthermore, viral structural proteins, including the spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N), as well as other accessory proteins, are encoded in the genes downstream of ORF1a/ORF1b [9].

SARS-CoV-2 virions are enveloped and spherical, measuring around 100 nm in diameter [10]. Three transmembrane proteins are incorporated in the viral lipid bilayer, including the E, M, and S proteins, and the ssRNA genome is packaged within a helical nucleocapsid made of nucleocapsid (N) proteins [11–13]. The major surface glycoprotein of SARS-CoV-2 is the spike (S) protein, as it is responsible for binding to host cell receptors, mainly to the dipeptide carboxypeptidase angiotensin converting enzyme (ACE2) [14]. The latter is found in various sites susceptible to infection, such as in lung alveolar epithelial cells and small intestine enterocytes [15]. The SARS-CoV-2 spike protein has a homotrimeric structure of which each monomer (180 kDa, 1273 amino acids) contains two subunits: S1 (14–685 AA), which is the most variable region, and S2 (686–1273 AA), which is conserved by the structure and sequence [16,17]. In the S1 subunit, there is an N terminal domain NTD (14–305 AA), receptor binding domain RBD (319–541 AA), and a receptor binding motif RBD (437–508 AA). As for the S2 subunit, it contains a fusion peptide FP (788–806 AA), Heptad Repeat 1 HR1 (912–984 AA), Heptad Repeat 2 HR2 (1163–1213 AA), transmembrane domain TM (1214–1237 AA), and a cytoplasm domain CP (1238–1273 AA) [18]. To enter the target cells, SARS-CoV-2 virions bind to the peptidase domain (PD) of ACE2 via the receptor binding domain (RBD) of its S1 protein, and this is followed by an essential acid-dependent cleavage at the S1/S2 site, which can be achieved by proteases such as the cellular serine protease TMPRSS2 [19,20]. The latter process triggers an additional cleavage of the S2 subunit at the S2' site, which allows it to expose the fusion peptide, and with conformational changes, the virus can fuse with the host cell membrane [21].

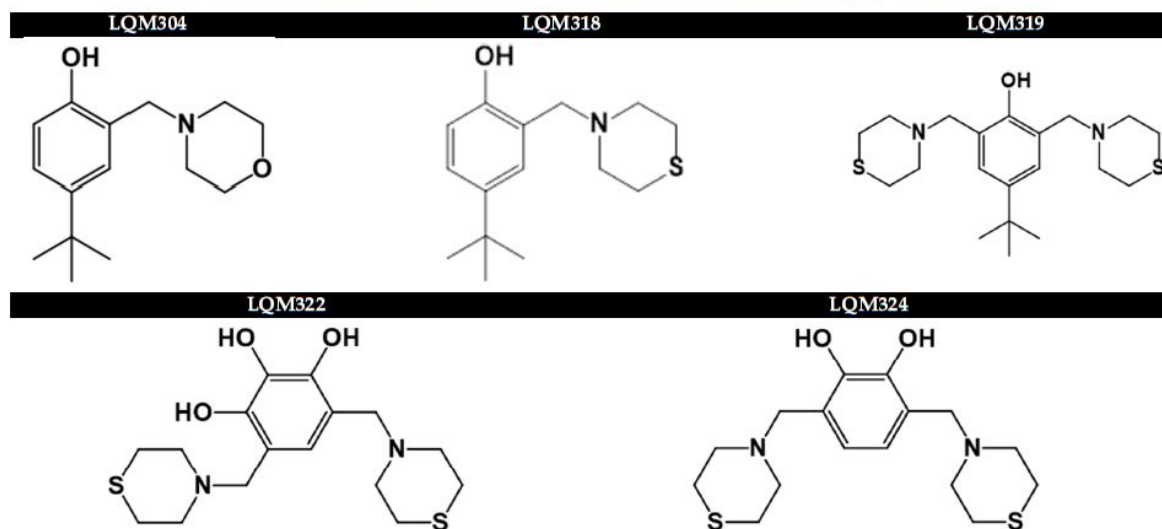
As the number of COVID-19 cases continue to rise, especially in countries where there have not been any sanitary measures put in place, there is an accumulation of mutations in circulating SARS-CoV-2 strains, which allows for the possibility of new variants. A prime example of this is the D614G single nucleotide polymorphism (SNP), which appeared in March 2020 and subsequently became the dominant haplotype worldwide, as it renders the virus more infectious [22]. Several other mutations have been observed in the context of variants, many of which have been identified since January 2021. Of these, some are known as variants of concern (VOC), namely alpha (B.1.1.7), beta (B.351), gamma (P1), and delta (1.617.2), and have been noted to possess increased transmissibility, where some increase disease severity and others have shown a potential to reduce post-vaccination sera neutralization [23–25].

During the ongoing COVID-19 pandemic, several strategies to control the spread have been implemented, the most successful being vaccination [26]. However, with SARS-CoV-2 variants on the rise, the efficacy of the available vaccines can potentially be reduced, allowing the virus to spread further. Because of this, many groups of scientists around the world are currently working hard to find, through different methodologies, an arsenal of

effective drugs against the virus. One such strategy is drug repositioning, which consists of testing already-approved drugs used for other diseases against SARS-CoV-2 [27–30]. In addition to this, various research groups have used their own molecules synthesized in their laboratories and have proposed them as possible candidates against COVID-19 [31,32].

To this day, there are several reports where the interaction between the S1 spike subunit and ACE2 has been resolved, indicating the specific regions of interaction and the impact of the corresponding mutations on that same interaction [33–36]. A potential drug candidate against SARS-CoV-2 would aim to weaken this interaction, thus preventing viral entry into target cells. In a previous study, we obtained experimental and computational data after investigating the effects on ACE1 using five inhibitors synthesized in our laboratory, belonging to a family of 45 compounds known as LQM (Table 1). These molecules had different degrees of inhibition to ACE1, where the order from the most favorable compound to the least was as follows: LQM322, LQM319, LQM324, LQM318, and LQM304 [37]. Before proceeding, an identity analysis between ACE1 and ACE2 was performed. The percent identity between both proteins was 21%, and this was considering the complete sequence of both proteins. Furthermore, an analysis of the pocket where the most favorable affinity for the LQM compounds was also carried out. This comparison of the identity of the binding region considered a radius of 9 Å, and the percentage of identity between ACE1 and ACE2 in the studied zone was 55.4%. With this identity percentage, the results could not be extrapolated, but there was an adequate level of identity to do an independent study in ACE2, and by having ACE1 as the background and not as a template. Given these results, we herein computationally investigated the interaction of ACE2 with these inhibitors (referred as ACE2-In), as well as the ACE2-In interaction with the S1 subunit of the SARS-CoV-2 spike (referred as S1-ACE2-In). From the tested compounds, LQM322 was shown to significantly decrease the interaction between ACE2 and the S1 viral spike subunit. This inhibitory effect can be further tested in future studies *in vitro*, serving as a starting point for the study of its use as a possible antiviral. This work is currently in progress in our laboratory (Dr. L. Abrahamyan, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal).

Table 1. Structure of in-house LQM compounds in two-dimensional representation.



2. Results and Discussion

2.1. Validation Process of Molecular Protein–Protein Coupling

Once the molecular docking for the protein–protein system was completed, the most favorable energetically and geometrically positions were used. For this case, it was found that the position calculated for the spike differed from the experimental position by 0.47 Å. Additionally, for the position calculated for ACE2, the latter differed from the experimental position by 0.46 Å (Figure 1). With this result, the protocol used for the molecular recognition process was suggested to be adequate for this system.

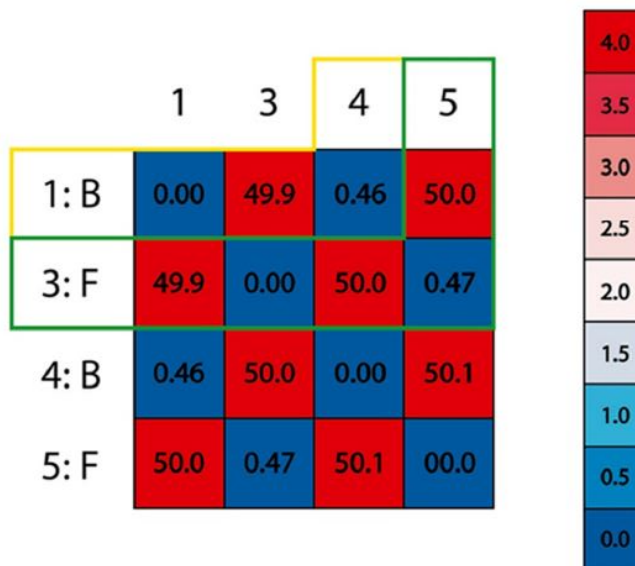


Figure 1. RMSD (root-mean-square deviation) of each component of the system, in yellow boxes, chain 1 and 4 belonging to ACE2 are compared with a 0.46 Å deviation, and for the green boxes, chains 3 and 5 belonging to the spike are compared with a 0.47 Å deviation.

2.2. Molecular Coupling Protocol and MOE-NAMD (Molecular Operating Environment-Nanoscale Molecular Dynamics)

In this section, the systems were analyzed together as the molecular dynamics were carried out from complexes calculated from molecular coupling. In molecular dynamics, processes that refer to ACE2–In complexes, the RMSD (root-mean-square deviation between specified sets of atoms), RMSF (root mean square fluctuation), and the total hydrogen bonds of the protein were all analyzed during simulation, as well as the hydrogen bonds formed between the ligand and the protein, and the free energy of binding. These procedures were calculated with visual molecular dynamics (VMD). The distances between ASN63 and ASN121 were also measured to analyze the behavior of ACE2 in the context of LQM inhibitors. Amino acids ASN63 and ASN121 were used, as each of them belongs to a region that is known to be adjacent when ACE2 acquires a closed conformation. This was therefore done to be able to carry out a geometrical analysis of ACE2 and to see if this affects the interaction with the S1 fraction of the viral spike.

The RMSD in all cases showed that the dynamics simulation reached a stability for every complex, as there were no deviations that suggested instability in this parameter. In the cases studied, RMSD did not exceed 2.5 Å and in a particular case of LQM322, it did not exceed 2 Å (Figure 2).

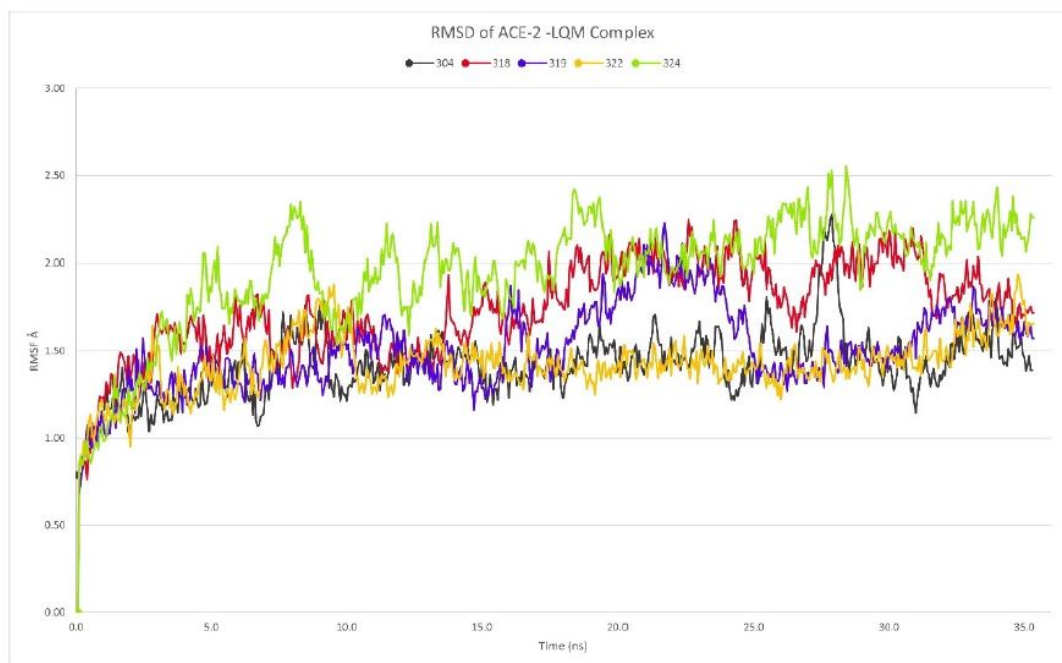


Figure 2. RMSD calculated from studied complexes ACE2–LQM304, ACE2–LQM318, ACE2–LQM319, ACE2–LQM322, and ACE2–LQM324.

Another calculated parameter was the RMSF, as shown in Figure 3. When a dynamic system fluctuates around a well-defined average position, the RMSD of the average over time can be called RMSF (root mean square fluctuation). In other words, the RMSF was calculated to determine the level of fluctuation of each amino acid, and thus to identify if, within the dynamics, there would be any anomaly that would have suggested some important change. Usually, this parameter should not be analyzed in an isolated fashion and other parameters are needed to determine the level of fluctuation or possible instability in the system. In the case of the systems studied, the RMSF did not present important fluctuations that would have suggested that the systems were destabilized or that they lost their structural integrity. The most important fluctuation levels were around residues 120, 275, 325, and 400. All of these fluctuations are from exposed regions and do not have a defined geometry and lack of stability as a helix or a beta sheet structure. That is, they are exposed loops and turns. Furthermore, each of the RMSF fingerprints was consistent between all of the proteins of each of the systems studied. The RMSF plot of the systems are presented below in Figure 3, which are also indicative of the protein integrity or possible-protein destabilization. The residues highlighted in Figure 3 in the orange boxes are those mentioned above that are in high mobility regions of the protein. On the other hand, the residues that are in the blue boxes are the residues that are in interaction with the proposed inhibitors. RMSF corroborates that the residues are not fluctuating in a way that suggests instability in the systems, that is, if the RMSF does not increase, this indicates that the residues do not have such a free movement, which may be reduced by the interaction with the inhibitors. Unlike compound LQM324, in the case of LQM324, an increase in the RMSF parameter of the interaction residues is seen. This behavior indicates that the residues in the region are not stabilizing their mobility with the inhibitor. This can be corroborated with H-bonds. It is worth mentioning that in the calculation of the RMSF, there is an anomaly between residue 305 to 315 of the ACE2–LQM324 complex. This specific region belongs to an exposed area of the protein and the inhibitor is not near the

mentioned region. This behavior is anomalous with respect to the rest of the systems and may be due to a vibrational state that increases the fluctuation of the zone or, less likely, an effect caused by the ligand, as the LQM324 compound is the only one with a nitro group. On the other hand, this compound did not show a favorable affinity, so a more in-depth analysis was not carried out.

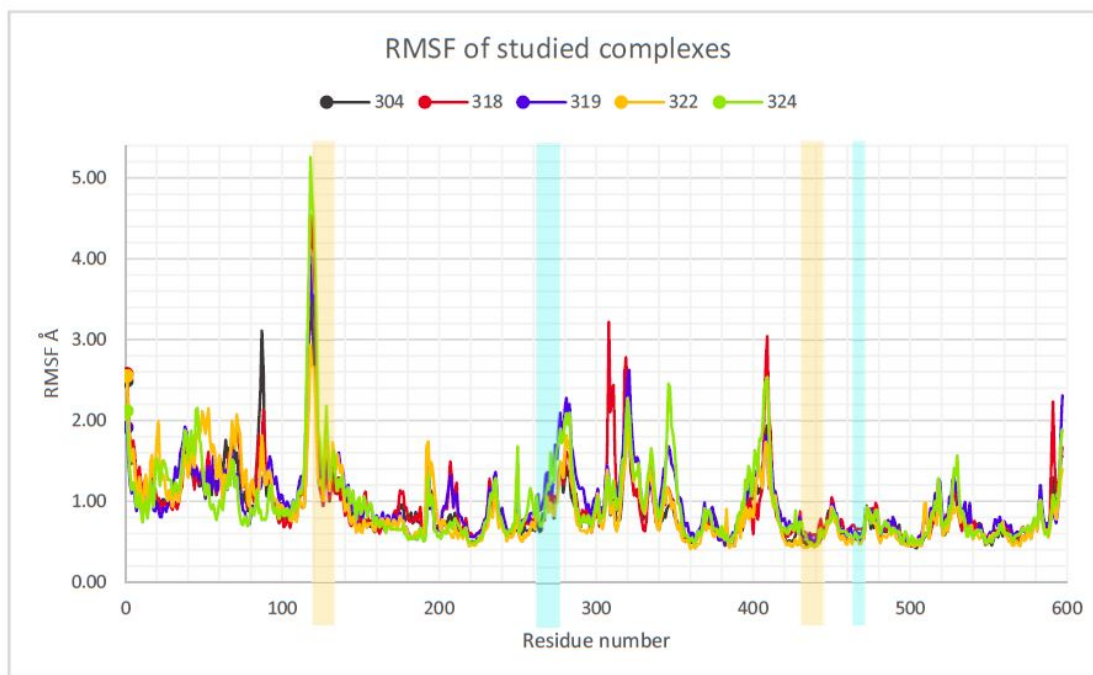


Figure 3. RMSF of the studied complexes of each amino acid on ACE2 during ACE2–inhibitor simulations.

Another way to verify the stability of the protein during dynamics, as mentioned before, is by counting the interstructural hydrogen bonds of each protein. That is, if the number of hydrogen bonds decreases, it may indicate a structural denaturation of the macromolecule during the dynamics, and this may be due to various factors. For example, if the internal energy increases, structural destabilization is almost imminent, and this is seen in the amount of hydrogen bonds [38,39]. According to this parameter, hydrogen bonds were identified in the study cases, and it was not found that there was a destabilization of any protein. In Figure 4, only the production state is shown. This figure also shows the behavior of the protein and hydrogen bonds only for the ACE2 in complex with LQM322. The hydrogen bonds during the MD simulation are consistent as there is no diminution of this parameter. Therefore, this suggests that the internal integrity of ACE2 is sustained during the calculations.

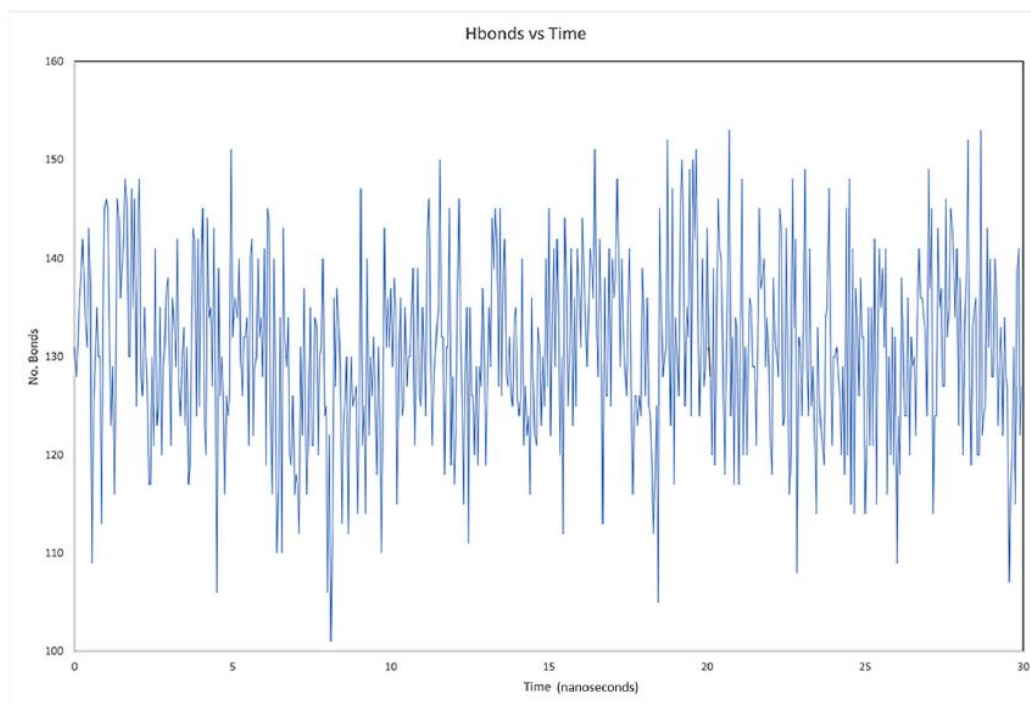


Figure 4. Hydrogen bonds of the ACE2–LQM322 system studied through the time of the dynamics.

The distances measured between amino acids ASN63 and ASN121 are shown in Figure 5. As depicted, both systems maintain a large distance between the residues. In general, even for LQM-304, the distance is greater than for LQM-322, indicating an initial more open conformation of the former system than the latter. The behavior of molecular dynamics suggests that for LQM-322, the distance increases as the simulation goes forward.

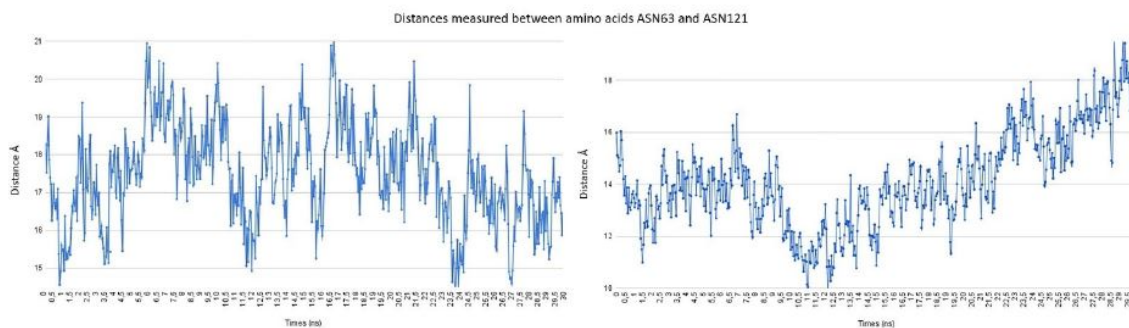


Figure 5. Distance between ASN63 and ASN121 of ACE2–LQM304 (left) and ACE2–LQM322 (right) systems.

Although a 30 ns simulation is not sufficient to conclude whether LQM-322 keeps a more open conformation better than LQM 304, and that further escalation in simulation is needed, in general, both ligands can keep a distance between the above-mentioned amino acids ranging from 14 Å to 19 Å, showing that the open conformation of the protein is maintained by LQM compounds.

To measure the interaction during the dynamic studies between inhibitors and protein, the hydrogen bonds between each ligand and ACE2 were quantified. This is a parameter that allowed us to quantify whether the ligand (the experimental compound) maintained an interaction with the protein (ACE2), in addition to the fact that the longer these interactions last and the greater the number of hydrogen bonds, it can be asserted that the interaction is more favorable.

As shown in Figure 6, the complex with LQM304 had the least hydrogen bonds. During the simulation time, only one bridge persisted. On the other hand, LQM322 continued fluctuating and had the most hydrogen bonds, but remained between two and four hydrogen bonds. These hydrogen bonds were present due to the number of centers that the LQM322 compound had. In comparison, the LQM304 compound had only two centers able to form hydrogen bonds with the hydroxyl of the benzene ring. On the other hand, the LQM322 compound had three hydroxyl groups of the polyphenol and the sulfur of the thiomorpholine that could form hydrogen bonds. However, hydrogen bonds are only one way to evaluate the possible complementarity that it will have for the receptor, and it is not possible to assert any conclusion with only this parameter. It must therefore be analyzed along with other parameters such as RMSD, RMSE, and free binding energy. At this point, the duration of the simulations was considered to be adequate to conclude that a dissociation of the compounds did not occur during the calculations, and the H-bonds remained constant. On the other hand, the latter needs to be kept in mind as, if these hydrogen bonds decreased during the simulation of MD, it could indicate, after reviewing the other parameters as mentioned, that at the same time, that the ligand lacked affinity with the receptor. From the previously reported experimental point of view, LQM322 presented the highest inhibitory activity compared with the other compounds studied.

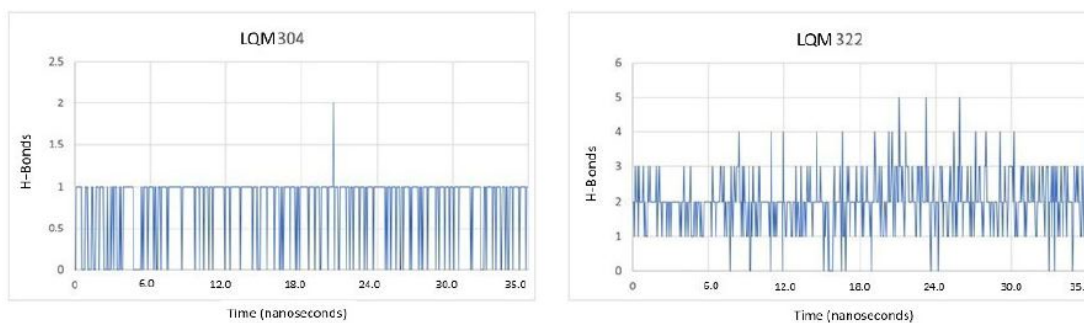


Figure 6. Hydrogen bonds present between the LQM304 (left) and LQM322 (right) compounds and ACE2 during molecular dynamics simulation.

Despite the advancement in computational technology, the accurate prediction of the binding affinities (free binding energies) of the protein–ligand interaction remains a very complicated and challenging task. Inaccurate prediction of the protein–ligand affinities could be due to different types of errors, such as incorrectly predicted binding patterns, lack of consistent binding data obtained using different assay methods and conditions, and flaws in computational methods. This is why it is necessary to carry out complementary studies that will allow us to have an adequate interpretation or to extrapolate the results obtained in this type of calculation. In the case of the present work, BFEE2 was used to estimate the free energy [40]. The Binding Free Energy Estimator (BFEE2) is Python-based software that automates absolute binding free energy calculations through the alchemical or geometric pathway using molecular dynamics simulations. The degrees of freedom of the protein–ligand (or host–host) system are described by a series of geometric variables (or collective variables), as first described by the Karplus group. In BFEE, generalized geometric variables based on the best fit rotation are used, which, in principle, is available for any protein–ligand complex. The results for each system are shown in Table 2. Both

LQM322 and LQM319 showed the best behavior in the case of the evaluation of the calculated energies, where the least favorable were LQM314 and LQM304. In agreement with these results, the behavior seemed to remain consistent in accordance with the results obtained in the study previously carried out on ACE1.

Table 2. Free binding energies for the studied systems computed with BFEE2.

System (ACE2-LQM)	ΔG (kcal/mol)	Deviation \pm (kcal/mol)
304	−4.91	0.21
318	−4.98	0.20
319	−5.71	0.41
322	−5.59	0.26
324	−4.89	0.29

2.3. Description of the Dynamics of Protein–Protein Systems

Once the interaction and stability of each of ACE2–inhibitor systems had been studied, the same parameters were measured, except for the distance between amino acids ASN63 and ASN121 in the S1–ACE2–In complex. Initially, the RMSD of the ACE2–spike complex was measured, as this was the reference with which the studied systems were compared. Figure 7 shows the global graph of the RMSD of the ACE2–spike complex, and it can be concluded that the complex reached stability during the 45 ns that the simulation lasted.

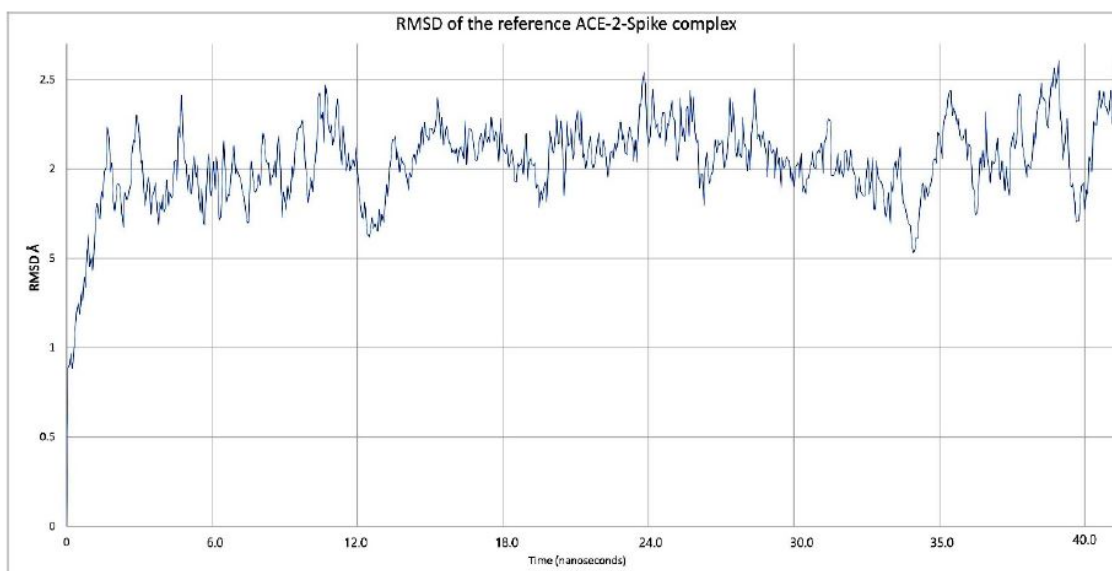


Figure 7. RMSD of the reference ACE2–spike complex during the 40 ns simulation.

Regarding the hydrogen bonds that occurred between the ACE2 and the spike protein, there are also other parameters that must be considered, as they assess the stability of the interaction between both species. In Figure 8, hydrogen bond interactions were quantified, ranging between three and six hydrogen bonds. If inhibitors affected the interaction between ACE2 and spike in such a way that it destabilized the complex, then this parameter would decrease. As can be seen in Figure 9, the hydrogen bonds between spike and ACE2 were modified if an inhibitor was present, in this case it was LQM322. When these interactions were evaluated in presence of the latter, the hydrogen bonds decreased

between two and three. Only half H-bonds from the reference structure were preserved. This may suggest a complex instability that could lead to a decrease in the interaction between the spike and ACE2 receptor [41]. The H-bonds calculated for each ACE2–LQM system were also calculated and are presented in Figure 10. To rule out that this behavior was due to a loss of structural stability for either of the two proteins, the interstructural hydrogen bonds of both proteins were computed and it was found that these interactions were maintained within a stable range, thus indicating that the structural stability of each species was maintained.

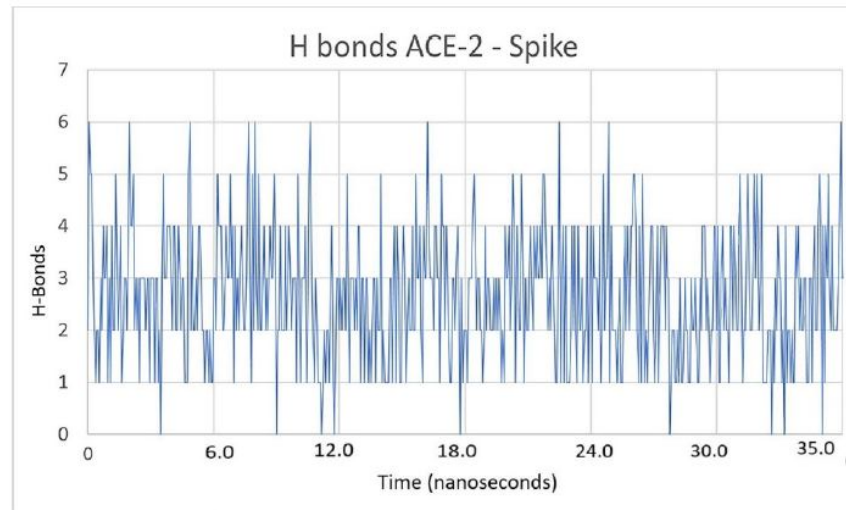


Figure 8. Hydrogen bonds present between ACE2 and the spike in the 45 ns simulation.

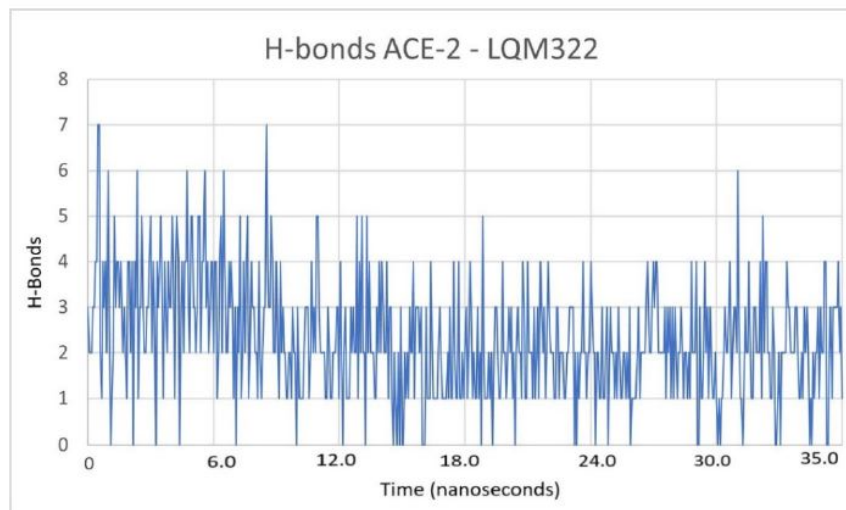


Figure 9. Hydrogen bonds present between ACE2–LQM322 and the spike in the 45 ns simulation.

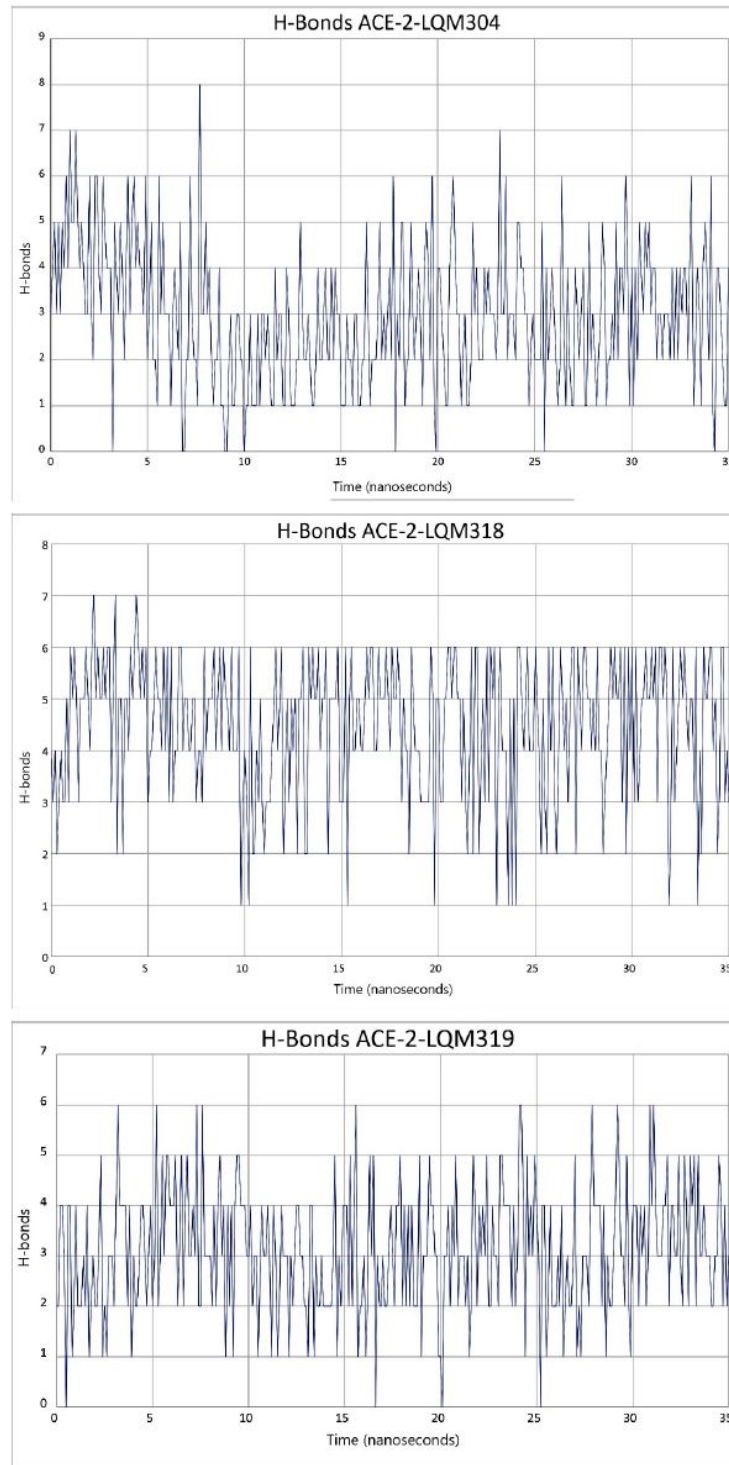


Figure 10. Cont.

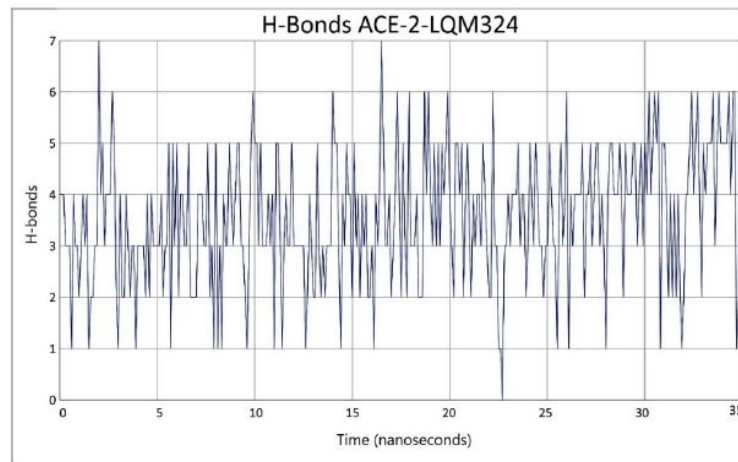


Figure 10. Hydrogen bonds present between ACE2–LQM compounds and the spike in the 45 ns simulation.

Regarding the analysis of the results of molecular dynamics on ACE2–ligand–spike complexes, the RMSD parameters were also calculated for ACE2 and viral S protein, as well as the RMSF parameter (Figure 11). On the other hand, the fluctuations of the RMSF parameter for ACE2 did not suggest a significant alteration at the time of being evaluated. That is, ACE2 remained stable together with its corresponding inhibitor, preserving a stable interaction of the ACE2–inhibitor complex. However, the S1 subunit of the spike showed a fluctuation in the RBD. As shown in Figure 12, the marked region in the red box is the area where the RBD of S1 subunit from the viral spike was located. This region showed a difference with respect to the type of fluctuation that occurred with each inhibitor. Part of the RBD of the spike was found in the indicated region. This region had a low fluctuation in the reference system (ACE2 and spike). Fluctuations between residues 20 through 60 were the highly exposed regions of the spike. However, in the reference system, these regions were kept with less fluctuation compared with when the system incorporated the inhibitors. The RBD region was the most relevant as it presented the complementarity with the receptor. Fluctuations in this area were increased by inhibitors and this behavior indicates that there was not an adequate complementarity for the ACE2–spike complex to be maintained.

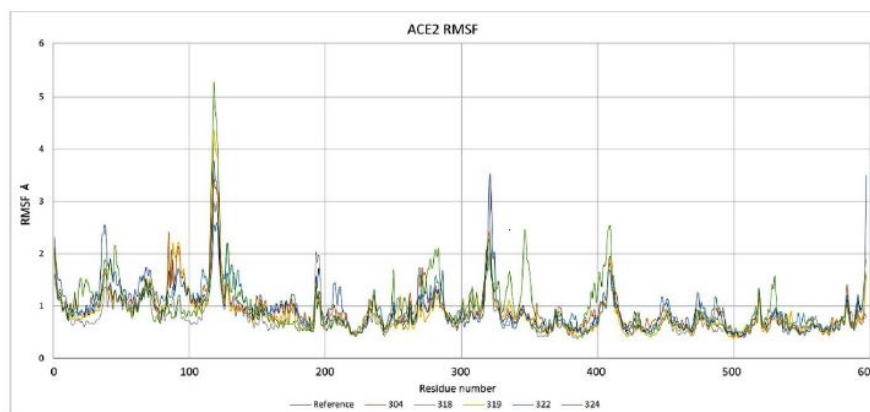


Figure 11. RMSF for the ACE2 protein during simulations in complex with subunit S1.

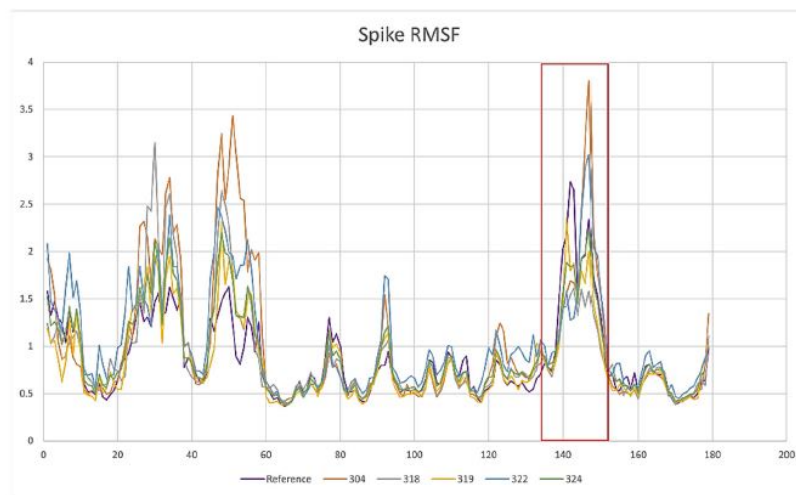


Figure 12. RMSF for subunit S1 during simulations in complex with ACE2; the red shade corresponds to the RBD from subunit S1.

2.4. Procedure for the Analysis of “Patches” of the Interaction Surfaces

Patch analysis was performed to analyze the chemical complementarity [42] that existed in the spike S1–ACE2 and spike S1–ACE2 systems with inhibitors. Table 3 shows the results of the patch analysis on the SARS-CoV-2 spike S1 (ASA—accessible surface area) on the RBD of the spike. This includes the different types of patches, where each of these regions had their counterpart in the ACE2 receptor. Furthermore, the identification number of the patch is shown, followed by the amino acids present in each patch. The area in \AA^2 of each one of the patches and at the end the percent of the area with respect to the total surface area in \AA^2 is shown.

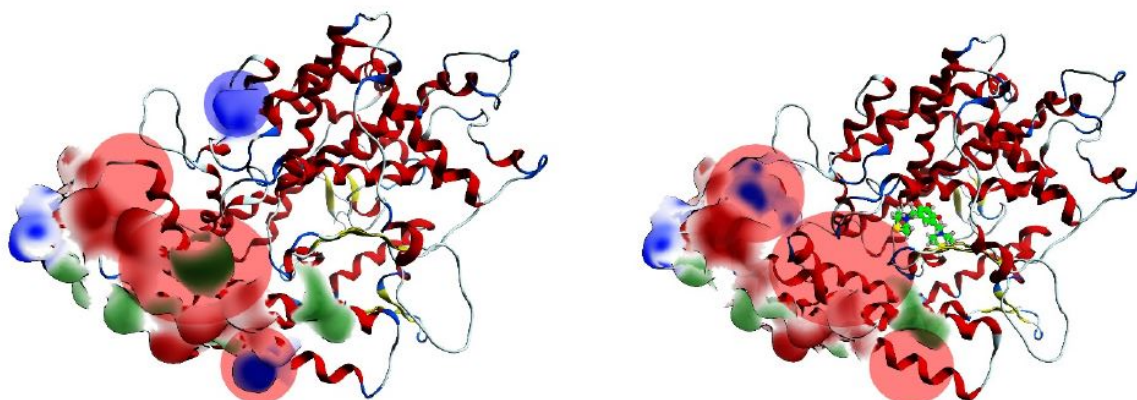
Table 3. Analysis of hydrophobic, negative, and positive charged patches.

	Area \AA^2	% ASA
Hydrophobic	419.20	4.87
Negative	224.70	2.62
Positive	204.30	2.38

Moreover, Table 4 shows the interaction patches of the ACE2 and ACE2–inhibitor proteins. The table provides each contribution that was present in ACE2 without inhibitors and how it was affected with each of the inhibitors present. These patches were calculated from an average structure resulting from the dynamics performed. In other words, during the trajectory, the relative average positions were calculated to obtain these structures. Each of the inhibitors modified its respective patch in a time-dependent way, which affected the complementarity that existed between spike S1 and ACE2. Figure 13 shows the patches present in ACE2 with and without an inhibitor. The red patch indicates a negative electrostatic potential, the blue is positive, and the green is hydrophobic. The figure highlights the regions that were modified with the presence of the inhibitors from the average structure obtained from the ACE2–inhibitor dynamics. These modifications altered the molecular complementarity between the receptor and the viral spike. This may indicate why ACE2 could show a different behavior to spike S1.

Table 4. Average interaction patches of ACE2 and ACE2 with inhibitors.

	ACE2		304		318		319		322		324	
	AREA	% ASA	AREA	% ASA	AREA	% ASA	AREA	% ASA	AREA	% ASA	AREA	% ASA
Hyd	127.45	0.57	112.25	0.50	66.36	0.30	73.40	0.33	72.85	0.33	63.90	0.29
Negative	150.20	0.67	157.65	0.70	156.35	0.72	148.50	0.66	165.10	0.73	152.15	0.68
Positive	58.60	0.26	0.00	0.00	214.40	0.95	50.50	0.20	163.40	0.74	164.10	0.73

**Figure 13.** The patch analysis of the ACE2 (right) in absence and presence of LQM322: (left).

3. Materials and Methods

The Molecular Operating Environment (MOE) 2019.01 program was used to carry out the computational studies [43]. Molecular dynamic simulations were performed with nanoscale molecular dynamics (NAMD) [44], and the visualizations and analyzes were carried out with visual molecular dynamics (VMD) [45].

For molecular dynamics calculations and docking studies, high-efficiency computer equipment was used, including an Intel Xeon Silver 4114 Dual processor computer with 20 cores, 40 4-GHz logic processors, 48 GB RAM, and Nvidia RTX2080 GPU. Another workstation had AMD Ryzen Threadripper 3960X at 3.9 GHz with 24 cores, 48 logic processors, 32 GB RAM, and Nvidia RTX2070 Super GPU and the “Miztli” supercomputer from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

3.1. Preparation of Protein Structures

Initially, the complex of the SARS-CoV-2 S1 spike subunit interacting with human ACE2 (PDB ID 7KMB) was downloaded from the PDB (Protein Databank, rcsb.org) [46,47]. This complex was crystallized at a low pH 5, as occurs in the endosomal process, and was chosen for this study as the viral RBD was found to interact with the ACE2 receptor [47].

An analysis of the structural differences that occur at pH 5 and pH 7 was carried out to analyze the structural and energetic changes in the S1–ACE2 complex. For the preparation of the structures, the Molecular Operating Environment software was used and the topological corrections of the terminal regions of both structures were made. This was necessary because there were regions with a high mobility that, thanks to their low intermolecular interactions, tended to destabilize. Crystallographic data often have imprecisions at these terminal regions that are intrinsically highly mobile. In the same way, the partial charges of the system components were adjusted. The adjustment of the partial charges was carried out using the parameters of a ForceField (FF), in this case Amber10, included in MOE, which has the necessary parameter values of the partial and total charges of the atoms, as well as bonding geometry and nature.

Subsequently, the Protonate3D module was used, which aims to assign ionization states and place hydrogens atoms oriented according to the environment of a given system, with respect to the spatial coordinates. Most of the macromolecular structures obtained from the crystal contained little or no hydrogen coordinate data due to the limited resolution of the applied technique; however, the hydrogen bond network and the ionization state of the titratable groups could have a dramatic effect on simulation results. Specifically, this procedure was performed to describe and orient the hydrogen atoms throughout the system. Normally, the information input into the PDB lacks this information and only contains the heavy atoms. The protonation tools are also based on the parameters of the FF “Amber10: ETH”. For this calculation, the temperature was adjusted to 300 K and the pH was 5.0.

For the electrostatic function, Generalized Born formalism was used with integral volume formalism of GB/VI. The dielectric constant was adjusted to 80 as a solvated system was used. Once the charges, hydrogens, and terminal regions were adjusted, a slight refinement was carried out. This step allowed the structures to relax, minimize energy, and eliminate some steric effects that could modify the stability of the components, probably caused by the compaction of the protein in a crystalline state. The gradient used in this case was 0.1 kcal/mol/Å. This adjusted parameter allowed us a slight accommodation with the new components in the system, without causing significant structural or conformational modifications. To identify the RBD of the S1 spike subunit and the involved amino acids of ACE2, a pre-established set of amino acids was generated for each component. For S1, these were S109-T110 and P147-I166, and for ACE2, they were S1, T2, L6, T9, T13, Y16, E20, and G333-D337.

3.2. Validation Process of Molecular Protein–Ligand Coupling

To validate the molecular docking protocol, the procedure described in a previously performed study was carried out [48]. This was done to ensure that predictive models would not be affected by the structural differences caused by the different isoforms. Indeed, the protein family and system maintain conserved regions between the isoforms, and therefore, the same conditions were maintained. The conditions used were as follows: the triangle matcher method (optimized method for small or medium organic molecules) was used to search for the initial positioning of each of the ligands, and London dG formalism was used for the energetic evaluation. One hundred positions were returned from the orientations of the ligand at the possible site of interaction for the first evaluation. The grid assigned for protein–ligand docking was 10 Å, twice the size of the ligand in all directions, using wall restrains. Refinement was returned to 50 poses because when 100 were evaluated, no significant difference was found. The docking results were clustered based on the RMSD of the heavy atoms of the ligands with a maximum tolerance of 1 Å. The respective clusters of the docking resulting poses are shown in Supplementary Figure S1. Once this initial positioning process was finished, a refinement of the positions calculated was made. The returning processes were refined with an energy evaluation, using the GBVI/WSA dG formalism, returning 50 probable positions at the end of the calculation.

3.3. Validation Process of Molecular Protein–Protein Coupling

To validate the designed molecular docking protocol, the following procedure was performed: the macromolecular complex was separated into two independent files. One corresponded to the viral spike protein (ligand) and the other to ACE2 (receptor). For this specific process, only one subunit of the spike trimer was used. Each component of the already separated system underwent geometric and energetic optimization. For this part, a correction that considered all of the atoms was used, and the calculation of the partial charges was computed using Amber10 with EHT ForceField. The adjustment of the distances and angles of the OH groups were allowed to reach their optimal orientation. Water molecules remained as rigid bodies and the gradient used for minimization was 0.01 RMS Kcal/mol/Å². To assign the calculation volume for protein–protein docking, a

search box was assigned, defined as the center on the THR31 of the RBD of ACE2. The box had a geometry of $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}$, establishing rotations of the amino acids of the targets with an RMSD of no greater than 2 \AA .

Once the components were prepared independently, the molecular docking was carried out using the Dock Protein–Protein module. The subsets of atoms used were as follows:

The receiver was ACE2, occupying the sets as a reconnaissance site.

For the ligand, the S1 subunit of the viral spike was assigned, and the recognition site was selected with respect to the possible interaction sites (Figure 14).

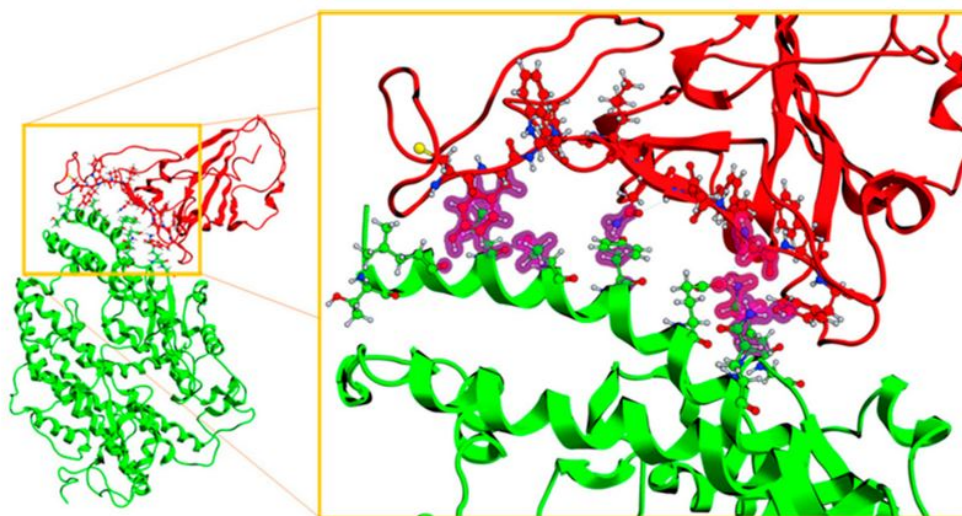


Figure 14. Complex of subunit S1 of the viral spike with the ACE2, with the representation of the viral RBD (receptor binding domain; red) and the ACE2 receptor amino acids involved (green).

3.4. Molecular Docking Protocol

In this section there are different molecular docking processes. This is because of the different couplings, which were raised as follows: during virus entry, molecular recognition occurred first between ACE2 and RBD in the S1 region. This is what subsequently allowed the virus to enter the host cell. In this case, molecular coupling occurred between the receptor protein (ACE2) and the ligand protein (spike S1).

To evaluate the effectiveness of potential candidates to inhibit the binding site, it was assumed that the inhibitor reached the ACE2 receptor first, i.e., before the S viral protein. This molecular docking involves a protein–ligand protocol in which a structural change in the receptor will modify the recognition between ACE2 and RBD of the S1 region. Once the ACE–In docking was made, the next recognition process between the ACE2–In–S1 complex was performed. Therefore, the molecular coupling process was carried out with the module and the conditions described in the validation process of the ligand–protein and protein–protein docking.

3.5. Molecular Dynamics Performed for ACE2–In Systems

In this section, the MOE program was used as an interface to prepare the simulation files. However, all simulations were performed with the NAMD 2.13 Multicore processor CUDA [44]. Each of these systems, obtained from the molecular docking between ACE2 and the LQM compounds, were solvated in a periodic box. Periodic conditions allowed for a constant amount of solvent to be maintained in all directions, that is, the number of molecules present in the system was not altered. The dimensions of the box in this case

were of the type P1, with distances of 106 Å on each side and angles of 90°. The solvent had sodium chloride (NaCl) with a margin of 6 Å. NaCl was assigned to these simulations as ACE2 is a chloride-dependent protein. The 6 Å margin refers to the minimum distance between the counter ions and the solvent molecules in the system. The complexes were centered, and the axes of the box were aligned. Before carrying out the molecular dynamics, the systems were minimized using an SVL script that was implemented and obtained from repositories of the program to find the global minimum of energy. This script worked by minimizing the system in a progressive way (stepwise), starting with the areas of the highest energy. Minimization was first executed in the solvent, then the protein, and finally in the complete system comprising both the solvent and complexes. All of this was performed with the following specifications: Forcefield Amber10: ETH; eps = 1; Cut-off (10)(12), charges calculations and Gradient: 0.2 RMS. For dynamics, the sample time was 0.5 ps and the time step was 0.002 ps. The total simulation time was 35 ns, of which 5 ns was for heating the system and beginning with the equilibrium process of the system.

3.6. Description of the Dynamics of Protein–Protein Systems

In this section, two types of simulations were performed: one that contained ACE2, with and without inhibitors, interacting with the S1 subunit (ACE2–S1), and another that contained ACE2 interacting with the complete trimer of the viral spike. For preparation of the ACE2–S1 complex, the model with PDB code 7KNB was used as a starting point [47]. However, this did not contain the Zn²⁺ cofactor of ACE2. Therefore, the model with PDB code 3SCL was used to model mainly the Zn²⁺ cofactor, and an ACE2 overlay was performed [49].

Molecular dynamics studies were performed to analyze the effect of the D614G mutation on the recognition process of the SARS-CoV-2 spike protein with human ACE2. Two systems (with and without mutation) were generated using the native Wuhan spike protein (UniProt: P0DTC2) in complex with ACE2 (UniProt: Q9BYF1). In this case, to have a more precise system, the trimeric spike protein model was used, as at this point it is unknown what impact this mutation may have on a complete system (Figure 15).

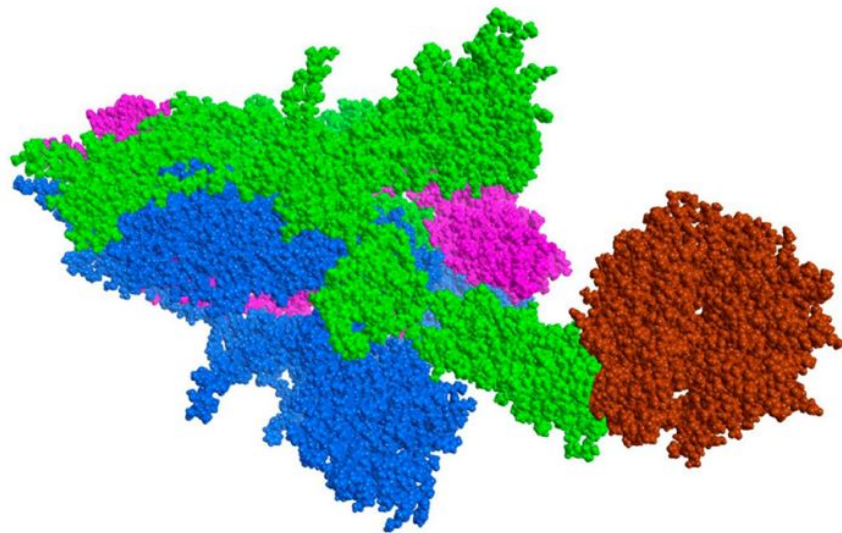


Figure 15. Spike ACE2 system. Sphere model (coarse grain). ACE2 is depicted in brown.

The preparation of systems with a greater complexity began with the generation of the missing structures of the ACE2–S1 complex using the Loop Modeler tool of the MOE software. Completed segments were the residuals of the following positions: I 64–83, II

139–153, III 174–189, IV 240–265, V 618–642, VI 674–692, VII 809–817, and VIII 862–855. For this, segments were selected individually, and a search for similarity was carried out, generating a database with the most plausible results. The best five results were selected according to the S score (Score function), and the best value was selected to complete the structure. Conditions for the generation of loops were parameterized on an Amber10: EHT force field and a 12 Å cut-off to homologate the molecular dynamic conditions and try simulate the ideal physiological conditions.

In addition to this, a correction was made for localized errors, such as protonation, which was corrected with the 3D protonate module, completing side chains with the loop modeler module, terminal chain errors with corrections from FF libraries, and adding charges to the atoms with partial charges. The next step was to solvate the complex, adding water as a solvent at periodic conditions. The shape of the periodic box was P1, with dimensions of 134.0 Å on each side and angles of 90° on all of the vertices, thus yielding a periodic cube that was further used to evaluate the dynamic simulations. Neutral charges and partial charges were assigned to atoms with parameters of the mentioned FF. The following step was a minimizing system using the Energy Minimize option with the specifications mentioned above. Finally, using the Dynamics with NAMD option, the following protocol was performed:

- Heating for 1 ns, temperature gradient of 0 K to 300 K.
- Equilibrium of 4 ns at 300 K and 1 atm.
- Production 40 ns at 300 K and 1 atm.

3.7. Free Binding Energy Calculations

The Binding Free Energy Estimator (BFEE) is a Python-based software that automates the absolute binding free energy calculations through the alchemical or geometric pathway using molecular dynamics simulations. The degrees of freedom of the protein–ligand (or host–host) system are described by a series of geometric variables (or collective variables), as first described by the Karplus group [40]. In BFEE, generalized geometric variables based on the best fit rotation are used, which, in principle, is available for any protein–ligand complex. Among the parameters that were used for the energetic evaluation were the following:

“Outputenergies, outputtiming, outputpressure, restartfreq, XSTFreq, dcdFreq”: all set to 5000; wrapping all the water molecules; non-water molecules unwrapped; PMETolerance: 10×10^{-6} ; time step: 2.0; rigid bonds: all; rigid tolerance: 0.0001; rigid iterations 400; no flexible cell.

3.8. Procedure for the Analysis of “Patches” of the Interaction Surfaces

Protein patches are surface indicators that identify regions of hydrophobicity and the presence of charged regions. These patches are useful, for example, to assess which mutations may lead to better solubility or what the potential sites of interaction may be in protein–protein complexes. The MOE Protein Patch Analyzer panels was used to manipulate, extract, and view the calculated patches. Patches on which the analysis was made were calculated in the sets of each protein. This was done to evaluate if there were any changes that would suggest a decrease in the interaction of both structures, taking the systems without inhibitors as a reference. These contributions were evaluated with each type of interaction, which could be hydrophobic, positive, or negative, as well as the total area and percentage of area of the patch with respect to the total surface. This patch analysis was performed in the following stages: with the reference complex ACE2–S1, and ACE2 with each of the LQM compounds and every system where ACE2–In–S1 is found.

4. Conclusions

Upon carrying out the studies corresponding to the interaction between the S1 subunit of the SARS-CoV-2 spike and the human ACE2 receptor, it was found that when the ACE1 inhibitor LQM322 was used, the interaction between both proteins decreased. This, when

analyzing the results of the computational analyzes, allowed for determining that the complex interactions and stabilities are affected if the mentioned compound is used. To assert this, a comparison was made with respect to a system without inhibitors in order to know the behavior of the protein complex interaction with respect to time (40 ns). Once compared with the systems where some inhibitors are present, the parameters such as RMSD, RMSE, hydrogen bonds, and interaction patches indicate that the interaction is significantly diminished with the LQM322 compound. It should be mentioned that all of the other LQM compounds also present an alteration in the interaction, but the computational evidence does not allow us to affirm whether it is significant. The LQM304 compound has the least favorable interaction and therefore does not present an alteration during the interaction process between the S1 subunit and ACE2. The less favorable compound interaction with ACE2 corresponds to LQM 304, which has the lowest binding free energy as a consequence of a greater gap (open conformation) in ACE2 during the simulation of molecular dynamics. These compounds displayed a similar behavior when they were tested with the ACE1 isoform. The latter also have centers that allow them to interact through hydrogen bonds, which help stabilize the ACE2–inhibitor complex during the simulation time. In addition to the fact that the complex was stable over time, the interaction energies will allow us to infer that the compounds may have an adequate affinity and that they will be suitable candidates to evaluate using an experimental method. One of the characteristics of the compounds being used is compounds with high reaction yields and low-cost synthesis routes. This agrees with the experimental data reported in the aforementioned study [37]. It is also necessary to mention that from a computational point of view, it is not necessary to use a complete viral spike system, thus allowing for optimizing the calculation time. In this way, it is possible to carry out computational studies that are not as time consuming in these systems in order to propose molecules as candidates that interact with ACE2. With all of the above-mentioned, it is possible to affirm that the LQM319 and LQM322 compounds have a high potential to be tested in *in vitro* studies in order to evaluate their activity in an experimental model together with the LQM304 compound, which would work as a compound with a low or no inhibitory activity.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10091208/s1>, Figure S1: Docking results for each cluster generated from the inhibitor ACE2 receptor.

Author Contributions: Conceptualization, L.A., V.H.V.-V. and E.A.; methodology, L.A., E.A. and V.H.V.-V.; software, A.H.-S., P.A.-V., Y.A.A.-L., M.L.Á. and L.C.-V.; validation, L.A., E.A. and V.H.V.-V.; formal analysis, V.H.V.-V., E.A. and L.A.; investigation, V.H.V.-V., M.F.J.-C., I.G.-T. and A.E.-F.; resources, A.M.V.-S.; data curation, A.M.V.-S., V.H.V.-V., M.F.J.-C. and I.G.-T.; writing—original draft preparation, V.H.V.-V., L.A. and P.M.-S.; writing—review and editing, V.H.V.-V., N.M.M. and L.A.; visualization, V.H.V.-V., A.H.-S. and P.A.-V.; supervision, L.A. and E.A.; project administration, L.A. and E.A.; funding acquisition, E.A. and L.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the UNAM Projects PAPIIT IN202020, PIAP12005, and DGTI LANCAD-UNAM-DGTIC-to E.A. This work was partially supported by the NSERC Discovery grant RGPIN/04897-2017 to L.A. and the NSERC Undergraduate Student Research Award to N.M.M., who realized an internship under L.A. supervision.

Acknowledgments: We would like to thank Moises Hernández from FESC-UNAM and Leyva Ramírez Marco from the Chemistry Department, CINVESTAV, for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506. [CrossRef]
- World Health Organization. WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19. 11 March 2020. Available online: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020> (accessed on 18 July 2021).
- World Health Organization. Weekly Epidemiological Update on COVID-19—13 July 2021. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19--13-july-2021> (accessed on 18 July 2021).
- Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733. [CrossRef]
- Zhao, J.; Qiu, J.; Aryal, S.; Hackett, J.L.; Wang, J. The RNA architecture of the SARS-CoV-2 3'-untranslated region. *Viruses* **2020**, *12*, 1473. [CrossRef]
- Miao, Z.; Tidu, A.; Eriani, G.; Martin, F. Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA Biol.* **2021**, *18*, 447–456. [CrossRef] [PubMed]
- Romano, M.; Ruggiero, A.; Squeglia, F.; Maga, G.; Berisio, R. A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells* **2020**, *9*, 1267. [CrossRef] [PubMed]
- Da Silva, S.J.R.; Alves da Silva, C.T.; Mendes, R.P.G.; Pena, L. Role of nonstructural proteins in the pathogenesis of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 1427–1429. [CrossRef]
- Yan, L.; Zhang, Y.; Ge, J.; Zheng, L.; Gao, Y.; Wang, T.; Jia, Z.; Wang, H.; Huang, Y.; Li, M.; et al. Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5874. [CrossRef] [PubMed]
- Ke, Z.; Oton, J.; Qu, K.; Cortese, M.; Zila, V.; McKeane, L.; Nakane, T.; Zivanov, J.; Neufeldt, C.J.; Cerikan, B.; et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature* **2020**, *588*, 498–502. [CrossRef]
- Cubuk, J.; Alston, J.J.; Incicco, J.J.; Singh, S.; Stuchell-Brereton, M.D.; Ward, M.D.; Zimmerman, M.I.; Vithani, N.; Griffith, D.; Wagoner, J.A.; et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1936. [CrossRef]
- Dinesh, D.C.; Chalupska, D.; Silhan, J.; Koutna, E.; Nencka, R.; Veverka, V.; Boura, E. Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1009100. [CrossRef]
- Mandala, V.S.; McKay, M.J.; Shcherbakov, A.A.; Dregni, A.J.; Kolocouris, A.; Hong, M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27*, 1202–1208. [CrossRef] [PubMed]
- Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215–220. [CrossRef] [PubMed]
- Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis, M.L.C.; Lely, A.T.; Navis, G.J.; van Goor, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* **2004**, *203*, 631–637. [CrossRef]
- Martí, D.; Torras, Y.; Bertran, O.; Turon, P.; Alemán, C. Temperature effect on the SARS-CoV-2: A molecular dynamics study of the spike homotrimeric glycoprotein. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 1848–1862. [CrossRef]
- Huang, Y.; Yang, C.; Xu, X.-F.; Xu, W.; Liu, S.-W. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 1141–1149. [CrossRef]
- Xia, S.; Zhu, Y.; Liu, M.; Lan, Q.; Xu, W.; Wu, Y.; Ying, T.; Liu, S.; Shi, Z.; Jiang, S.; et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell. Mol. Immunol.* **2020**, *17*, 765–767. [CrossRef] [PubMed]
- Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271–280.e278. [CrossRef]
- Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 11727. [CrossRef]
- Peacock, T.P.; Goldhill, D.H.; Zhou, J.; Baillon, L.; Frise, R.; Swann, O.C.; Kugathan, R.; Penn, R.; Brown, J.C.; Sanchez-David, R.Y.; et al. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 899–909. [CrossRef]
- Korber, B.; Fischer, W.M.; Gnanakaran, S.; Yoon, H.; Theiler, J.; Abfalterer, W.; Hengartner, N.; Giorgi, E.E.; Bhattacharya, T.; Foley, B.; et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: Evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell* **2020**, *182*, 812–827.e819. [CrossRef]
- Davies, N.G.; Abbott, S.; Barnard, R.C.; Jarvis, C.I.; Kucharski, A.J.; Munday, J.D.; Pearson, C.A.B.; Russell, T.W.; Tully, D.C.; Washburne, A.D.; et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* **2021**, *372*, eabg3055. [CrossRef]
- Zhang, M.; Xiao, J.; Deng, A.; Zhang, Y.; Zhuang, Y.; Hu, T.; Li, J.; Tu, H.; Li, B.; Zhou, Y. Transmission dynamics of an outbreak of the COVID-19 delta variant B.1.617.2—Guangdong province, China, May–June 2021. *China CDC Wkly.* **2021**, *3*, 584–586. [CrossRef]
- Awadasseid, A.; Wu, Y.; Tanaka, Y.; Zhang, W. SARS-CoV-2 variants evolved during the early stage of the pandemic and effects of mutations on adaptation in Wuhan populations. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 97–106. [CrossRef]

26. Haas, E.J.; Angulo, F.J.; McLaughlin, J.M.; Anis, E.; Singer, S.R.; Khan, F.; Brooks, N.; Smaja, M.; Mircus, G.; Pan, K.; et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: An observational study using national surveillance data. *Lancet* **2021**, *397*, 1819–1829. [[CrossRef](#)]
27. Riva, L.; Yuan, S.; Yin, X.; Martin-Sancho, L.; Matsunaga, N.; Pache, L.; Burgstaller-Muehlbacher, S.; De Jesus, P.D.; Teriete, P.; Hull, M.V.; et al. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature* **2020**, *586*, 113–119. [[CrossRef](#)]
28. Jang, W.D.; Jeon, S.; Kim, S.; Lee, S.Y. Drugs repurposed for COVID-19 by virtual screening of 6,218 drugs and cell-based assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2024302118. [[CrossRef](#)]
29. Han, N.; Hwang, W.; Tzelepis, K.; Schmerer, P.; Yankova, E.; MacMahon, M.; Lei, W.; Katritis, N.M.; Liu, A.; Felgenhauer, U.; et al. Identification of SARS-CoV-2-induced pathways reveals drug repurposing strategies. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabh3032. [[CrossRef](#)]
30. Singh, N.; Decroly, E.; Khatib, A.-M.; Villoutreix, B.O. Structure-based drug repositioning over the human TMPRSS2 protease domain: Search for chemical probes able to repress SARS-CoV-2 Spike protein cleavages. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *153*, 105495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dai, W.; Zhang, B.; Jiang, X.-M.; Su, H.; Li, J.; Zhao, Y.; Xie, X.; Jin, Z.; Peng, J.; Liu, F.; et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science* **2020**, *368*, 1331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Singh, V.K.; Chaurasia, H.; Kumari, P.; Som, A.; Mishra, R.; Srivastava, R.; Naaz, F.; Singh, A.; Singh, R.K. Design, synthesis, and molecular dynamics simulation studies of quinoline derivatives as protease inhibitors against SARS-CoV-2. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, 1–24. [[CrossRef](#)]
33. Sakkiah, S.; Guo, W.; Pan, B.; Ji, Z.; Yavas, G.; Azevedo, M.; Hawes, J.; Patterson, T.A.; Hong, H. Elucidating interactions between SARS-CoV-2 trimeric spike protein and ACE2 using homology modeling and molecular dynamics simulations. *Front. Chem.* **2021**, *8*, 1247. [[CrossRef](#)]
34. Delgado, J.M.; Duro, N.; Rogers, D.M.; Tkatchenko, A.; Pandit, S.A.; Varma, S. Molecular basis for higher affinity of SARS-CoV-2 spike RBD for human ACE2 receptor. *Proteins* **2021**, *89*, 1134–1144. [[CrossRef](#)]
35. Hakmi, M.; Bouricha, E.M.; Jihane, A.; Lmimouni, B.; Harti, J.; Belyamani, L.; Ibrahim, A.; Ibrahim, P. In silico exploration of small-molecule α -helix mimetics as inhibitors of SARS-CoV-2 attachment to ACE2. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**. [[CrossRef](#)]
36. Zhuo, L.-S.; Wang, M.-S.; Yang, J.-F.; Xu, H.-C.; Huang, W.; Shang, L.-Q.; Yang, G.-F. Insights into SARS-CoV-2: Medicinal Chemistry Approaches to Combat Its Structural and Functional Biology. *Top. Curr. Chem.* **2021**, *379*, 23. [[CrossRef](#)]
37. Vázquez-Valadez, V.H.; Carrillo, C.L.; Ramírez, C.N.; Abrego, V.H.; López Castañares, R.; Angeles, E. Evaluation of the inhibition of angiotensin-converting enzyme by new thiomorpholine compounds using capillary zone electrophoresis. *J. Mex. Chem. Soc.* **2018**, *62*, 75–85. [[CrossRef](#)]
38. Zhang, D.; Lazim, R. Application of conventional molecular dynamics simulation in evaluating the stability of apomyoglobin in urea solution. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44651. [[CrossRef](#)]
39. Pace, C.N.; Fu, H.; Lee Fryar, K.; Landua, J.; Trevino, S.R.; Schell, D.; Thurlkill, R.L.; Imura, S.; Scholtz, J.M.; Gajiwala, K.; et al. Contribution of hydrogen bonds to protein stability. *Protein. Sci.* **2014**, *23*, 652–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Fu, H.; Chen, H.; Cai, W.; Shao, X.; Chipot, C. BFEE2: Automated, streamlined, and accurate absolute binding free-energy calculations. *J. Chem. Inf. Modeling* **2021**, *61*, 2116–2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. DeChancie, J.; Houk, K.N. The origins of femtomolar protein–ligand binding: Hydrogen-bond cooperativity and desolvation energetics in the biotin–(strept)avidin binding site. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5419–5429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Preißner, R.; Goede, A.; Frömmel, C. Dictionary of interfaces in proteins (DIP). Data bank of complementary molecular surface patches11Edited by R. Huber. *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 535–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. *Molecular Operating Environment (MOE) 2019.01*; Chemical Computing Group ULC: Montreal, QC, Canada, 2021.
44. Phillips, J.C.; Hardy, D.J.; Maia, J.D.C.; Stone, J.E.; Ribeiro, J.V.; Bernardi, R.C.; Buch, R.; Fiorin, G.; Héning, J.; Jiang, W.; et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153*, 044130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38, 27–38. [[CrossRef](#)]
46. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Boume, P.E. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)]
47. Zhou, T.; Tsybovsky, Y.; Gorman, J.; Rapp, M.; Cerutti, G.; Chuang, G.-Y.; Katsamba, P.S.; Sampson, J.M.; Schön, A.; Bimela, J.; et al. Cryo-EM Structures of SARS-CoV-2 Spike without and with ACE2 Reveal a pH-dependent switch to mediate endosomal positioning of receptor-binding domains. *Cell Host Microbe* **2020**, *28*, 867–879.e865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Vázquez-Valadez, V.H.; Abrego, V.H.; Martínez, P.A.; Torres, G.; Zúñiga, O.; Escutia, D.; Vilchis, R.; Velázquez, A.M.; Martínez, L.; Ruiz, M.; et al. Docking studies of methylthiomorpholin phenols (LQM300 Series) with angiotensin-converting enzyme (ACE). *Open Med. Chem. J.* **2013**, *7*, 30–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wu, K.; Peng, G.; Wilken, M.; Geraghty, R.J.; Li, F. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 8904–8911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]