



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE FARMACIA

**DISEÑO Y SÍNTESIS MULTICOMPONENTE DE
PEPTIDOMIMETICOS COMO INHIBIDORES DE
METALOPROTEASAS**

POR SEBASTIÁN IGNACIO MANRÍQUEZ SEPÚLVEDA

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico.

Profesor guía: Dr. Alexander Fernández de la Torre, departamento de química orgánica, Universidad de concepción.

Profesor co-guía: Dr. Julio Caballero Ruiz, departamento de Bioinformática, Universidad de Talca.

Abril, 2022.

Concepción, Chile.

© 2022, Sebastián Ignacio Manríquez Sepúlveda

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Agradecimientos

Gracias a Alexander Fernández de la Torre, profesor guía, por haberme enseñado y apoyado.

Gracias a Julio Caballero Ruiz, profesor co-guía, por haberme enseñado y por su ayuda con los resultados computacionales.

Finalmente agradecer a toda mi familia por apoyarme siempre, especialmente a mis padres René Manríquez y Evelyn Sepúlveda, que gracias a su esfuerzo conjunto pude estudiar una carrera universitaria.

Proyectos Fondecyt 1170718 y 11200057.

2. Tabla de contenidos

3. Índice de tablas.....	6
4. Índice de Figuras.	7
5. Resumen.....	9
6. Introducción.....	11
7. Las metaloproteasas.....	14
8. Inhibidores de enzimas.....	15
9.1. Enzima convertidora de angiotensina.....	16
9.2. Inhibidores de ECA.....	18
10. La metaloproteasa elastasa B de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LasB).....	21
11. Peptidomiméticos.....	24
12. Métodos computacionales aplicados en el diseño de inhibidores enzimáticos.....	26
12.1. Docking <i>in silico</i>	26
13. Reacciones Multicomponentes.....	28
13.1. Empleo de las reacciones multicomponentes como inhibidores de metaloproteasa.....	31
14. Hipótesis.....	33
15. Metodología y herramientas.....	34
15.1. Docking <i>in silico</i> con receptor rígido.....	34
15.1.2. Docking por ajuste inducido.....	35

15.1.3. Validación de metodología.....	36
15.1.4. Análisis estructural de cristales de ECA y LasB.....	37
15.2. Procedimiento.	40
15.2.1. Estabilización de la proteína.	41
15.2.2. Procedimiento general de la reacción de Ugi-4C.....	41
16. Síntesis y caracterización de los compuestos obtenidos.....	42
17. Resultados y Discusión.....	50
17.1. Síntesis y caracterización de los Ligandos.....	50
17.2. Diseño de los peptidomiméticos.....	55
18.1. Puntajes de docking <i>in silico</i>	58
18.2. Puntajes de docking por ajuste inducido.....	59
19. Conclusiones.....	73
20. Referencias.....	78

3. Índice de tablas.

Tabla 1. Ligandos diseñados. R_x correspondiente respecto a la imagen de referencia de la reacción multicomponentes en base a la Figura 6. Las variaciones se denotan con una coma. Bn = bencilo, cPro/Pen/Hex = ciclo propano / pentano / hexano, Ac = acetilo, Pyr = pirrolidina, configuración S.

Página 57.

Tabla 2. Docking score de ligandos de la Tabla 1, condiciones descritas para cada molécula en la sección de métodos. Unidades de los puntajes en [kCal mol⁻¹].

Página 58.

Tabla 3. Puntaje de docking por ajuste inducido, de los ligandos sintetizados y de los ligandos de mejor puntaje de la Tabla 2. Unidades en [kCal mol⁻¹].

Página 58.

Tabla 4. Docking por ajuste inducido de moléculas de actividad inhibitoria conocida. Unidades de puntaje en [kCal mol⁻¹], K_i en [μmol L⁻¹]. Ligando L2_2 fue probado en cECA. Código de ligandos corresponde a lista 1 y lista 2 para cada caso como L1 y L2, con código numérico definido en la fuente por los autores. L1 y L2 ECA.^{59,60} L1 y L2 LasB.^{61,62} Omap = omapatrilat.

Página 59.

4. Índice de Figuras.

Figura 1. Algunos inhibidores de ECA reportados como principios activos de fármacos: captopril (I),¹⁹ lisinopril (II),¹³ y enalapril (III).¹⁴ Página 19.

Figura 2. a) Representación general de las interacciones de diferentes inhibidores con los sitios activos de ECA. b) Interacciones correspondientes entre lisinopril y los residuos del sitio activo de la nECA.^{22,23} Página 20.

Figura 3. A) Modelo clásico de inhibición de LasB con péptidos conteniendo grupo tiol. B) Cristal de rayos X del sitio activo de LasB, donde el átomo de Zinc se ve como una bola azul y los bolsillos S₁' y S₂' están ligados a los residuos de aminoácidos P1' y P2' respectivamente. C) Estructura del compuesto 2-mercaptoacetil-Trp-Tyr-NH₂.²⁹ Página 23.

Figura 4. Clasificaciones de peptidomiméticos.³⁴ Página 25.

Figura 5. Mapa de interacciones 2D de la molécula LaAc08_2R en el cristal 6EN5 de nECA. Página 27.

Figura 6. Representación de dos reacciones multicomponentes basadas en isonitrilos. La reacción de Passerini-3C y Ugi-4C. Página 29.

Figura 7. Propuesta del mecanismo de la reacción de Ugi-4C. Página 30.

Figura 8. Estructura de los ligandos sintetizados y rendimiento químico. Página 51.

Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C del ligando LaAc01 en CDCl_3 . Página 54.

Figura 10. Mapa de interacciones del ligando L2_13 de la **Tabla 4** para LasB. Página 65.

Figura 11. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc04 en LasB. Página 66.

Figura 12. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc06 en LasB. Página 68.

Figura 13. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc13_3R en nECA. Página 69.

Figura 14. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc08_1R en nECA. Página 70.

Figura 15. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc04 en nECA. Página 71.

5. Resumen.

En este trabajo de investigación se sintetizaron 6 peptoides *N* – alquilados siguiendo la reacción de Ugi 4 componentes, los cuales fueron analizados por técnicas como absorción espectroscópica de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C la obtención de los productos. Estos 6 peptoides fueron probados en conjunto a otros 7 ligandos (con hasta 6 variaciones cada uno) en las metaloenzimas elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa* (LasB) y la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mediante Docking *in silico* en dos variedades, de receptor rígido y receptor flexible (ajuste inducido), ambos casos considerando el ligando flexible y los parámetros de pH nativos para cada enzima.

Los resultados de síntesis se comprobaron buscando bandas de emisión/absorción específica de cada grupo presente en la molécula. En el caso de FTIR, se espera ver en el espectro, en la región de 4000 cm^{-1} la presencia de grupos amida por su banda de estiramiento a $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ y estiramiento entre C-H de grupos metilo en $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$, acompañado también (en el caso de 5 de los ligandos sintetizados) señales de absorción de estiramiento entre C=C en $\sim 1560\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$. Estos resultados confirmaron la condensación de estos reactivos en un producto único. Mientras FTIR muestra qué grupos funcionales están presentes, estos resultados no son suficientes para dilucidar la estructura de la molécula y es por esto que para los ligandos observaron *peaks* (en el caso de LaAC01 para RMN de ^{13}C) de los carbonos del anillo de piridina en la región aromática entre 150–120 ppm, el carbono cuaternario del grupo carbamato BOC en 80 ppm, junto al triplete del carbono del cloroformo y un *peak* intenso en 25,54 ppm, de los grupos metilo del grupo BOC, correspondiendo las otras señales en campo alto al anillo de ciclohexilo. Además de esto se observaron

señales duplicadas en 166 y 173 ppm, lo que indica que el producto consta de dos conformeros. Estas señales duplicadas se encontraron también en los ligandos LaAc02, LaAc05 y LaAc06.

Los 42 ligandos fueron probados por docking de receptor rígido, y de estos ligandos se tomaron aquellos de mayor puntaje en conjunto a los ligandos sintetizados para ser probados por ajuste inducido, incluyendo también ligandos con K_i conocida como omapatrilat. Los resultados de docking fueron filtrados considerando datos de patrones de interacción para cada metaloenzima, por lo que en casos de mejor puntaje es porque el ligando tuvo interacciones con una gran variedad de residuos importantes del sitio activo (además del cinc), imitando interacciones del omapatrilat en el sitio activo y con un puntaje 20% mayor. Además, debido a que se consideró la posible formación de estereoisómeros por uso de aldehídos complejos, se observó selectividad total de nECA para la conformación R del ligando LaAc12_3 y selectividad parcial a la conformación R del ligando LaAc12_1. La selectividad entre metaloenzimas se observó en 2 set de ligandos, con ligandos como LaAc12_2 y LaAc13_1 siendo las diferencias más destacadas para LasB y nECA respectivamente, mas la selectividad de LaAc12_3 para LasB es más importante que la selectividad de LaAc13_1 para nECA, por las potenciales aplicaciones de estos ligandos en pacientes inmunocomprometidos y problemas renales o cardíacos asociados a hipertensión.

6. Introducción.

La medicina tradicional ha contribuido a mejorar la calidad y esperanza de vida de la raza humana a través de miles de años, a través de los que se han desarrollado tratamientos que son relevantes incluso a día de hoy.^{1,2} Tanto la masoterapia como la acupuntura han sido utilizadas desde hace más de 3000 años, existiendo descripciones en sus libros de técnicas de masaje que pretendían atacar los demonios que provocaban las enfermedades; mientras que otros avances consistieron en el uso de plantas medicinales minerales y toxinas animales para el tratamiento de diferentes enfermedades y síntomas puntuales.^{1,2}

Estas primeras formas de tratamiento de síntomas funcionaban en la mayoría de los casos, aunque muchas veces el tratamiento de síntomas no soluciona las fuentes de las enfermedades que intentaban combatir. Muchas veces la vía de administración no era especialmente efectiva, habiendo siempre casos en los que no se mantuvo una concentración de principio activo adecuado en la ventana terapéutica, sin contar además la variabilidad no solo del tiempo en la que estos medicamentos son absorbidos, metabolizados y excretados, sino también a la cantidad o pureza de metabolito ingerido puede variar de fuente a fuente, sea esta vegetal o mineral.

Es entonces a partir del estudio de estas fuentes de sustancias capaces de combatir síntomas y enfermedades que se encontró la solución para mejorar la calidad de vida y se mejoró la esperanza de vida media de la población.

La determinación y estudio de moléculas con actividad biológica que pudieran tener efectos en la fisiología y fisiopatología surgieron de la necesidad de avanzar tanto

como por la curiosidad para saber el por qué y para qué se las civilizaciones empleaban ciertas plantas medicinales en el pasado. De estos estudios surge la química de los productos naturales (fitoquímica) con el objetivo de aislar e identificar los metabolitos secundarios o principios activos de origen vegetal. Estos principios activos (de fuente vegetal) son moléculas orgánicas que presentan una variedad de actividades biológicas, las que pueden ser de naturaleza antimicrobiana, insecticida y/o herbicida entre otros.⁴

Uno de los mayores problemas asociados al estudio de estas moléculas es la ínfima cantidad metabolitos secundarios que se pueden extraer de la matriz biológica, aunque la cantidad de metabolito obtenida puede variar dependiendo de la planta y el estado de madurez de la misma. Por esto, la síntesis orgánica de compuestos capaces de mimetizar la actividad biológica descrita ha sido la vía para resolver este problema.

Para obtener compuestos con actividad biológica existen varias estrategias, siendo algunas de estas la extracción de principios activos a partir de la fuente natural, semi síntesis a partir de compuestos aislados de fuentes naturales, síntesis de moléculas que imitan la función de un ligando de efectividad conocida (peptidomiméticos) y la síntesis total de un metabolito secundario de fuente natural. La síntesis total resulta ser un reto, pudiendo requerir muchas etapas de reacción o en algunos casos ambientes de presión y/o temperatura elevada, para los que usualmente se obtiene un rendimiento global generalmente bajo. La semi-síntesis se puede emplear siempre y cuando exista disponibilidad de moléculas estructuralmente similares, aunque una de las estrategias más empleada en la actualidad es la de sintetizar moléculas que imitan la función de ligandos de efectividad conocida.

Casos de diseño de ligandos que imitan fármacos conocidos son las varias generaciones de penicilina u otras generaciones de fármacos como los derivados del captopril. Estos ligandos son diseñados en base a los fármacos de efectividad conocida, pudiendo ser derivados estructurales iterativos como los inhibidores de betalactamasas,⁵ o ligandos diseñados buscando una mejor afinidad con el receptor como ocurre con los inhibidores de la ECA mostrados en la **Figura 1**.

La creación de estas nuevas generaciones de inhibidores surge de la generación de resistencia a los tratamientos por parte de bacterias e incluso el ser humano. Estos mecanismos pueden generarse a partir de mutaciones aleatorias, en el caso de las bacterias multirresistentes, mutaciones son transferidas a otras bacterias por procesos como conjugación (transferencia de plásmidos que contienen el material genético que codifica las enzimas mutadas) o por reproducción de la bacteria, razón por la que existen bacterias multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*. En humanos los efectos de resistencia ocurren principalmente por *upregulation*, una adaptación que ocurre como respuesta homeostática y que en el caso de la ECA el resultado del tratamiento con captopril deriva en un aumento de producción de ECA por parte de las células endoteliales en los pulmones, todo derivado de la coordinación del tiolato y el átomo de Zn^{+2} de la ECA, de carácter insoluble.

La bioinformática consiste, de manera general, en la aplicación de tecnologías computacionales y gestión de análisis de datos biológicos, disciplina que hoy es fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos. Algunas de las herramientas que permiten analizar interacciones entre moléculas han permitido definir patrones de interacción (IFD por sus siglas en inglés) que muestran los residuos con los que los inhibidores interactúan tanto como el tipo de interacción y cuántas veces estos inhibidores interactúan con esos residuos. Esta información resulta clave para el

diseño de ligandos potencialmente efectivos técnicas como docking *in silico* para el estudio de bibliotecas de ligandos con la enzima de interés.

La combinación de estudios bioinformáticos y reacciones multicomponente entrega una buena estrategia para el desarrollo de nuevos principios activos, pudiendo potencialmente derivar en la producción de tratamientos efectivos cuyos productos son obtenidos en alto rendimiento, alta economía de átomos y con el uso de solventes amigables con el medio ambiente. Esta combinación permite una mayor selectividad, eficacia y potencia de los actuales fármacos en comparación a la química tradicional basada costosas modificaciones iterativas. Por tanto, el desarrollo de líneas de investigación donde se equilibren ambas áreas del conocimiento resulta ser imprescindible para resolver problemas reales en nuestra sociedad.

7. Las metaloproteasas.

Las metaloproteasas son enzimas que catalizan la reacción química de hidrólisis en la que participa un átomo metálico.^{6,7} Se estima que aproximadamente un 40% de todas las enzimas caracterizadas en el banco de datos PDB contiene un átomo metálico (esto es, Zn^{+2} , Ca^{+2} , otros) en su estructura. Este átomo de metal puede presentarse como un catión coordinado por residuos como histidina o grupos prostéticos como Heme de la hemoglobina. Estos cationes metálicos pueden actuar como cofactores, facilitar la unión de sustrato al sitio activo, ser un centro catalítico, estabilizar la estructura proteica o facilitar cambios conformacionales en el mecanismo de reacción. Las enzimas que son catalogadas como metaloenzimas son aquellas en las que el catión metálico participa en la catálisis enzimática.^{6,7}

8. Inhibidores de enzimas.

Los inhibidores de enzimas son moléculas que interactúan con enzimas, de manera temporal o permanente y que de alguna forma previenen que la enzima catalice reacciones de forma normal. La naturaleza de los inhibidores puede variar y se pueden encontrar inhibidores compuestos de sales inorgánicas y proteínas.

Los inhibidores se pueden clasificar de 4 formas generales, siendo estas: a) Inhibidores competitivos (reversible/no reversible), inhibidores que compiten con el sustrato por el sitio activo, b) No competitivos (reversible/no reversible), que se unen al complejo enzima-sustrato, interfiriendo en el mecanismo de reacción, c) Alostéricos (reversible/no reversible), que afectan la conformación de la enzima y modifican la afinidad de la enzima por su ligando y d) Mixto (reversible/no reversible), que no se une al sitio activo al igual que un inhibidor alostérico, y que mediante esta unión disminuye la afinidad de la enzima por su sustrato.

Un inhibidor irreversible reacciona con la enzima de forma covalente y modifica su estructura (sitio activo o estructura terciaria/cuaternaria) de forma que el proceso catalítico se detiene de forma permanente. En cambio, un inhibidor reversible se une a la enzima de forma no covalente, dando lugar a diferentes tipos de interacciones.

Las enzimas están involucradas en la mayoría de las vías metabólicas, mecanismos de regulación homeostática y procesos de transcripción, donde muchas veces juegan roles esenciales en el funcionamiento de los ejes en que participan. Por esto es posible que las acciones inhibitorias de un ligando resulten en detención de vías metabólicas, alteraciones de regulación homeostática y desarrollo (en caso de

mujeres embarazadas o niños), razón por la que estos ligandos se someten a una extensa farmacovigilancia. Un trágico ejemplo de esto es la talidomida, medicamento cuyo uso en mujeres embarazadas se encuentra prohibido debido a la aparición de malformaciones congénitas.

Para que un ligando diseñado como potencial inhibidor de enzimas sea utilizado como fármaco válido para su uso en humanos, es necesario conocer sus parámetros farmacodinámicos, farmacocinéticos, toxicología y en algunos casos su especificidad con extensas y costosas pruebas *in vivo* e *in vitro*. Para esto es útil obtener descripciones exhaustivas del ligando en el sitio activo de la enzima blanco por métodos computacionales antes de proceder a pruebas *in vitro* de los mejores candidatos.

9.1. Enzima convertidora de angiotensina.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA, EC:3.4.15.1) es una metaloproteasa importante en la regulación homeostática de la presión sanguínea debido a su participación en el eje renina – angiotensina – aldosterona.⁸

Este eje hormonal puede ser activado de dos formas, la primera cuando las células yuxtaglomerulares censan un descenso en la presión sanguínea en las arteriolas aferentes (bajo volumen sanguíneo o baja concentración de sodio plasmático), y la segunda por activación del sistema nervioso simpático mediante estimulación betaadrenérgica, en ambos casos se libera la proteasa renina. La renina es una proteína de actividad aspartato proteasa, que hidroliza el pro angiotensinógeno sintetizado por el hígado generando un decapeptido conocido por angiotensina I. Este decapeptido viaja por el torrente sanguíneo y es hidrolizado nuevamente por la

ECA, presente en capilares pulmonares y células epiteliales renales.⁹ Una vez que la renina llega a la circulación sanguínea hidroliza el angiotensinógeno, una globulina plasmática, para formar angiotensina I que es posteriormente hidrolizada a angiotensina II por la ECA. La ECA presenta dos variedades principales, nECA y cECA, siendo sus funciones la conversión de angiotensina I a angiotensina II (potente vasoconstrictor) y la degradación de la bradiquinina (potente vasodilatador), para nECA y cECA respectivamente. La angiotensina II es posteriormente hidrolizada a angiotensina III y angiotensina IV, siendo la última capaz de promover la liberación de aldosterona, que provoca la absorción de sodio y agua en el riñón y aumentando el volumen de sangre por osmosis.⁸

Estas dos funciones hacen que la inhibición de la ECA sea un objetivo en el tratamiento de condiciones tales como la hipertensión, insuficiencia cardíaca, la nefropatía diabética y diabetes mellitus tipo II, pero debido a que la ECA presenta 2 variedades es importante producir ligandos selectivos a alguna variedad, ya que inhibidores no selectivos pueden inhibir las cECA y evitar sus funciones vasodilatadoras.

Tanto nECA como cECA cuentan con 2 bolsillos divididos en 2 secciones cada uno (S_1 , S_2 , S_1' y S_2'), los cuales se encuentran separados por el átomo de Zn^{+2} (**Figura 2, A**), y a pesar de ambos dominios presentan un sitio activo similar con los mismos residuos en una disposición espacial similar, pero en una estructura primaria diferente, el procesamiento y las interacciones con el ligando se manifiestan de forma totalmente diferentes. Como nECA se encarga de catalizar la producción del péptido vasoactivo Angiotensina II, los inhibidores altamente selectivos para nECA tendrían el potencial para controlar eficazmente la presión arterial y reducir los efectos secundarios relacionados con vasodilatadores sin afectar las funciones de la cECA y su función vasodilatadora.

La nECA hidroliza cuatro péptidos fisiológicamente importantes: hormona luteinizante (GnRH), angiotensina 1, péptido beta amiloide (A-Beta42), y el N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP, inhibidor de hematopoyesis). La contribución de la ACE al metabolismo *in vivo* de los tres primeros péptidos es desconocida, pero se conoce que es la principal enzima que metaboliza el tetra péptido AcSDKP el cual es conocido por su capacidad de detener la diferenciación del sistema hematopoyética en tejido medular.

9.2. Inhibidores de ECA.

Algunos inhibidores de la ECA (Figura 1 y 2) fueron derivados de las interacciones del factor potenciador de bradiquinina presente en el veneno de la serpiente *Bothrops jararacá*, endémica de Brasil, Paraguay y Argentina.¹⁵ De este veneno fue posible obtener una proteína proinflamatoria y vasodilatadora de abundancia relativa igual al 1,4% en peso del pool proteico.¹⁶ Gracias al estudio de las propiedades sedantes de esta toxina realizado por Laureato Nobel Sir John Vane, otros investigadores diseñaron y sintetizaron una serie de inhibidores selectivos a la ECA.

La primera generación de inhibidores de ECA fue diseñada a finales de la década del 70 por Ondetti y Cushman.¹⁷ Para esto formularon un modelo hipotético de ECA, donde asumieron que se comportaba y tenía un sitio catalítico similar a la carboxipeptidasa A (CPA), de la cual ya se conocía en la época su estructura cristalina y era por lo tanto una buena comparación.

También, se apoyaron en el diseño de inhibidores similares a la mezcla de péptidos, extraídos del veneno de la serpiente previamente mencionada.¹⁶ Un estudio posterior

de la relación estructura – actividad de esta mezcla de péptidos permitió definir que la secuencia de los aminoácidos Phe-Ala-Pro era la más selectiva a cECA en los bolsillos S₁, S₁' y S₂'.

Mediante esta observación, Cushman y Ondetti diseñaron péptidos similares, pero con el grupo funcional tiol para ligar potentemente al ion Zn²⁺, dando lugar al inhibidor captopril con IC₅₀ de 23nM (Figura 1).^{17,18} Como se observa en la **Figura 2A**, el captopril no utiliza los bolsillos S₁ y S₂, y por ende, no es selectiva para estos dos dominios. Posteriormente, análogos de dipéptidos que contienen un grupo carboxilato para coordinar el metal fueron sintetizados.¹³

Para lograr obtener interacciones con estos bolsillos S₁ y S₂ emplearon la fórmula general R-CH(CO₂H)-A₁-A₂, donde el grupo R es BnCH₂- ocuparía el bolsillo S₁ y la secuencia A₁-A₂ correspondería a Ala-Pro y Lys-Pro, siendo estos nuevos ligandos enalapril y lisinopril, respectivamente.

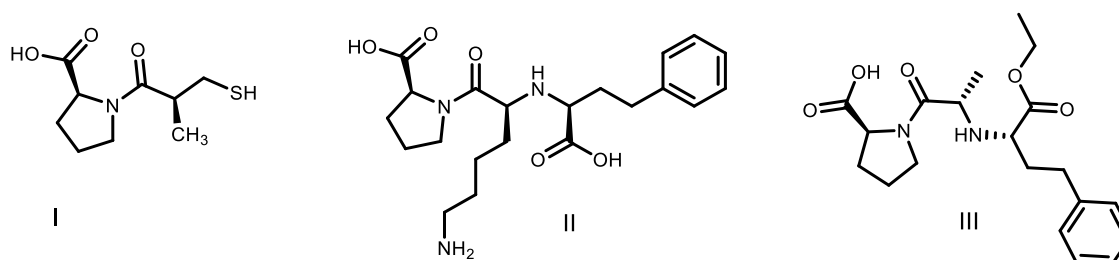


Figura 1. Algunos inhibidores de ECA reportados como principios activos de fármacos: captopril (I),¹⁹ lisinopril (II),¹³ y enalapril (III).¹⁴

A pesar de la alta afinidad de estos inhibidores, la selectividad por una de las variedades (nECA o cECA) resultó importante para dar paso a la segunda generación de inhibidores de ECA. La cadena lateral de lisina en el lisinopril proporcionó mejores interacciones con el bolsillo S₁' (Figura 2 B)¹⁷, adicionalmente, enlaces de hidrógeno con el residuo fue selectivo para nECA (K_i de 2nM).^{20,21} Estudios de relación estructura-actividad mostraron que la selectividad por nECA se debe en parte al grupo amida del extremo C-terminal del ligando, al grupo carboxilato libre del aminoácido aspártico y al residuo *N*-acetilado (Figura 2 A). El co-cristal de RXP407 con nECA mostró que las interacciones del residuo aspártico del inhibidor con los residuos Ala334, Tyr369 y Arg381 son las más importantes a la hora de la selectividad.

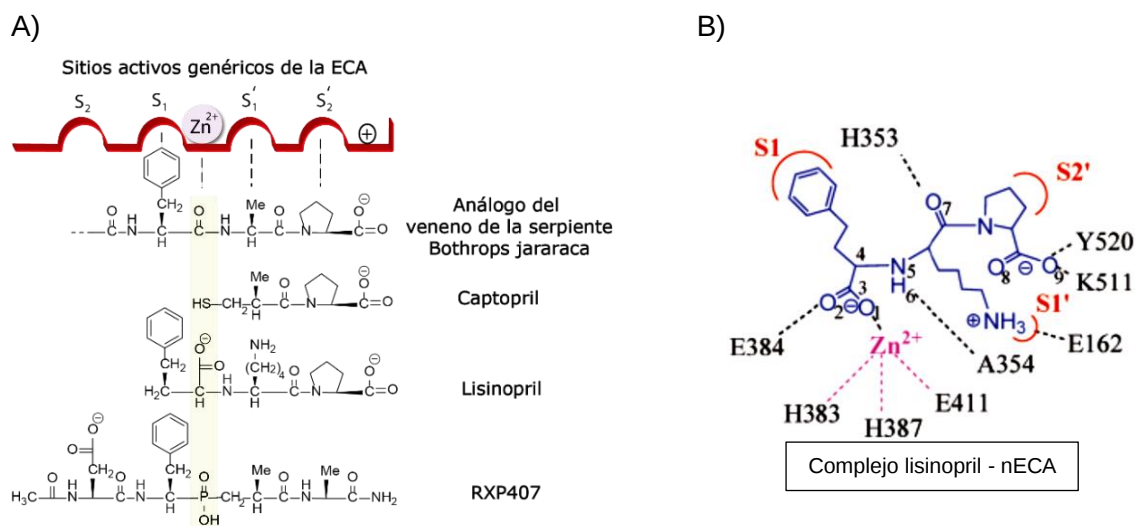


Figura 2. a) Representación general de las interacciones de diferentes inhibidores con los sitios activos de ECA. b) Interacciones correspondientes entre lisinopril y los residuos del sitio activo de la nECA.^{22,23}

Douglas y colaboradores tomaron estas observaciones y realizaron una búsqueda de nuevos fragmentos sobre la estructura del inhibidor RXP407. Mediante la utilización de dos métodos (SHOP y GRID) de modelaje molecular exploratorio pudieron identificar y sintetizar el inhibidor 33RE, el cual resultó ser 1000 veces más selectivo para nECA que para cECA. Este método inicial de búsqueda estructural les proporcionó que la incorporación de un grupo tetrazol en lugar de un residuo aspártico como en RXP407 era una modificación factible. Lamentablemente el rendimiento de del peptidomimético 33RE fue reducido debido a una síntesis lineal de 6 pasos, cada uno acompañado de una serie de purificaciones cromatográficas tediosas.²⁴

El desarrollo de inhibidores altamente selectivos a nECA permitirá el tratamiento para enfermedades cardíacas como angina o infartos tanto como para prevenirlos, de ahí la clasificación de inhibidores de ECA como captopril como un cardioprotector. Por lo tanto, es importante que el diseño racional de nuevos inhibidores esté dirigidos a una alta selectividad de cada dominio para así contribuir a la creación de una nueva generación de inhibidores de ECA.^{10, 11, 12}

10. La metaloproteasa elastasa B de *Pseudomonas aeruginosa* (LasB).

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram negativa multirresistente a antibióticos, clasificada junto a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* como provocadora de enfermedades nosocomiales, lista utilizada en programas de salud pública para recopilar información a la sensibilidad de antimicrobianos como esfuerzo para disminuir la recurrencia de estas infecciones. Las enfermedades nosocomiales son procesos de infección adquiridos durante la estadía o atención en servicios de la salud y son un gran problema global por su impacto social y económico. A pesar de

la necesidad de encontrar vías para controlar la acción de estos patógenos, el diseño racional dirigido a la búsqueda de antimicrobianos selectivos a un determinado patógeno no ha sido altamente explorado.

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gran negativa y patógeno oportunista, responsable de muchas infecciones nosocomiales y que infecta a los pulmones, las vías respiratorias y urinarias y tejidos blandos, pudiendo en todos estos casos derivar en sepsis. Uno de los factores de virulencia que libera esta bacteria es la metaloproteasa elastasa B (LasB), la cual es clave en procesos de colonización de superficies y la síntesis de alginato para la formación de biopelículas.^{27,28}

Antiguamente, el desarrollo de antimicrobianos estaba dirigido a la síntesis de compuestos que causan la muerte de las células (penicilina provoca la muerte por desequilibrio osmótico al prevenir la formación de la pared celular, por ejemplo), mientras que en la actualidad la gran mayoría de investigaciones se dirigen a la búsqueda de antimicrobianos enfocados a prevenir las acciones de los factores de virulencia.^{25,26}

Uno de los muchos factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa* es la elastasa B (LasB, EC: 3.4.24.26) o LasB, metaloenzima que consta de 301 aminoácidos y usa como cofactor un Zn^{2+} al igual que ECA. En su estructura prevalecen las hojas plegadas β antiparalelas en el extremo amino terminal, mientras su extremo carboxilo terminal se conforma de en α -hélices. Su sitio activo no es de gran magnitud, donde el cofactor (catión Zn^{2+}) tiene a su alrededor a los residuos His140, His144 y Glu164 y se encuentra expuesto al solvente, a diferencia del sitio activo de la ECA. El sitio activo tiene dos bolsillos hidrofóbicos, S_1' y S_2' (**Figura 3 A**), de diferentes tamaños.

En la literatura podemos encontrar algunos cristales caracterizados por cristalografía de rayos X de pares enzima-inhibidor de LasB como el cristal 3DBK, que usa el inhibidor fosforamidón. Esto constituye una herramienta importante para el diseño de nuevas moléculas que sean capaces de modular la actividad de esta enzima, gracias a estudios de patrones de interacción de otros inhibidores con la metaloproteasa. Además, cabe destacar que la mayoría de los inhibidores de LasB descritos son basados en compuestos derivados de péptidos. En varias publicaciones científicas se reportan familias de compuestos sintetizadas y evaluadas como inhibidores de la LasB, entre los cuales destaca el estudio de una serie de péptidos con diferentes grupos funcionales capaces de interactuar con el catión Zn^{2+} del sitio activo de LasB. Ejemplo de esto es el péptido de secuencia $HONH-CO-CH-(CH_2C_6H_5)-CO-Ala-Gly-NH_2$ con un grupo hidroxámico ($HONH-CO$) en el extremo *N*-terminal, el cual presentó mejor actividad con una K_i 44 nM.^{28,29,30,31}

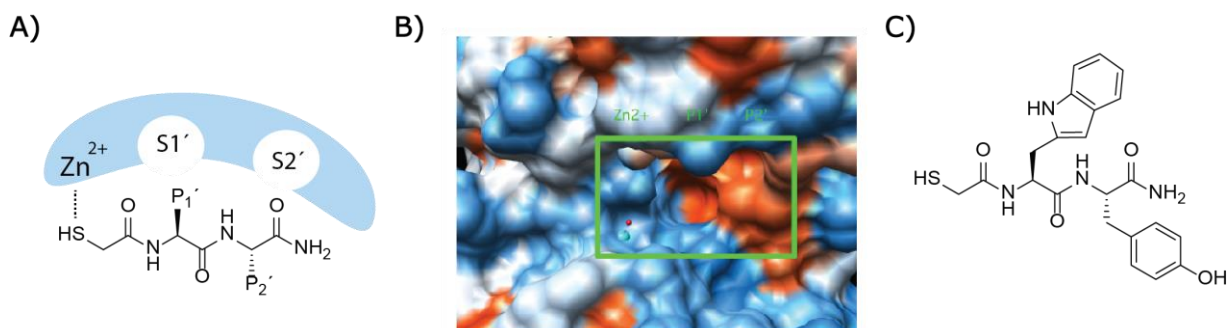


Figura 3. A) Modelo clásico de inhibición de LasB con péptidos conteniendo grupo tiol. B) Cristal de rayos X del sitio activo de LasB, donde el átomo de Zinc se ve como una bola azul y los bolsillos $S1'$ y $S2'$ están ligados a los residuos de aminoácidos $P1'$ y $P2'$ respectivamente. C) Estructura del compuesto 2-mercaptoacetil-Trp-Tyr-NH₂.²⁹

En este mismo contexto, Morihara y Tsuzuki determinaron que la presencia de grupos voluminosos en la estructura de los inhibidores hace que el ligando se acomode mejor al bolsillo S₁' del sitio activo de la LasB.³⁰ Otros, investigadores determinaron que la estereoespecificidad es importante para los inhibidores de LasB.²⁹ Por ejemplo el dipéptido 2-mercaptoacetil-L-Leu-L-Phe y su análogo 2-mercaptoacetil-L-Leu-D-Phe, cuya única diferencia va en la configuración del centro quiral de la fenilalanina, resultaron tener valores de K_i muy diferentes (1.5 μM y 34 μM respectivamente), factor a considerar al diseñar ligandos en base a una reacción con un centro estereogénico como la reacción Ugi 4 componentes.

Cathcart y colaboradores reportaron la síntesis de varios dipéptidos cuya estructura son derivadas de la *N*-mercaptoamidas. Estos dipéptidos presentaban una diversidad estructural de la cadena peptídica con el objetivo de estudiar la relación estructura-actividad en el bolsillo profundo S₁' de LasB. De este estudio se obtuvo que los aminoácidos con grupos voluminosos mostraban selectividad por el bolsillo S₁' del sitio activo de LasB.^{32,33}

11. Peptidomiméticos.

Los peptidomiméticos son compuestos que mimetizan la actividad biológica de péptidos. Estos compuestos, no necesariamente tienen que contener una estructura similar a la de los péptidos. No obstante, en la literatura encontramos muchos estudios donde se pueden describir a los peptidomiméticos por sus efectos y estructura en 4 categorías, las que son: a) péptidos modificados, b) foldámeros, c) de similitud estructural, y e) imitación del mecanismo de acción (**Figura 4**).^{34,35}

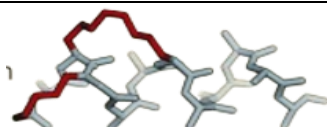
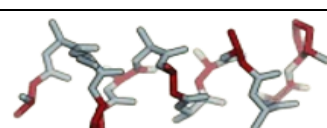
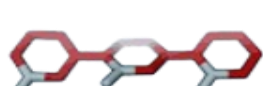
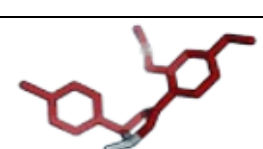
Clasificación de peptidomiméticos	
Clase A	
Clase B	
Clase C	
Clase D	

Figura 4. Clasificaciones de peptidomiméticos.³⁴

Tomando como ejemplo los actuales inhibidores de ECA, aquellos inhibidores diseñados a posteriori que buscaban imitar las interacciones de estos inhibidores se denominan peptidomiméticos.

Ya que estas moléculas imitan la función de otros péptidos (como el captopril imita un péptido del veneno de *B. jararacá*), pudiendo estas interacciones basarse en una sección de estructura o interacciones que potencialmente se pueden alcanzar por este péptido en un conglomerado de estructuras (ya que el péptido no posee una única posición en el sitio activo), los peptidomiméticos pueden contener aminoácidos (L o D aa. o β aminoácidos), glúcidos, ésteres en vez de amidas, *N*-alquilaciones,

cadenas alifáticas, o grupos como fosfonatos, como los ligandos de la **Figura 2** y **Figura 3**.

12. Métodos computacionales aplicados en el diseño de inhibidores enzimáticos.

El diseño racional consiste en encontrar ligandos con potenciales efectos biológicos en base a las interacciones que presenta este ligando con la proteína de interés. En el caso de las metaloenzimas, un ligando debe poder interactuar con residuos del sitio activo (en el caso de docking *in silico*) de una forma similar a otros inhibidores, es decir, diseñar un ligando que presente interacciones en el sitio activo de la enzima de la misma forma que otros inhibidores de actividad conocida en base a la estructura de los cristales publicados. Una opción para el diseño racional, aunque poco confiable, es el uso de farmacóforos, que son una estructura tipo molde obtenida del análisis estructural de un par enzima-substrato, este mapa describe la forma y posición de grupos funcionales necesarios en una molécula para mantener interacciones con el sitio activo; mientras que la mejor opción es el uso de herramientas como docking *in silico* y estudios de patrones de interacción de inhibidores como guía para filtrar las poses, lo que se define como *constraints* o 'limitaciones' en el programa de docking.

12.1. Docking *in silico*.

Docking *in silico* es una técnica relativamente simple que se emplea con el fin de estudiar las distintas interacciones que se presentan de un ligando y el sitio activo de una proteína.

Los resultados obtenidos de docking presentan la interacción más estable entre ligando (flexible) y enzima (rígido o flexible). Se obtienen poses en el sitio activo de la enzima, así como el mapa de interacciones entre las partes del ligando y los residuos del sitio activo. A modo de ejemplo, en la **Figura 5** se muestra las interacciones de la molécula LaAc08 en el cristal 6EN5 de nECA que se obtienen después de realizar un Docking *in silico*. La cantidad de poses obtenidas en un Docking es modificable y estas a su vez dependen de los parámetros designados como el pH y si este ligando posee tautómeros y formas resonantes, en tal caso las poses obtenidas tendrán diferencias por pKa, rotaciones y traslaciones dentro del sitio activo.

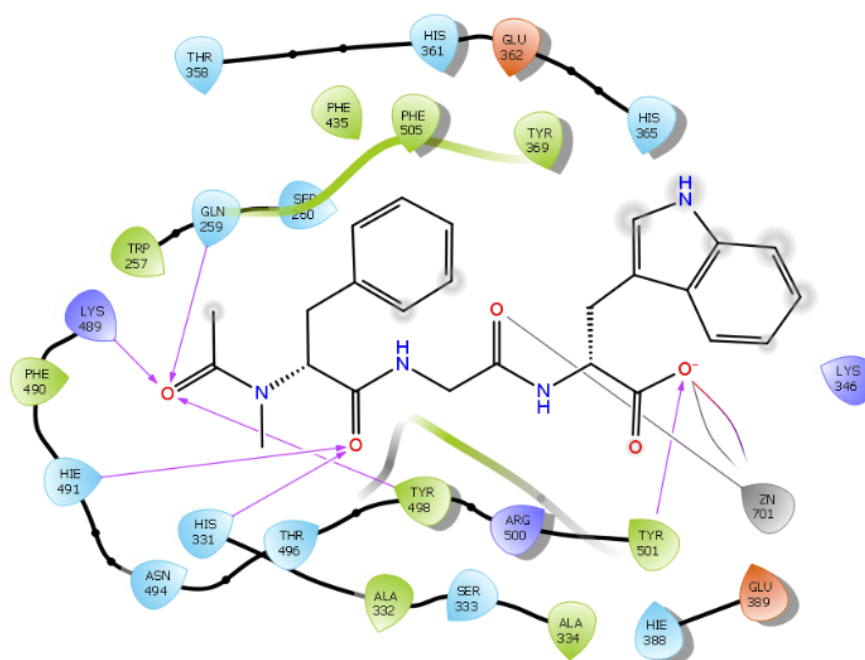


Figura 5. Mapa de interacciones 2D de la molécula LaAc08_2R en el cristal 6EN5 de nECA.

Estos datos son importantes al momento de seleccionar candidatos con potencial actividad inhibitoria para su posterior obtención por vías sintéticas. Para esto, se comprarán las interacciones con un ligando previamente reportado.

Para el procedimiento de docking se requiere tener el par proteína-inhibidor estabilizado al pH nativo (7.4 para la ECA, pH fisiológico), optimizar la estructura a este pH y designar una caja alrededor del sitio activo (definida alrededor del inhibidor, siendo este el ligando diprolilo para el cristal 6EN5, por ejemplo). La simulación se lleva a cabo en el interior de un cubo 15x15 Å, volumen definido por el espacio ocupado por el ligando en el cristal, siendo este el sitio activo de la enzima (por fines prácticos), donde el programa prueba poses de una biblioteca de ligandos. En el caso de docking *in silico* de receptor rígido o flexible se ignora la posibilidad de que los ligandos puedan interactuar de forma más estable con algún otro sitio alostérico, todo esto limitado por la caja definida

13. Reacciones Multicomponentes.

Las reacciones multicomponentes (RMCs) son conocidas por su gran versatilidad y eficiencia. En estas reacciones 3 o más componentes reaccionan para generar un único producto. Por tanto, estos productos obtenidos por las RMCs contienen en su estructura la mayor cantidad de átomos presentes en los materiales de partida, lo cual son reconocidos por su elevada economía de átomos, un tema importante para las industrias químicas.

Una de las primeras RMCs descritas fue la síntesis Strecker empleada para la obtención de aminoácidos (AA).³⁶ El químico alemán Adolph Strecker diseñó esta

reacción en el año 1850 con el objetivo de obtener asimétricamente AA de configuración L.³⁷

Existen otros métodos para sintetizar péptidos. Una de estas técnicas es la síntesis de polipéptidos en fase sólida, los que generan acoplamiento entre 2 aminoácidos con un rendimiento generalmente bajo para la formación de un enlace peptídico. Esta reacción es, en principio, simple, pero requiere de ciertos agentes de acoplamientos y en general de solventes no amigables con el medio ambiente, además de que generan muchos residuos por los excesos de reactantes requeridos para un rendimiento útil. Desde entonces otras variantes de síntesis de péptidos se han estudiado para prevenir la generación de residuos. Una de estas técnicas son las RMCs basadas en un grupo funcional conocido como isonitrilo.³⁸ En 1921, Passerini describe la síntesis de depsipéptidos (ver Figura 6) mediante el empleo de un ácido carboxílico, un aldehído y un isonitrilo (un grupo funcional isómero del nitrilo).^{39,40,41}

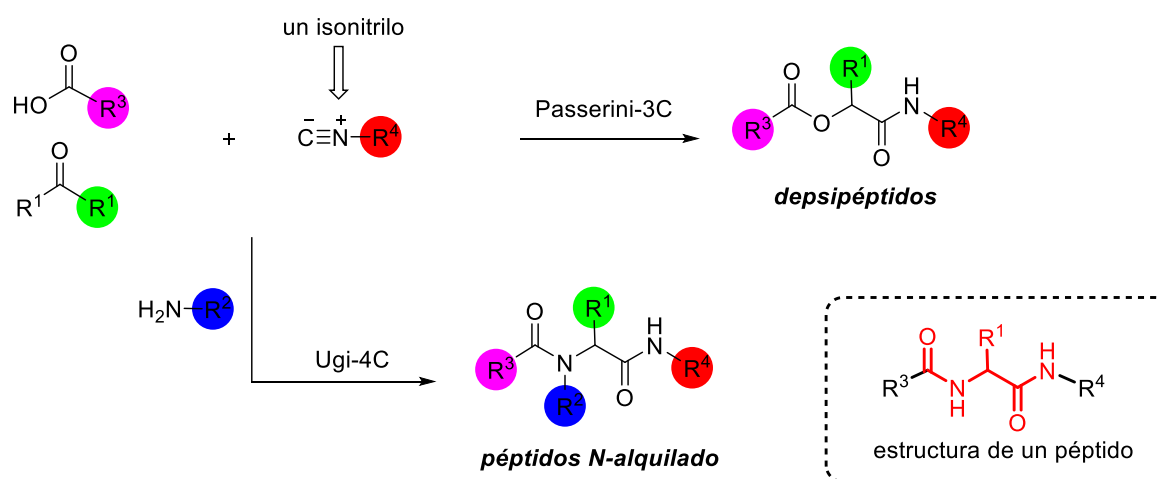


Figura 6. Representación de dos reacciones multicomponentes basadas en isonitrilos. La reacción de Passerini-3C y Ugi-4C.

Sin lugar a dudas, la reacción de Passerini-3C fue una de las más revolucionarias en el área de la síntesis de péptidos. Sin la necesidad de utilizar otros agentes se pudo obtener un solo compuesto que incorporaba todos los átomos de los materiales de partida. Años después, Ivar Ugi descubrió que al adicionar un cuarto componente (una amina) en la descrita reacción de Passerini-3C se obtienen péptidos *N*-alquilados (Figura 6).⁴²

El mecanismo de la reacción de Ugi-4C con isonitrilos se puede explicar utilizando el la **Figura 7**. El primer paso es la formación de la imina por reacción de la amina y el componente oxo (aldehído o cetona). Posteriormente, la imina formada es protonada por el ácido carboxílico (paso 2), formando un par iónico. La imina protonada es atacada por el isonitrilo el cuál a su vez es atacado por base conjugada del ácido carboxílico (paso 3).

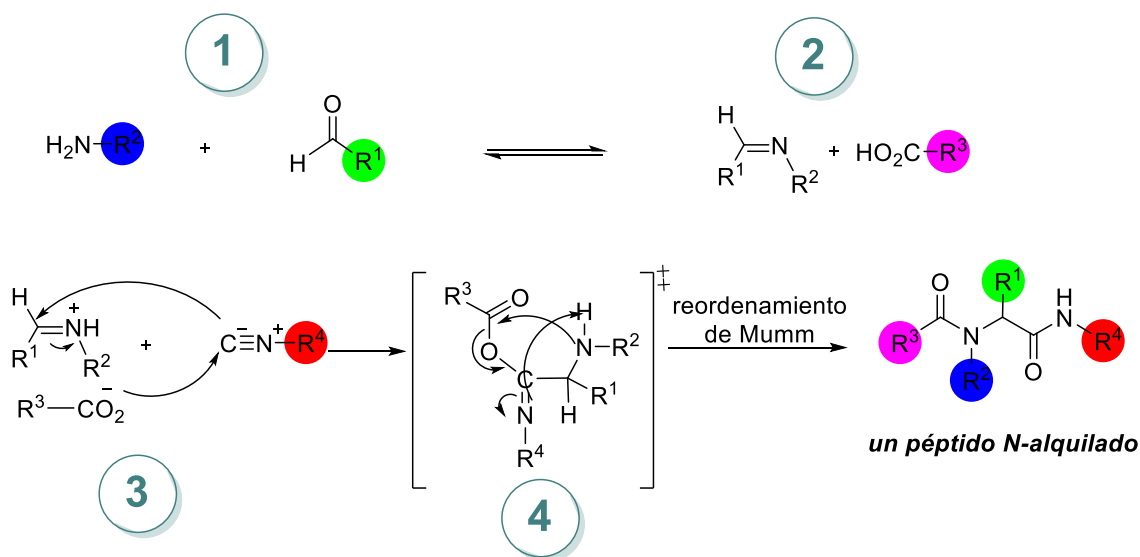


Figura 7. Propuesta del mecanismo de la reacción de Ugi-4C.

Esto demuestra que el grupo funcional isonitrilo presenta propiedades anfotéricas respecto a su reactividad ácido/base, pudiendo presentar características de nucleófilo tanto como de electrófilo. Finalmente, en el paso 4 se produce el reordenamiento de Mumm quien permite obtener el péptido N-alquilado como se muestra en la **Figura 6** y **Figura 7**.

Esta reacción no solo se puede emplear en la síntesis de péptidos N-alquilados sino también en la síntesis de péptidos si se utiliza amoníaco como grupo amino en la reacción o aldehídos capaces de producir escisión mediante fotólisis.⁴³

13.1. Empleo de las reacciones multicomponentes como inhibidores de metaloproteasa.

En la actualidad existen pocos reportes en la literatura donde se apliquen las reacciones multicomponente para la obtención de inhibidores de metaloproteasas.^{44,45,46,47} Uno de los reportes se inspira en las estructuras de compuestos naturales conocidos como Bestatina y Actinonina, donde los autores reportaron el empleo de las reacciones de Ugi cuatro componentes y Ugi cinco componentes para la obtención de una serie de peptidomiméticos como inhibidores de las metaloenzimas metalo-aminopeptidasa neutral de *E. coli* (ePepN por sus siglas en inglés) y la metalo-aminopeptidasa de corteza renal porcina (pAPN por sus siglas en inglés).⁴⁴ Por otra parte, Alexander Dömling y colaboradores⁴⁵ sintetizaron análogos del producto natural aspergillamide empleando la reacción de Ugi-4C, a los cuales se les evaluó la actividad citotóxica frente a la línea celular MCF-7 (cáncer de mamas) y antibiótica contra *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*. La combinación de la reacción Ugi y posterior formación de el heterociclo tetrazol fue reportada con el fin de sintetizar algunos derivados quinolínicos-tetrazol y además evaluarlos contra 'chloroquine-resistant K1- and W2' del patógeno *P. falciparum*.⁴⁶

Recientemente, se reporta un artículo donde se sintetizan, mediante la reacción de Ugi-4C, una serie de péptidos *N*-alquilados conteniendo como estructura base Gly-Phe. Estos peptidomiméticos demostraron presentar moderada actividad inhibitoria contra la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y muy baja actividad frente a la butirilcolinesterasa (BuChE).⁴⁷

Como es de notar, pocos son los reportes encontrados para su aplicación como inhibidores de metaloproteasas, específicamente para la evaluación contra ECA y LasB. Considerando esto y los antecedentes descritos anteriormente sobre inhibidores de metaloproteasa, se propone en este trabajo diseñar, analizar (estudio computacional) y sintetizar (reacción de Ugi-4C) algunos peptidomiméticos capaces de cumplir con esta función.

Conociendo estos precedentes del uso de reacciones multicomponentes para la síntesis de moléculas con actividad biológica y teniendo a disposición herramientas de docking y acceso a estudios de patrones de interacción de las metaloproteasas de interés, planteamos la siguiente hipótesis

14. Hipótesis.

Es posible diseñar (métodos computacionales) y sintetizar (métodos químicos) peptidomiméticos basados en reacciones multicomponentes con potenciales propiedades inhibitorias de metaloproteasas.

Para comprobar la hipótesis antes mencionada proponemos el siguiente objetivo general: Diseñar y sintetizar una serie de peptidomiméticos con potenciales propiedades inhibitorias de las metaloproteasas Enzima convertidora de Angiotensina y *Pseudomona* elastasa.

Para cumplir este objetivo se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar una serie de peptidomiméticos y determinar sus interacciones en el sitio activo de las metaloproteasas mediante el uso de la herramienta computacional docking *in silico*.
2. Sintetizar mediante la reacción de Ugi cuatro componentes una serie de peptidomiméticos como potenciales inhibidores de las metaloproteasas ECA y LasB.
3. Caracterizar los productos obtenidos mediante las diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas conocidas (FTIR, RMN de ^1H y ^{13}C).

15. Metodología y herramientas.

15.1. Docking *in silico* con receptor rígido.

El procedimiento de docking entrega resultados fácilmente reproducibles en diferentes sistemas al utilizar el mismo par enzima-ligando y los mismos parámetros. Para cada molécula probada se utilizaron los mismos parámetros por enzima. La calidad de estos resultados depende de varios factores, los cuales tienen que ser estudiados previamente para poder definir correctamente estos parámetros para obtener resultados útiles para cada enzima (parafraseo, descripción de *glide*) .

El programa MaestroTM, versión 12.5, (revisión 53119, schrodinger.com/downloads) facilita la configuración de los parámetros con una amplia descripción de las funciones en sus foros y tutoriales incluidos. En este programa se pueden diseñar bibliotecas en base a una reacción específica en la que se varían los reactantes con modificaciones covalentes, pudiendo esta biblioteca ser probada con niveles crecientes de especificidad y complejidad.

Para evitar obtener poses irrelevantes -y de paso disminuir el tiempo de los cálculos- hay que acudir a la literatura y las fuentes de los cristales utilizados, buscando repetir con los ligandos diseñados aquellos patrones de interacción observados en los cristales en que se hace el docking.^{48,49}

Encontrar ligandos prometedores por métodos computacionales de baja precisión como docking no es un signo de éxito o del descubrimiento de un inhibidor milagroso,

pero métodos como docking por ajuste inducido, dinámica molecular y QCMD pueden ayudar a reducir la cantidad de ligandos potencialmente bioactivos, que puedan finalmente ser sintetizados y utilizados en pruebas de actividad biológica.

El procedimiento de Docking de receptor rígido toma el ligando preparado (en su forma de mínima energía calculada al pH de interés) y prueba poses del mismo en un archivo previamente preparado definido como *grid*, generado por el usuario y definido como una caja que encierra a un inhibidor previamente dentro de la enzima en la estructura cristalina. El programa toma un modelo flexible del ligando y prueba poses de este dentro de este bolsillo definido, buscando así poses cuya energía sea mínima (entre enzima y ligando, diferente a la pose de menor energía calculada por *ligprep*, calculado en vacío) y posteriormente calcula el puntaje de docking comparando la diferencia de energía entre la pose de menor energía utilizada y la obtenida.

15.1.2. Docking por ajuste inducido.

El docking por ajuste inducido posee diferencias y similitudes con el procedimiento de docking normal. Para el procedimiento se requiere tener la proteína estabilizada al pH de su funcionamiento y la energía de la estructura se minimiza con OPLS3e. Esta conformación de baja energía es la que se utiliza para los estudios de modelación.

A diferencia de los procedimientos de docking de receptor rígido, el procedimiento de docking por ajuste inducido genera la caja de docking *in situ* (en vez de generar un archivo), centrada en el inhibidor presente en el cristal. Una vez seleccionadas las

poses del ligando a probar en el *workspace*, se selecciona la estructura de la enzima de energía minimizada y se definen las *constraints* o filtros excluyentes, los cuales se deben definir dentro del *grid*.

Esto presenta diferencias tanto en los puntajes como en la forma en la que se presentan los resultados, ya que el output de docking por ajuste inducido son una cantidad definida de poses con la proteína completa (solo son visibles los residuos con los que se interacciona) con el ligando en el sitio de interés. Los resultados de ambas pruebas entregan puntajes glide, una función empírica que evalúa las interacciones (electrostáticas o Van der Waals, por ejemplo) y entrega un valor aproximado de energía libre del par enzima - ligando. Como ejemplo, el análisis estructural de diferentes complejos de ECA con diferentes inhibidores revela la incidencia de 4 residuos estabilizadores, los cuales tienden a sujetar el inhibidor en posiciones clave.^{48,49} Las poses de ambos métodos pueden ser limitadas mediante el uso de filtros excluyentes, por ejemplo definiendo los protones de un residuo como dadores de enlace de hidrógeno. La aplicación de filtros excluyentes es más efectiva en docking de receptor rígido porque las interacciones definidas como limitantes no cambian su posición espacial, a diferencia de docking por receptor flexible donde definir un filtro puede derivar en la ausencia de poses del ligando en el receptor.

15.1.3. Validación de metodología.

Ambos métodos se validaron utilizando los mismos inhibidores presentes en los cristales estudiados, siendo estos el diprolilo del cristal 6EN5 de nECA y el fosforamidón para el cristal 3DBK de LasB. Para esta validación se buscó en los resultados las poses obtenidas con y sin limitaciones, esperando que estas fueran similares a las presentadas en la estructura original sin preparar ni modificar.

El resultado de esta validación se presenta como RMSD, un valor asociado a la desviación de posición (medido en angstrom) comparando la pose obtenida con el cristal original, siendo estos valores 2.768 angstrom para el inhibidor fosforamidón del cristal 3DBK de LasB y 0.082 angstrom para el inhibidor diprolilo del cristal 6EN5 de nECA.

15.1.4. Análisis estructural de cristales de ECA y LasB.

Para poder filtrar entre las poses obtenidas y distinguir qué ligandos entregan poses útiles o resultados correctos es necesario definir filtros excluyentes. Estos filtros son elegidos en base a estudios de patrones de interacción, los cuales son resultado del análisis de patrones de interacción de pares enzima-inhibidor de cristales disponibles de la enzima de interés.

El estudio de patrones de interacción de ligandos de eficacia conocida permite definir filtros exclusivos que acortan la selección de poses útiles resultado del docking. Estos filtros limitan las poses en base interacciones con partes del sitio activo implicados en la catálisis o reconocimiento de sustrato (puentes de hidrógeno con residuos que reconocen sustrato o coordinación con el catión cinc). Por ejemplo, si se consideraran solo los puntajes sin aplicar filtros excluyentes, este ligando podría ser desplazado del sitio activo por el sustrato de la enzima, el cual se encuentra generalmente en mayor concentración tanto para LasB como para nECA. Por ejemplo, inhibidores pequeños como LaAc01 pueden interactuar con el cinc y se estabilizan con la 'pinza' de histidinas H331 y H591 en nECA, pero no con otros residuos importantes y por lo tanto se descartan varias poses, aunque hay casos como el

captopril, uno de los medicamentos más vendidos en el mundo y tampoco cumple con las 4 limitaciones en la mayoría de las poses aunque compensa con la coordinación entre su tiolato y el átomo Zn^{+2} de alta estabilidad y bajo Kps.

Debido a que existen 2 variedades de ECA capaces de hidrolizar la angiotensina I, los patrones de ambas enzimas se estudian juntas [cuando se comparan dos residuos importantes con un / es debido a que corresponden a los aminoácidos de nECA y cECA, respectivamente, teniendo numeraciones diferentes]. En el caso de los cristales 6EN5, 6H5X y 6H5W se observan patrones de repetición en los aminoácidos estabilizando el ligando. Además de la importancia de la interacción entre el ligando y el catión Zn^{+2} (importante en captopril y omapatrilat por la gran estabilidad del enlace tiolato- Zn^{+2}), existen interacciones que se mantienen en todos los ligandos observados por cristalografía, siendo las más importantes para filtrar las poses la Ala334/Ala356 (NH-aceptor), His331-353/His491-513 (NH-aceptor y Lys489/Lys511 (NH-aceptor). El uso de filtros se ve limitado a 4 interacciones, y debido a la corta distancia entre varios de los aminoácidos clave (K489/K511, Q259/Q281 e Y498/Y520 son residuos cercanos entre sí y cualquier interacción entre el ligando y alguno de estos aminoácidos garantiza una distancia de corta con cualquiera de los otros, lo mismo con H331-353/H491-513). Para nECA elegimos filtrar por interacciones de aceptores de enlaces de hidrógeno por Ala334, His331, K489 y Zn^{+2} , pidiendo que se cumpliera con un mínimo 3 de estas interacciones por la distancia de estos residuos entre sí. Además de esto, cualquier pose que cumpliera con al menos 3 de estas limitaciones, las cuales son seleccionadas posterior al docking, era una variedad de alguna de las otras posibles combinaciones de limitaciones con un par de grados de giro en un enlace sigma, por ejemplo.^{48,49}

El análisis de cristales de LasB con diferentes inhibidores revela en los patrones de interacción los residuos prevalentes, los cuales también fueron considerados para el

docking con el objetivo de limitar la cantidad de posibles respuestas del algoritmo. Debido a que el sitio activo de LasB es más pequeño, se utilizó como *constraint* los residuos que presentaban la interacción en el mapa de interacciones de ajuste inducido del fosforamidón, siendo estos prevalentemente N112, A113 y R198, considerando además el átomo Zn^{+2} como el cuarto filtro. Estos residuos son también encontrados en el análisis estructural de LasB antes citado.^{48,49}

El uso del grupo funcional fosfonato parece entregar poses de mejor puntaje y los ligandos cumplen con todos los filtros excluyentes, además de ser novedosos para el diseño de inhibidores de ECA, ya que gran parte de los peptidomiméticos diseñados para la inhibición de ECA son derivados de péptidos o peptoides como en la **Figura 1**.

Además de calcular el valor RMSD como validación, se hizo docking de ajuste inducido en una lista de ligandos de efectividad conocida, para poder extrapolar de alguna forma los resultados obtenidos sin haber probado su actividad biológica.

Utilizar cualquier pose solamente basado en los puntajes no es confiable, incluso en los casos en que los puntajes de docking y Glide igualan o superan aquellos entregados por docking de la molécula original del cristal. El hecho de utilizar un método en donde la presencia del ligando no afecta la forma del sitio activo niega una parte importante de los postulados de Koshland en 1958, convirtiendo estos resultados en apuestas mal fundadas.⁵⁰

15.2. Procedimiento.

Se descarga el archivo de formato .pdb del par enzima-inhibidor directamente en el programa Maestro. El procedimiento es similar para ambas metaloenzimas, la única diferencia es que para el cristal 6EN5 de nECA, un tetrámero con inhibidor diprolilo, se deben eliminar las subunidades B – G, incluyendo los ligandos, agua, solventes del proceso de cristalización e iones para quedar con la subunidad A y su correspondiente inhibidor.

El ahora monómero es procesado con la herramienta protein preparation wizard, la cual le asigna carga dependiendo del pH definido por el usuario, en este caso a pH 7.4 ± 0.5 (Epik v4.0) y se le asignaron enlaces de orden 0 a los cationes quelados. La energía de la estructura del monómero fue minimizada con el campo de fuerza OPLS3. El procedimiento para la elastasa B de *P. aeruginosa* fue idéntico, excepto que para asignar las cargas parciales con Epik se utilizó un pH de 5.6 ± 0.6 unidades de pH.

Para el procedimiento de docking de receptor rígido se definió el sitio activo como una caja de 16 Å alrededor del inhibidor, de forma que se prueben ligandos de tamaño similar al inhibidor del cristal, mientras que para docking por ajuste inducido la caja es definida al volumen promedio del inhibidor presente en la proteína de energía minimizada.

Ambos métodos utilizan Glide v7.5 para determinar la variación de la estructura del ligando y su flexibilidad, mientras que IFD también usa Prime v4.8 para definir la flexibilidad del receptor.

15.2.1. Estabilización de la proteína.

La estabilización del cristal permite la ionización de los aminoácidos expuestos al solvente, que presentan interacciones tipo puente salino o que previamente mantenían contacto con aniones/cationes del proceso de cristalización (iones acetato, sulfato, gluconato, etc). El cristal proteico debe ser preparado y editado previamente para la eliminación de moléculas de agua innecesarias, mutación de residuos (de ser necesario) y finalmente estabilizado al pH nativo de la metaloproteasa.

Una vez estabilizada la enzima, se designa una caja centrada en el sitio activo de la enzima para los cálculos de Docking, donde se aplican los filtros en el caso de docking de receptor rígido como dadores/receptores de enlace de hidrógeno o coordinación de metal (H331, A334 y K489 para ECA y R198, A113 y N112 para LasB, además del átomo de cinc para ambas proteínas) o donde se define el átomo de cinc como el único filtro posible en ajuste inducido.

15.2.2. Procedimiento general de la reacción de Ugi-4C.

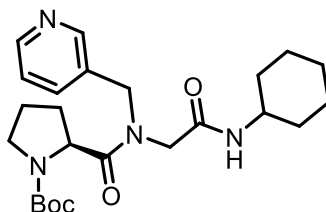
En un frasco de 7mL se disolvió el componente carbonílico (1mmol, 1,0 equivalentes), la amina (1mmol, 1,0 equivalentes), el ácido carboxílico (1mmol, 1,0 equivalentes) y el isocianuro (1mmol, 1,0 equivalentes) en 3mL de metanol, manteniéndose en agitación a temperatura ambiente por 24 horas. Una vez completada la reacción el producto fue concentrado mediante la extracción de los solventes volátiles (AcOEt y n-hex) a presión reducida. El producto bruto concentrado obtenido de este procedimiento se purificó mediante cromatografía en columna de fase estacionaria

de sílice, con mezclas de hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones como fase móvil.

Las proporciones del procedimiento son modificadas dependiendo de la presentación de los reactivos y sus grupos funcionales. En los casos de ligandos que requieren acetona se agrega 1,2 equivalentes para compensar la alta volatilidad del compuesto, mientras que en casos como LaAc01 se agrega el componente ácido en exceso de 2 equivalentes debido a que la amina contiene un anillo de piridina.

16. Síntesis y caracterización de los compuestos obtenidos.

tert-butil (S)-2-((2-(ciclohexilamino)-2-oxoetil)(piridin-3-ilmetil) carbamoil)pirrolidina-1-carboxilato.



108 mg (1 mmol, 1 equiv.) de picolilamina, 318 mg (0,1 mmol, 1 equiv.) de paraformaldehído, 102 μ L (0,1 mmol, 1 equiv.) de ciclohexilisonitrilo y 636 mg (0,3 mmol, 3 equiv.) de Boc-prolina se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general A. Después de purificación por cromatografía en columna se obtuvieron 355 mg de un aceite amarillo translúcido correspondiente al Ligando LaAc01 (80% de rendimiento químico).

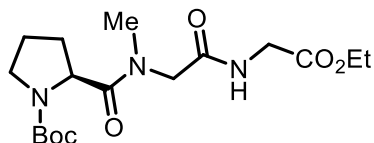
Rf: 0.7, 1:1 n-hexano y acetato de etilo.

IR(KBr, cm⁻¹): 3309 (νNH); 3080 (νCsp²-H); 2933 (νCsp³-H, CH₃); 2858 (νCsp³-H, CH₂); 2000-1700 (2xy Csp²-H, fenilo); 1689 (νC=O, amida); 1541, 1467, 1413 (νC=C, patrón de fenilo); 1359 (δCsp³-H); 1169 (νC-O); 927 (γ Csp²-H, fenilo); 721 (γ Csp³-H).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.63 – 8.41 (m, 2H), 7.82 – 7.56 (m, 1H), 7.41 – 7.15 (m, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H), 4.84 – 4.67 (m, 1H), 4.52 – 4.36 (m, 2H), 4.14 (dd, *J* = 17.4, 12.5 Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.61 (s, 1H), 3.54 – 3.34 (m, 2H), 2.15 (s, 1H), 1.74 (s, 8H), 1.48 (s, 9H), 1.23 (s, 4H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.13, 173.45, 171.23, 167.28, 166.55, 154.87, 154.78, 149.83, 149.57, 149.17, 148.40, 136.47, 134.45, 132.65, 132.17, 123.87, 123.63, 80.34, 80.15, 60.47, 56.50, 55.74, 52.17, 51.28, 50.07, 49.04, 48.66, 48.59, 47.28, 47.07, 32.99, 32.72, 32.59, 32.33, 30.36, 29.57, 28.65, 28.54, 25.62, 25.56, 25.32, 25.27, 25.20, 25.16, 24.96, 24.86, 21.13, 14.28.

Tert-butil (S)-2-((2-((2-etoxi-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil) (metil)carbamoil)pirrolidina-1-carboxilato.



77 μL (1 mmol, 1 equiv.) de metilamina acuosa, 30 mg (1 mmol, 1 equiv.) de paraformaldehído, 101 μL (1 mmol, 1 equiv.) de isocianoacetato de etilo y 215 mg (0,1 mmol, 1 equiv.) de BOC-prolina se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general. Después de purificación por cromatografía en columna se obtuvieron 222 mg de un aceite amarillo translúcido correspondiente al Ligando LaAc02 (60% de rendimiento químico).

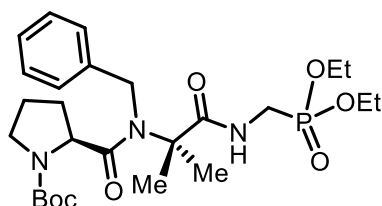
Rf: 0.75, 1:1 n-hexano y acetato de etilo.

IR(KBr, cm^{-1}): 3393 (νNH); 2932 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_3); 2883 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_2); 1681 ($\nu\text{C=O}$, amida); 1359 ($\delta\text{Csp}^3\text{-H}$); 1169 ($\nu\text{C-O}$); 775 ($\gamma\text{Csp}^3\text{-H}$).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.64 – 6.50 (m, 1H), 4.65 – 4.48 (m, 1H), 4.36 – 4.30 (m, 1H), 4.25 – 4.16 (m, 4H), 3.59 – 3.50 (m, 2H), 3.50 – 3.43 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.17 – 1.97 (m, 2H), 1.94 – 1.83 (m, 2H), 1.43 – 1.40 (m, 9H), 1.27 (dd, $J = 8.5, 5.7$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.20 (d, $J = 86.6$ Hz), 169.37 (dd, $J = 53.4, 19.8$ Hz), 155.18 (s), 80.30 (s), 61.25 (d, $J = 4.6$ Hz), 52.45 (s), 47.11 (s), 41.56 – 40.90 (m), 36.85 (s), 29.59 (d, $J = 17.2$ Hz), 28.75 – 28.28 (m), 24.90 (d, $J = 14.3$ Hz), 14.24 (s)

tert-butil (S)-2-(bencil(1-(((dietoxifosforil)metil)amino)-2-metil-1-oxopropan-2-il)carbamoil)pirrolidina-1-carboxilato. Ligando LaAc03, Tabla 1.



54,6 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de bencilamina, 40 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de acetona, 80,1 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de isocianometilfosfonato de dietilo y 113 mg (0,5 mmol, 1 equiv.) de BOC-prolina se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general. Después de purificación por cromatografía en columna se obtuvieron 161 mg de un aceite amarillo translúcido correspondiente al Ligando LaAc03 (60% de rendimiento químico).

Rf: 0.51, 1:1 n-hexano y acetato de etilo.

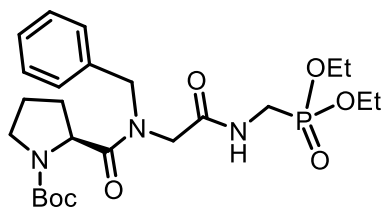
IR(KBr, cm^{-1}): 3513 (νNH); 3080 ($\nu\text{Csp}^2\text{-H}$); 2976 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_3); 2925 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_2); 1687 ($\nu\text{C=O}$, amida); 1544, 1425, 1397 ($\nu\text{C=C}$, patrón de fenilo); 1307 ($\delta\text{Csp}^3\text{-H}$); 1166 ($\nu\text{C-O}$); 970 ($\gamma\text{Csp}^2\text{-H}$, fenilo); 726 ($\gamma\text{Csp}^3\text{-H}$).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.55 – 7.25 (m, 5H), 6.63 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 18.6$ Hz, 1H), 4.71 (t, $J = 15.2$ Hz, 1H), 4.44 – 4.29 (m, 1H), 4.20 – 4.00 (m, 4H), 3.61 – 3.46 (m, 1H), 3.41 – 3.33 (m, 1H), 3.21 (ddd, $J = 13.0, 8.6, 4.0$ Hz, 1H), 2.27 – 2.08 (m, 1H), 2.02 (ddd, $J = 20.0, 13.2, 7.0$ Hz, 1H), 1.95 – 1.81 (m, 2H), 1.81 – 1.68

(m, 1H), 1.54 (s, 3H), 1.46 (s, 7H), 1.34 (t, J = 6.9 Hz, 3H), 1.28 (dd, J = 12.1, 5.0 Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 175.03, 174.68, 154.92, 139.00, 129.06, 128.97, 127.59, 127.45, 126.39, 126.15, 80.12, 63.37, 62.69, 62.43, 62.38, 62.24, 62.17, 57.32, 48.11, 47.42, 35.55, 33.99, 31.71, 30.51, 28.75, 28.62, 25.30, 24.75, 23.57, 16.62, 16.56, 16.50, 16.44.

tert-butil (S)-2-(bencil(2-(((dietoxifosforil)metil)amino)-2-oxoetil) carbamoil)pirrolidina-1-carboxilato.



54,6 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de bencilamina, 19 mg (0,1 mmol, 1 equiv.) de paraformaldehído, 80,1 μL (0,1 mmol, 1 equiv.) de isocianometilfosfonato de dietilo y 113 mg (0,1 mmol, 1 equiv.) de BOC-prolina se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general. Después de purificación por cromatografía en columna se obtuvieron 115 mg de un aceite translúcido correspondiente al Ligando LaAc04 (65% de rendimiento químico).

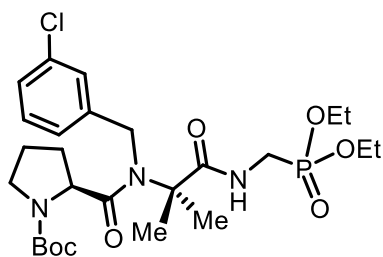
Rf: 0.45, 1:1 n-hexano y acetato de etilo.

IR(KBr, cm⁻¹): 3480 (νNH); 2981 (νCsp²-H); 2940 (νCsp³-H, CH₃); 2858 (νCsp³-H, CH₂); 2000-1700 (2xy Csp²-H, fenilo); 1689 (νC=O, amida); 1541, 1467, 1413 (νC=C, patrón de fenilo); 1359 (δCsp³-H); 1169 (νC-O); 927(γ Csp²-H, fenilo); 721 (γ Csp³-H).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23, 7.66 (2xs, 1H, NH), 7.44 – 7.15 (m, 5H), 5.16 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 4.83 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 4.53 – 4.41 (m, 2H), 4.28 – 4.04 (m, 4H), 3.65 – 3.57 (m, 1H), 3.42 (m, 4H), 2.24 – 2.11 (m, 1H), 2.08 – 1.82 (m, 4H), 1.81 – 1.67 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.33 (2xt, J = 7.1 Hz, 6H).

RMN de ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.66, 173.13, 168.50, 168.06, 155.15, 136.61, 129.19, 128.85, 128.60, 128.03, 127.84, 126.53, 80.43, 62.66, 62.60, 62.34, 56.29, 55.66, 52.66, 51.02, 50.67, 49.84, 47.29, 47.19, 35.73, 34.17, 30.22, 29.79, 28.63, 28.54, 25.00, 16.59.

tert-butil (S)-2-((3-clorobencil)(1-(((dietoxifosforil)metil)amino)-2-metil-1-oxopropan-2-il)carbamoil)pirrolidina-1-carboxilato.



62 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de bencilamina, 50 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de acetona, 80,1 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de isocianometilfosfonato de dietilo y 108 mg (0,5 mmol, 1 equiv.) de BOC-prolina se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general. Después de purificación por cromatografía en columna se obtuvieron 95 mg de un aceite translúcido correspondiente al Ligando LaAc05 (37% de rendimiento químico).

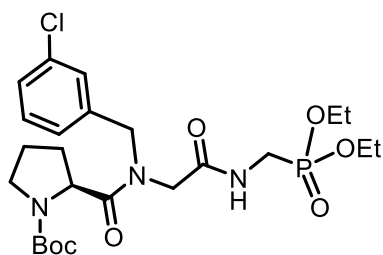
Rf: 0.45, 1:1 n-hexano y acetato de etilo.

IR(KBr, cm^{-1}): 3350 (νNH); 3071 ($\nu\text{Csp}^2\text{-H}$); 2980 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_3); 2914 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_2); 2000-1700 (2xy $\text{Csp}^2\text{-H}$, fenilo); 1690 ($\nu\text{C=O}$, amida); 1553, 1480, 1408 ($\nu\text{C=C}$, patrón de fenilo); 1370 ($\delta\text{Csp}^3\text{-H}$); 1170 ($\nu\text{C-O}$); 927 ($\gamma\text{Csp}^2\text{-H}$, fenilo); 860 ($\nu\text{Csp}^2\text{-Cl}$,); 729 ($\gamma\text{Csp}^3\text{-H}$).

RMN de ^1H : (400 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (dd, $J = 21.3, 15.6$ Hz, 1H), 7.35 – 7.22 (m, 2H), 7.19 – 7.07 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.50 (dt, $J = 15.8, 6.0$ Hz, 2H), 4.42 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 4.15 (ddd, $J = 19.7, 13.8, 5.5$ Hz, 4H), 3.94 – 3.86 (m, 2H), 3.59 (dd, $J = 15.8, 10.5$ Hz, 2H), 2.22 – 1.72 (m, 4H), 1.47 (t, $J = 4.5$ Hz, 6H), 1.40 – 1.27 (m, 9H), 0.90 (t, $J = 6.7$ Hz, 6H).

RMN de ^{13}C : (101 MHz, CDCl_3) δ 174.65 (s), 157.20 – 153.23 (m), 139.64 – 134.29 (m), 127.53 (dd, $J = 379.0, 215.7$ Hz), 80.55 (s), 62.48 (d, $J = 22.3$ Hz), 47.28 (s), 36.43 – 33.55 (m), 30.08 (d, $J = 43.3$ Hz), 28.59 (d, $J = 7.0$ Hz), 25.05 (s), 16.61 (s).

tert-butil (S)-2-((3-clorobencil)(2-(((dietoxifosforil)metil)amino)-2-oxoetil)carbamoil)pirrolidina-1-carboxilato.



62 μL (0,5 mmol, 1 equiv.) de bencilamina, 15 mg (0,5 mmol, 1 equiv.) de paraformaldehído, 80,1 μL (0,1 mmol, 1 equiv.) de isocianometilfosfonato de dietilo y 108 mg (0,1 mmol, 1 equiv.) de Boc-prolina se hicieron reaccionar de acuerdo con el procedimiento general. Después de purificación por cromatografía en columna se obtuvieron 87 mg de un aceite translúcido correspondiente al Ligando LaAc06 (32% de rendimiento químico).

Rf: 0.45, 1:1 n-hexano y acetato de etilo.

IR(KBr, cm^{-1}): 3474 (νNH); 3064 ($\nu\text{Csp}^2\text{-H}$); 2981 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_3); 2910 ($\nu\text{Csp}^3\text{-H}$, CH_2); 2000-1700 (2xy $\text{Csp}^2\text{-H}$, fenilo); 1688 ($\nu\text{C=O}$, amida); 1553, 1460, 1407 ($\nu\text{C=C}$, patrón de fenilo); 13500 ($\delta\text{Csp}^3\text{-H}$); 1169 ($\nu\text{C-O}$); 969 ($\gamma\text{Csp}^2\text{-H}$, fenilo); 890 ($\nu\text{Csp}^2\text{-Cl}$,); 763 ($\gamma\text{Csp}^3\text{-H}$).

RMN de ^1H : (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34 – 7.08 (m, 4H), 5.12 (t, $J = 15.4$ Hz, 2H), 4.99 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.49 – 4.40 (m, 1H), 4.23 – 4.05 (m, 4H), 3.94 –

3.84 (m, 2H), 3.57 (dt, $J = 17.0, 15.7$ Hz, 2H), 2.10 (dd, $J = 35.5, 12.8$ Hz, 2H), 1.96 – 1.74 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.40 – 1.28 (m, 6H).

RMN de ^{13}C : (101 MHz, CDCl_3) δ 174.61 (s), 168.33 (s), 155.15 (s), 136.97 (d, $J = 357.3$ Hz), 130.28 (d, $J = 45.3$ Hz), 128.26 (t, $J = 24.1$ Hz), 126.65 (d, $J = 7.3$ Hz), 124.64 (s), 80.50 (s), 56.18 (s), 55.61 (s), 51.52 (d, $J = 115.7$ Hz), 49.56 (s), 47.21 (d, $J = 7.9$ Hz), 34.99 (d, $J = 156.7$ Hz), 30.05 (d, $J = 40.0$ Hz), 28.56 (d, $J = 6.6$ Hz), 25.00 (s), 16.54 (d, $J = 5.6$ Hz).

17. Resultados y Discusión.

17.1. Síntesis y caracterización de los Ligandos.

Los ligandos LaAc01-LaAc06 fueron obtenidos empleando las condiciones detalladas en el epígrafe **15.2.2.**, a partir de la reacción de Ugi cuatro componentes (Ugi-4C). Los compuestos fueron aislados como aceites translúcidos en rendimientos moderados (32 - 80%). Es importante mencionar que la reacción de Ugi-4C se caracteriza por la elevada economía atómica y por su fácil manejo en condiciones de reacción no drásticas, se emplean solventes amigables con el medio ambiente y el único subproducto es H_2O .

De forma general pudimos notar que el rendimiento químico resultó ser bueno para los ligandos LaAc01, LaAc02, LaAc03, y LaAc04 pero no fue así para los compuestos LaAc05 y LaAc06. La única explicación que podría atribuirse al bajo rendimiento obtenido es al componente amino empleado en la reacción de Ugi-4C.

Como notamos, la meta-clorobencilamina empleada debe ser quien contribuyó con la erosión del rendimiento químico del producto deseado. Consideramos que el átomo de cloro podría estar influenciando en la reactividad del grupo amino en la generación de la imina en el primer paso del mecanismo de la reacción de Ugi.

Posteriormente continuamos con la caracterización espectroscópica y elucidación estructural de los ligandos obtenidos.

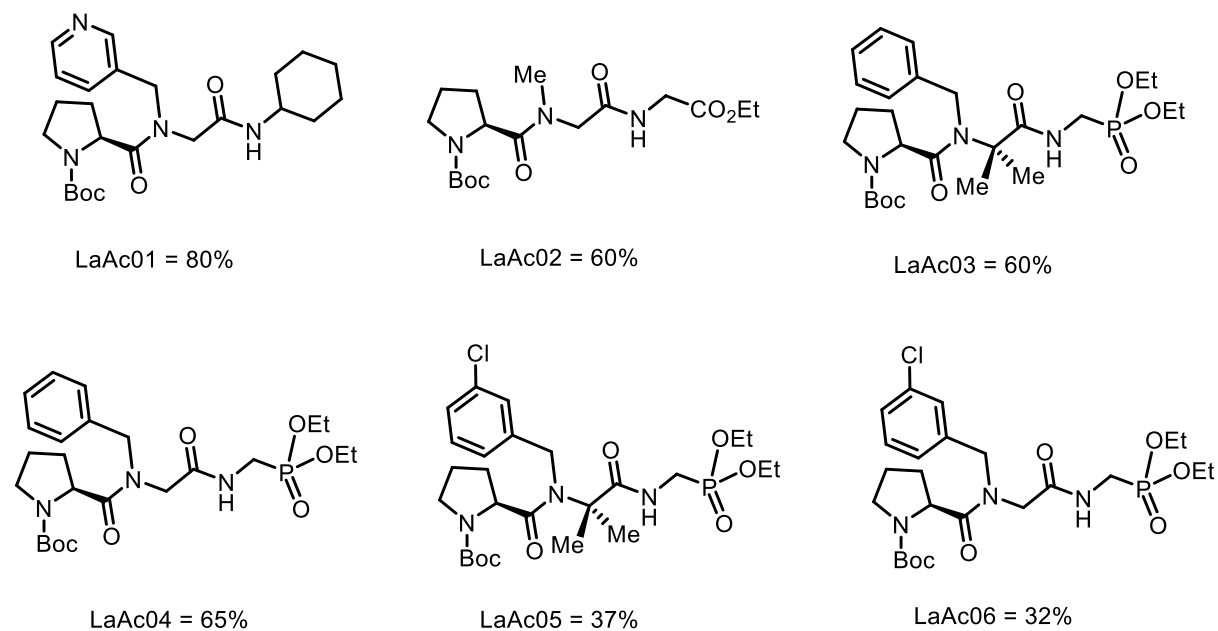


Figura 8. Estructura de los ligandos sintetizados y su respectivo rendimiento químico.

Para esto se determinó el espectro de transmitancia en la región de los 4000cm^{-1} a 700 cm^{-1} en pastillas de KBr. Para todos los ligandos fue posible observar el *stretching* ν_{N-H} en 3474 cm^{-1} correspondiente a la amida secundaria que se forma en el aducto de la reacción de Ugi-4C. Adicionalmente, *stretching* ν_{Csp3-H} en 2932 cm^{-1} para grupos metilos (CH_3) y 2910 cm^{-1} para grupos metilenos (CH_2) fueron observados. También fue posible identificar el *stretching* ν_{Csp2-H} en 3064 cm^{-1} presente en los anillos aromáticos del componente amino empleado en la síntesis. Adicionalmente, las señales presentes en 1553 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} y 1407 cm^{-1} ($\nu_{C=C}$, patrón de fenilo) y en la región de $2000\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (corresponde al sobretono $2x\gamma_{Csp2-H}$) confirman la inserción del componente amino en la estructura de todos los ligandos sintetizados. Otras señales importantes es la $\nu_{C=O}$ para los carbonílos, presentes en los péptidos *N*-alquilados que fueron sintetizados. Para el grupo carbamato (esto es el Boc) la señal aparece $\sim 1780\text{ cm}^{-1}$, sin embargo, para el grupo carbonilo de las amidas 2^{ria} y 3^{ria} esta señal se detecta a menor número de onda ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) y esto se debe a la resonancia presente en el grupo funcional de las amidas.

En un segundo momento, para confirmar la formación de los Ligandos fue necesario realizar los respectivos espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (espectros FTIR y RMN para los ligandos sintetizados disponibles en documento anexo).

Para explicar la caracterización de los ligandos por resonancia magnética nuclear (RMN) vamos a utilizar solo los espectros medidos para el ligando código LaAc01.

Iniciamos el análisis por el espectro de RMN de ^{13}C como se muestra en la **Figura 9**. En todos los ligandos obtenidos pudimos notar en cada uno de los espectros la presencia de señales duplicadas. Nótese que en la región de campo bajo donde

aparecen los *peaks* de los grupos carbonilos en la región de desplazamiento químico de 180 a 160 ppm es evidente como están duplicadas estas señales. Pudimos observar una mezcla de 0.6:1:0 de los isómeros Z:E. La explicación a este fenómeno está asociada a la presencia de confórmeros en los péptidos *N*-alquilados que sintetizamos.

Se conoce que estos confórmeros son fácilmente detectables a la temperatura de 298K con que se miden los espectros de RMN de ^{13}C . Para identificar la estructura podemos mencionar que en la zona aromática (120 a 150ppm) aparecen los carbonos de la piridina. En los 80,34 ppm encontramos el carbono cuaternario del grupo protector Boc, junto al triplete del cloroformo en 77,16 ppm. También podemos detectar los otros metilos de Boc por el peak intenso a campo alto en 28,54 ppm asociado a los tres CH_3 . Las demás señales que están a Campo alto son las correspondientes al anillo del ciclohexilo, de la pirrolidina y a los demás carbonos saturados que están en la estructura del ligando LaAc01.

Por otra parte, el espectro de RMN de ^1H (ver Anexo) muestra que realmente se formó el compuesto deseado. También se pudo observar señales duplicadas. El doblete (d) presente en 6.84 ppm con una constante de acoplamiento (J) de 8.31Hz está asignado a el grupo NH de la amida secundaria que está unida al grupo ciclohexilo.

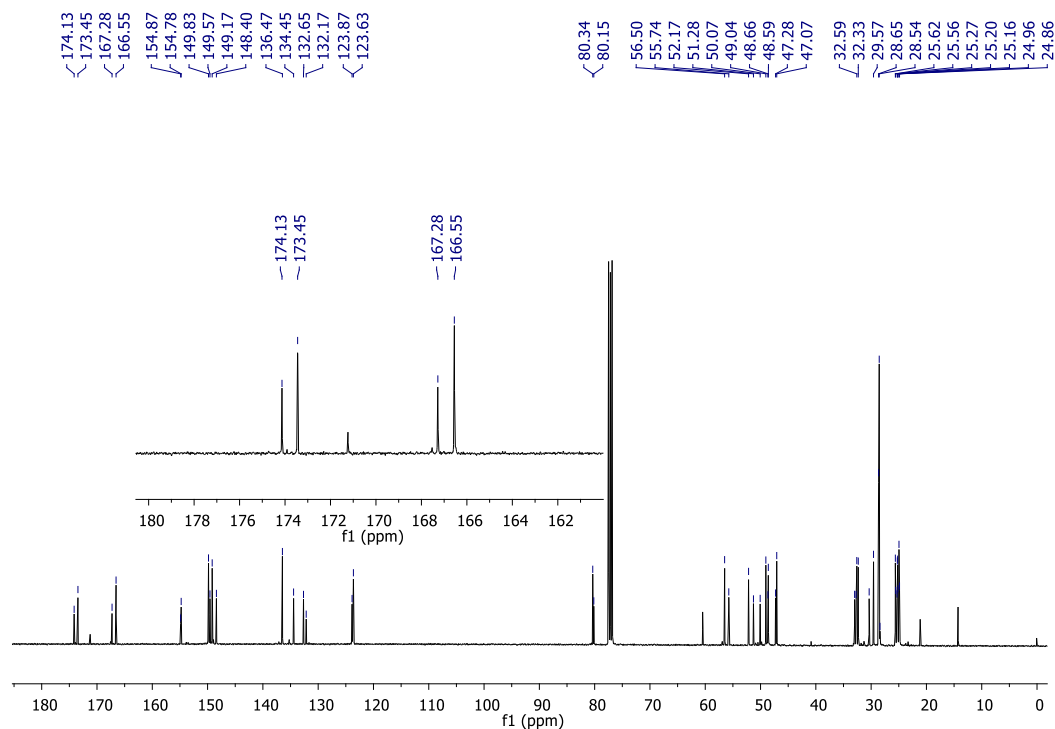


Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C del ligando LaAc01 en CDCl_3 .

Adicionalmente, el multiplete que está en 3.60 ppm corresponde al protón del grupo metínico (CH) del ciclohexilo quien está vecino y acopla con el NH, haciendo que este sea un doblete. El singlete intenso en la región de campo alto del espectro a 1.49 ppm corresponde a los tres metilos del grupo protector de la prolina (Boc).

Una vez caracterizados y comprobado la estructura de todos los compuestos sintetizados pasamos al diseño racional de los ligandos.

17.2. Diseño de los peptidomiméticos.

Para el diseño de los ligandos a probar en el par de metaloenzimas nECA y LasB se consideró el producto peptidomimético altamente modificable que entrega la reacción multicomponente de Ugi con isonitrilos, detallado en la **Figura 6, Figura 7 y Figura 8**, considerando la modificación de los grupos R mencionada en la **Tabla 1**. Por términos prácticos se sintetizaron los ligandos LaAc01 – LaAc06 se sintetizaron y caracterizaron con los grupos protectores presentes, como se puede observar en la sección de síntesis y caracterización, pero no se removieron los mismos porque lo necesario era demostrar la síntesis de estos ligandos (con rendimientos y caracterización por espectro IR y RMN), siendo importante la desprotección de estos ligandos solo para prueba de actividad biológica de los mismos.

El diseño de los ligandos de la **Tabla 1** comenzó por imitar moléculas de efectividad (K_i) conocida. Para el diseño de algunos de los ligandos de la **Tabla 1** se imitaron grupos funcionales de los ligandos presentes en el sitio activo de los cristales utilizados. Para el cristal 6EN5 de nECA se consideró el uso de prolina como componente ácido (Boc-Pro) debido a que el inhibidor “diprolilo” (como es descrito por los autores) contiene 2 pirrolidinas, y para el cristal 3DBK de elastasa B de *P. aeruginosa* se consideró el uso de isocianometilfosfonato de dietilo, ya que el inhibidor del cristal contiene un éster fosfonato. Los ligandos que presentan al menos uno de esos dos componentes son los primeros 6 ligandos, los que fueron sintetizados y caracterizados. Estos grupos fueron adicionados para poder comparar las poses, cantidad y ‘calidad’ de las interacciones (respecto a la ponderación de puntajes que hace Glide) y no solo los puntajes. El uso de grupos laterales como el bencilo y *m*-clorobencilo surge también de imitar ligandos como lisinopril o enalapril, siendo la iteración de los ligandos LaAc03 y LaAc04 modificada con *m*-

clorobencilamina, diseñada para comparar entre estos ligandos y sus poses, en caso de haber alguna diferencia.

La mayoría de los grupos R modificados corresponden a grupos funcionales para los cuales existe metabolismo por enzimas de la familia de CYP para metilos y para anillos aromáticos (moléculas LaAc01 y LaAc03 – LaAc06), mientras que el resto del esqueleto base puede ser hidrolizado por peptidasas presentes en lisosomas, por ejemplo. Hay casos como los ligandos LaAc12 y LaAc13 en sus variedades, que poseen un ciclopropilo y ciclopentilo, esperando ver con ellos diferencias derivadas de la presencia de un grupo voluminoso alifático y los efectos que los cambios en los centros quirales pueden generar respecto a una posible selectividad (de la enzima al ligando, observado como diferencia de puntaje) entre centros quirales, y potencialmente la selectividad entre metaloenzimas.

El ligando es dibujado en 2D utilizando la función de Maestro que permite el diseño y modificación de ligandos. El programa agrega este ligando al espacio de trabajo y renderiza la estructura 3D de forma en que los grupos no interfieran espacialmente entre sí para posteriormente utilizar el programa *Ligprep*, el cual calcula las posibles poses de menor energía, adaptándose respecto al pH establecido, el cual fue el pH al que las metaloenzimas nECA y LasB cumplen su función (mencionado previamente).

El conjunto de conformaciones más estables se probó por docking de receptor rígido y receptor flexible, incluyendo la variación de los posibles centros quirales de los aldehídos de los ligandos LaAc 8, 9, 11, 12 y 13, mostrados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Grupos funcionales de los ligandos diseñados. R_x correspondiente respecto a la imagen de referencia de la reacción multicomponentes en base a la **Figura 7**. Las variaciones se denotan con una coma. Bn = bencilo CH₂, cPro / Pen /Hex = ciclo propano / pentano / hexano, Pyr = pirrolidina, configuración S.

Ligando	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
LaAc01	H	<i>m</i> CH ₂ -piridina	Pyr	cHex
LaAc02	H	CH ₃	Pyr	(CH ₂)- COOH
LaAc03	(CH ₃) ₂	Bn	Pyr	(CH ₂)- PO(OH) ₂
LaAc04	H	Bn	Pyr	(CH ₂)- PO(OH) ₂
LaAc05	H	<i>m</i> ClBn	Pyr	(CH ₂)- PO(OH) ₂
LaAc06	H	<i>m</i> ClBn	Pyr	(CH ₂)- PO(OH) ₂
LaAc07	(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CO-(Trp,Tyr, Phe)
LaAc08	Bn	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CO-(Trp,Tyr, Phe)
LaAc09	Bn	CH ₃	<i>N</i> -(CH ₃)Asp	CH ₂ CO-(Trp,Tyr, Phe)
LaAc10	(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CO-(Trp,Tyr, Phe)
LaAc11	Bn	CH ₃	<i>N</i> -(CH ₃)Ala	CH ₂ CO-(Trp,Tyr, Phe)
LaAc12	CH ₂ cPro	CH ₃	<i>N</i> -(Ac)- Asp	CH ₂ CO-(Trp,Tyr, Phe)
LaAc13	CH ₂ cPen	CH ₃	<i>N</i> -(Ac)-Asp	CH ₂ CO-(Trp,Tyr, Phe)

18.1. Puntajes de docking *in silico*.

Tabla 2. Docking score de ligandos de la Tabla 1, condiciones descritas para cada molécula en la sección de métodos.

Unidades de los puntajes en [kCal mol⁻¹].

	nECA		LasB			nECA		LasB	
Ligando	Docking score	Glide score	Docking score	Glide score	Ligando	Docking score	Glide score	Docking score	Glide score
LaAc01	-8,152	-8,253	-8,150	-8,251	LaAc10_1	-7,160	-7,160	-5,896	-5,896
LaAc02	-8,059	-8,145	-6,907	-6,993	LaAc10_2	-6,109	-6,109	-8,262	-8,262
LaAc03	-8,795	-9,439	-8,392	-8,790	LaAc10_3	-4,529	-4,529	-8,120	-8,120
LaAc04	-8,007	-8,651	-7,264	-7,661	LaAc11_1R	-7,098	-7,854	-7,842	-8,599
LaAc05	-8,834	-9,480	-8,149	-8,546	LaAc11_1S	-7,980	-8,174	-7,365	-7,365
LaAc06	-6,888	-7,285	-7,150	-7,547	LaAc11_2R	-6,855	-7,049	-8,367	-8,367
LaAc07_1	-7,798	-7,798	-5,730	-5,730	LaAc11_2S	-6,855	-7,049	-8,706	-8,706
LaAc07_2	-8,794	-8,794	-5,708	-5,708	LaAc11_3R	-8,749	-8,942	-10,066	-10,066
LaAc07_3	-6,200	-6,200	-8,689	-8,689	LaAc11_3S	-8,614	-8,808	-10,066	-10,066
LaAc08_1R	-9,781	-9,781	-6,090	-6,090	LaAc12_1R	-7,525	-7,525	-5,952	-5,952
LaAc08_1S	-9,579	-9,579	-7,410	-7,410	LaAc12_1S	-3,749	-3,749	-7,932	-8,016
LaAc08_2R	-8,256	-8,256	-9,332	-9,332	LaAc12_2R	-3,749	-3,749	-5,047	-5,130
LaAc08_2S	-8,526	-8,526	-9,332	-9,332	LaAc12_2S	-	-	-5,407	-5,130
LaAc08_3R	-8,777	-8,777	-6,967	-6,967	LaAc12_3R	-	-	-8,852	-8,936
LaAc08_3S	-8,777	-8,777	-7,115	-7,115	LaAc12_3S	-	-	-8,852	-8,936
LaAc09_1R	-8,104	-8,133	-6,402	-6,431	LaAc13_1R	-7,519	-7,519	-0,742	-0,742
LaAc09_1S	-7,932	-7,960	-7,170	-7,170	LaAc13_1S	-8,378	-8,378	-7,212	-7,298
LaAc09_2R	-7,595	-7,623	-8,047	-8,047	LaAc13_2R	-9,595	-9,595	-6,793	-6,879
LaAc09_2S	-5,509	-5,538	-6,412	-6,412	LaAc13_2S	-9,595	-9,595	-6,793	-6,879
LaAc09_3R	-6,982	-7,010	-7,829	-7,829	LaAc13_3R	-6,536	-6,536	-8,556	-8,642
LaAc09_3S	-6,982	-7,010	-8,790	-8,790	LaAc13_3S	-6,536	-6,536	-8,556	-8,642

18.2. Puntajes de docking por ajuste inducido.

Tabla 3. Puntaje de docking por ajuste inducido, de los ligandos sintetizados y de los ligandos de mejor puntaje de la Tabla 2. Unidades en [kCal mol⁻¹].

Ligandos	Puntaje ECA	Puntaje LasB	Puntaje IFD ECA		Puntaje IFD LasB	
			Docking	Glide	Docking	Glide
LaAc01	-8,253	-8,251	-6,834	-6,934	-7,051	-7,143
LaAc02	-8,145	-6,993	-8,255	-8,341	-8,809	-8,809
LaAc03	-9,439	-8,790	-10,182	-10,193	-10,465	-10,471
LaAc04	-8,651	-7,661	-10,387	-10,397	-10,874	-10,880
LaAc05	-9,480	-8,546	-9,424	-9,730	-10,526	-10,533
LaAc06	-7,285	-7,547	-10,833	-11,138	-11,305	-11,311
LaAc08_1R	-9,781	-6,090	-12,560	-12,560	-11,136	-11,136
LaAc08_1S	-9,579	-7,410	-12,560	-12,560	-10,765	-10,765
LaAc11_3R	-8,749	-10,066	-8,884	-9,907	-11,096	-11,096
LaAc11_3S	-8,614	-10,066	-10,098	-10,292	-10,215	-10,215

Tabla 4. Puntaje de docking por ajuste inducido de moléculas de actividad inhibitoria conocida. Unidades de puntaje en [kCal mol⁻¹], Ki en [μmol L⁻¹]. Ligando L2_2 fue probado en cECA. Código de ligandos corresponde a lista 1 y lista 2 para cada caso como L1 y L2, con código numérico definido en la fuente por los autores. L1 y L2 ECA.^{54,55} L1 y L2 LasB.^{56,57} Omap = omapatrilat.

Puntaje en nECA				Puntaje en LasB			
Ligando	Ki	docking	glide	ligando	Ki	docking	glide
L1_7c	0,035	-8,863	-8,863	L1_11b	0,45	-10,200	-10,348
L1_7e	0,023	-9,269	-9,269	L1_12b	4,04	-10,575	-10,721
L1_7i	0,04	-8,830	-8,830	L1_13b	0,61	-9,471	-10,053
L2_2	0,005	-8,236	-8,236	L2_13	3,4	-6,212	-6,212
L2_omap.	0,006	-10,523	-10,624	L2_15	3,5	-5,601	-5,601
L2_SCH	0,002	-13,347	-13,347	L2_50	5,4	-8,472	-8,472

Un factor importante para docking es la selección del pH en el que la enzima funciona de manera óptima. En el caso de la nECA el pH corresponde al pH fisiológico, de $7,4 \pm 0,5$ porque esta metaloenzima funciona principalmente en el endotelio pulmonar, pero con LasB la elección se complica. Debido a que LasB es liberada al medio como factor de virulencia dentro de las biopelículas y a que estas estructuras pueden albergar poblaciones variadas de bacterias, el pH del medio varía por distancia dentro de esta estructura. Estudios en los que se mide el pH en diferentes profundidades de biopelículas concuerdan que el pH medio de la estructura oscila en el rango de pH ácido, se usó el pH promedio de $5,6 \pm 0,8$, aunque es posible que este rango no sea óptimo para el funcionamiento de la elastasa, a diferencia del rango de pH usado para nECA.⁵¹

En cuanto a la selección de cristales con la nECA en el cristal 6EN5, se utilizó la subunidad A del tetrámero, que era la subunidad con menos errores (residuos o cadena incompleta) con el fin de evitar perjudicar los resultados de ajuste inducido, esto porque en estos cálculos la presencia del ligando provoca un cambio conformacional, cambio que se vería afectado porque las aproximaciones tomadas por el programa modifican la estructura del cristal para acomodar los residuos mutados.

Además, debido a que se modifican las posiciones de los residuos del sitio activo en ajuste inducido, el uso de filtros excluyentes puede resultar en la pérdida de poses porque se aleja el residuo de interés por rotaciones de enlaces Sp^3 y torsión de la cadena de aminoácidos, por lo que se optó por utilizar el cinc de ambas metaloenzimas como único filtro excluyente, filtrando a mano los resultados por análisis del mapa de interacciones en 2D. Afortunadamente cuando se probaron los ligandos sintetizados por ajuste inducido se observó que las interacciones con los

residuos importantes (respecto a patrones de interacción) se mantenían en ambos sistemas estudiados.

Para hacer una comparación válida entre los ligandos también se usan puntajes de ajuste inducido y poses de los ligandos que presentaron mejores puntajes como LaAc08_1R/S para nECA y ligando LaAc11_3R/S para LasB, haciendo también las pruebas cruzadas de estos ligandos.

Para agregar variedad a la biblioteca de ligandos probados, se consideró el uso de isonitrilos de mayor complejidad, como el producto de la reacción de trans amidación entre isocianoacetato de etilo (reactivo utilizado en la síntesis de LaAc02) con un aminoácido (Phe, Tyr y Trp) en metanol, obteniendo dicho isonitrilo modificado con altos rendimientos.⁵²

En las tablas de resultados de docking de receptor rígido y de receptor flexible se entregan 2 puntajes, puntaje docking y Glide, siendo Glide una corrección del puntaje por penalizaciones torsionales. Usualmente estos puntajes se observan como un aumento del puntaje en docking de receptor rígido y esto se mantiene en la mayoría de los ligandos probados en docking de receptor rígido, aunque en ajuste inducido muchas veces se encuentra que los puntajes de docking y el puntaje corregido es el mismo o ligeramente superior.

En la **Tabla 3** se observa una anomalía, en comparación a todos los otros ligandos probados, en donde el puntaje de docking corresponde a uno menor que el resultado de docking por ajuste inducido. Una posible explicación a esta anomalía es que el ligando LaAc01 posee un grupo alifático ciclohexilo, grupo incapaz de formar enlaces

de hidrógeno o interacciones pi-pi, que por lo tanto aleja los residuos cercanos y afecta la conformación de la enzima y afecta la pose del ligando en docking de receptor flexible. Es por esto que consideramos que (para LaAc01 y los ligandos sintetizados) los puntajes de docking por ajuste inducido son más confiables y es la razón por la que se muestran figuras de ajuste inducido. En los otros ligandos probados por docking se observa una mejora constante de entre 10 a 15% en los puntajes.

Respecto a los otros ligandos de la **Tabla 3**, en los ligandos sintetizados se observa una mejora en los puntajes cuando los ligandos usan paraformaldehído en vez de acetona, como se observa en los puntajes de los ligandos LaAc02, 04 y 06 respecto a sus iteraciones en los casos de LaAc04 y 06 en comparación a LaAc03 y 05. Debido a que la biblioteca de ligandos no presenta una “consistencia” entre moléculas (que los ligandos mantengan grupos funcionales similares como LaAc03-06, por ejemplo) es difícil asociar efectividad a los grupos funcionales si se comparan ligandos como LaAc06 y LaAc07 y posteriormente compararlos con LaAc08, que utiliza un componente ácido y aldehído completamente diferente.

En los ligandos LaAc03-06 también se observa que la presencia del halogenuro en el sistema conjugado aportado por la amina presenta un impacto ligeramente negativo respecto a sus contrapartes no halogenadas, aunque en muchas de las poses de LaAc06 se observa que el grupo bencilo deja de estar expuesto al solvente y pasa a formar una interacción catión – pi con residuos cercanos y aun así obtiene un puntaje inferior. Esto puede explicarse porque en los casos que el ligando LaAc05 expone el grupo bencilo de la amina *N*-alquilada al solvente el grupo fosfonato puede coordinar el catión cinc con 2 oxígenos, formando un puente salino y coordina 2 veces al metal, mientras que LaAc06 sólo forma un puente salino y una coordinación y por lo tanto afectando la forma en que el algoritmo asigna puntaje a estos ligandos. Cabe

destacar que la diferencia entre las poses de LaAc06 de mejor puntaje considera variaciones en la rotación de la mayoría de los enlaces sp^3 y por lo tanto es posible que el ligando pueda formar la interacción catión- π y tener las 3 interacciones con el catión cinc, lo que podría ser observado con técnicas como dinámica molecular.

De la **Tabla 2** se puede deducir que utilizar grupos alifáticos como 2-ciclopropiletanal o 2-ciclopentiletanal alteran la conformación del ligando en el sitio activo, y dependiendo de la configuración espacial de la molécula final (considerando solamente el centro estereogénico que se genera) de forma que se logra una aparente selectividad.

Como se observa una relación de bajo puntaje en el ligando L2_13 la **Tabla 4** y pocas interacciones con residuos del sitio activo, pero constantes de afinidad en el rango μM (**Figura 10**), surgen preguntas como: ¿Para qué clasificar los ligandos en base a su puntaje? Y ¿Son confiables estos resultados si moléculas de eficacia conocida presentan puntajes bajos?

La primera pregunta se responde analizando el diagrama de funcionamiento del algoritmo Glide (provisto como material en la sección de materiales y tutoriales de Maestro), donde se observa que los ligandos son probados en el sitio seleccionado y se prueban cambios torsionales que le permitan acercarse mejor e interactuar con el sitio activo, encontrando así una serie de estructuras de mínima energía diferentes a las poses de mínima energía obtenidas en el proceso de preparación del ligando previo al procedimiento de docking. Posteriormente el programa Emodel, de función clasificadora, asigna puntajes y selecciona entre los complejos proteína – ligando para ordenar aquellos compuestos que se unan fuertemente y los separa de aquellos ligandos que no presentan esta unión y por lo tanto son considerados inactivos.⁵⁸

Es decir, la cantidad de interacciones que presenta un ligando en el sitio activo y la “calidad” o potencia de estas son las que le asignan un mejor puntaje, e interacciones entre grupos cargados con el cinc del sitio activo o puentes salinos con aminoácidos cargados como K489 en nECA aportan en la obtención de un puntaje superior. Respecto a los puntajes obtenidos para la molécula del listado 2 código L2_SCH en cECA en la **Tabla 4**, se observan 5 enlaces de hidrógeno, 2 puentes salinos y la estabilización del grupo fenilo por interacciones pi-pi y tipo T, además de presentar estas interacciones con residuos clave del sitio activo, justificando así su elevado puntaje y baja K_i .

Considerando lo antes mencionado, quedan dudas al mirar el puntaje del ligando L2_13 de la **Tabla 4** de ajuste inducido para LasB, donde se observan un solo enlace de hidrógeno y puentes salinos entre el tiolato y solo 2 de los más de 20 residuos importantes para la inhibición de la actividad enzimática (respecto a estudios de patrones de interacción).⁵⁴ Debido a que el puntaje de docking corresponde a la energía libre de unión entre un par proteína–ligando expresado en $[kCal\ mol^{-1}]$ y a que el átomo de cinc es parte de la proteína, la presencia de un producto precipitado de baja solubilidad otorga a esta molécula un puntaje mayor al que podría optar de no haber presentado esta interacción. En el caso del mencionado L2_13, un paso importante a considerar es la deprotonación manual y asignación de carga formal del ligando de estructura minimizada ya que el pKa del tiol no permite la ionización de este ligando a pH 5,6, de esta forma se observa un aumento en puntaje de -3.501 a -6.212 y se obtiene un resultado más confiable.

La segunda pregunta se responde de una forma diferente, porque es necesario comparar los resultados teóricos de docking por puntaje RMSD, procedimiento en el

cual se compara la mejor pose obtenida (sin utilizar filtros) del ligando original del cristal (inhibidor diprolilo y fosforamidón para nECA y LasB), siendo el resultado una comparación de distancia del ligando en comparación al cristal original en Angstrom. Debido a que el puntaje RMSD fue de 0,082 y 2,768 angstrom para ECA y LasB respectivamente, las poses obtenidas presentaron una mínima desviación en comparación al cristal original en nECA, siendo el resultado de LasB un poco peor, repitiendo de forma casi exacta las interacciones y posición en el sitio activo, por lo que el sistema y condiciones elegidas para los ligandos parecen ser las correctas. Los ligandos LaAc05 y LaAc06 son redundantes, modificando de estos solo el componente amino desde bencilamina a *m*-clorobencilamina. El procedimiento sintético entre estas moléculas fue igual, mas como se comentó previamente el rendimiento se vio disminuido en un 50% debido a los efectos sustractores de densidad electrónica por el cloruro en el anillo aromático. Las moléculas LaAc05 y

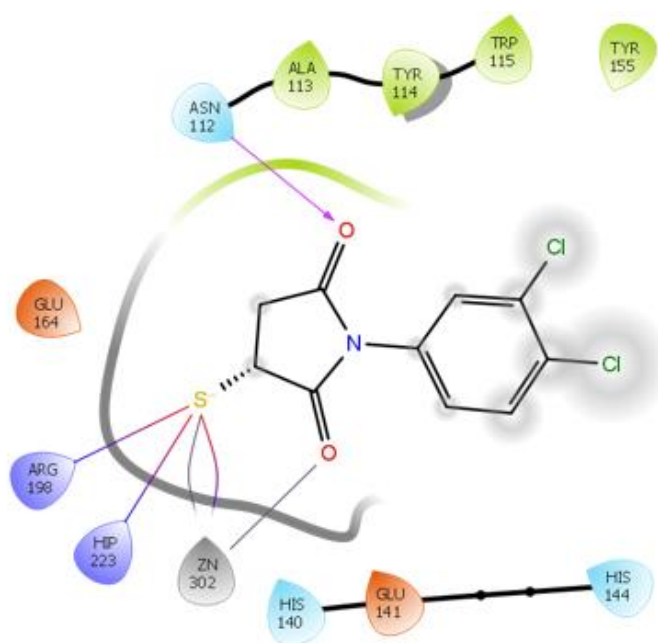


Figura 10. Mapa de interacciones del ligando L2_13 de la **Tabla 4** para LasB.

LaAc06 fueron sintetizadas para ver si este cambio en la estructura podría marcar alguna diferencia en las poses obtenidas, y se encontró que la adición del cloruro al grupo bencilo provocó un cambio en el puntaje obtenido en comparación directa (LaAc04 vs LaAc06) en docking de receptor rígido, lo que se confirmó con docking por ajuste inducido y se observan diferencias en los mapas de interacción presentados en las siguientes figuras (**Figura 11** y **Figura 12**). En estas imágenes se observa una pérdida con varios de los residuos del sitio activo, viendo en la **Figura 11** interacciones con R198, N112, N112, y H223, mientras que LaAc06 en la **Figura 12** se agregan interacciones con A113 y W115.

Estas poses difieren tanto en calidad como en cantidad de interacciones. Ambos ligandos comparados interactúan con R198, H223, N112 y el cinc; mientras el ligando

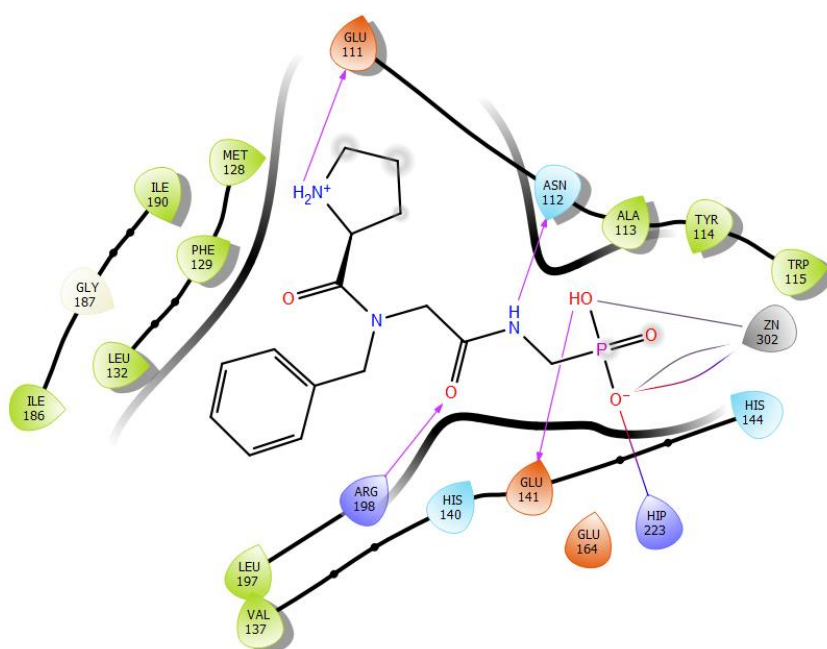


Figura 11. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc04 en LasB.

LaAc06 de la **Figura 12** obtiene una mayor cantidad de interacciones de puente de hidrógeno con residuos como E141 o W115, en comparación el ligando LaAc04 en la **Figura 11** aumenta la cantidad de interacciones con el cinc mediante 2 enlaces coordinantes y un puente salino, además de reemplazar una interacción tipo catión – pi por un puente de hidrógeno.

En los resultados de docking para la nECA, el anillo aromático provisto por el componente carbonílico 2-feniletanal en el ligando LaAc08 otorga una ventaja, ya que en nECA se encuentra formando interacciones tipo pi – pi con H361 en vez de estar expuesto al solvente como ocurre con la mayoría de los ligandos (**Figura 15** como ejemplo) tanto en nECA como en LasB.

Estos beneficios no se observan en todas las moléculas probadas que contienen el grupo bencilo, aunque con la variedad de ligandos y variaciones probados se puede definir una tendencia sobre qué grupos usar y cuales deben ser sus características para obtener un ligando de buena afinidad. Para comprobar los efectos de un grupo funcional en específico sería necesario realizar 24 cálculos (4! combinaciones) por ligando por variación y pruebas cruzadas entre ligandos.

Las mejoras en los puntajes y variación de poses de los ligandos 3, 4, 5 y 6 sobre las moléculas 1 y 2 es en parte debido a la presencia del grupo metilfosfonato, ya que este grupo forma un quelado con el cinc de los sitios activos de LasB y ECA con una Kps de 1.5×10^{-7} (respecto a la literatura), lo que deja libres a los otros grupos funcionales del ligando para interactuar con otros residuos del sitio activo como la H223 en LasB que coordina el cinc en el sitio activo, además que se facilita la interacción como receptor de puente de hidrógeno con varios residuos de importancia como S333, Y331 y G362 para el ligando LaAc06 en nECA.

Comparando para ECA los ligandos con sus derivados de mejor puntaje como LaAc08_2R (**Figura 5**) se puede observar que el uso de la prolina como componente ácido no es lo más útil, ya que la presencia de grupos funcionales tan rígidos no aporta demasiado a la pose final, de hecho, en la **Figura 13** se observa que el grupo *N*-metilalanina del ligando LaAc13_3R puede ser prescindible al interactuar con residuos irrelevantes, y en comparación el ligando LaAc08_1R de la **Figura 14** utiliza ácido acético en vez de la alanina *N* alquilada y es el ligando con mejor puntaje para la ECA, cumpliendo todos los filtros excluyentes en docking de receptor rígido y en docking por ajuste inducido.

Esto también se puede deducir al comparar los puntajes y poses de los ligandos LaAc08_1 y los ligandos LaAc11-13, en donde los ligandos LaAc12 en todas sus variedades presentaron puntajes malos e interacciones con residuos poco relevantes

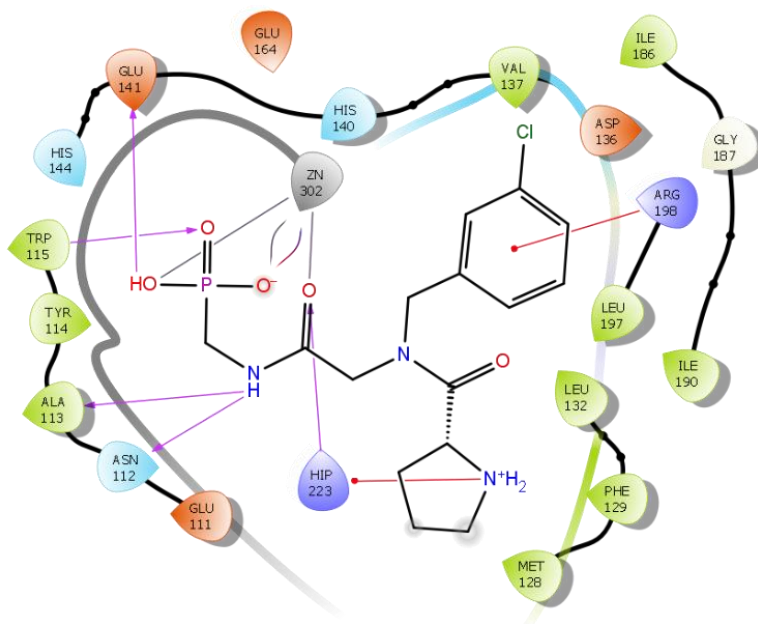


Figura 12. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc06 en LasB.

y de ahí que las variedades 2 y 3 de LaAc12 con sus variaciones en los centros quirales no tengan un puntaje asociado. Al respecto, en la mayoría de los casos los grupos funcionales voluminosos como bencilos o piridina suelen interactuar con residuos aromáticos o cationes, pero en el caso de los ligandos LaAc12 y LaAc13 el grupo lateral corresponde a un ciclopropilo y ciclopentilo, grupos limitados a interacciones débiles y de las cuales no se observaron en ninguna pose para ninguno de las metaloenzimas estudiadas. Además de esto, los resultados de docking para ambas metaloenzimas demuestra que los ligandos de mejor afinidad son los *N*-metilados, con indicios de que el mejor ácido a utilizar corresponde al ácido acético.

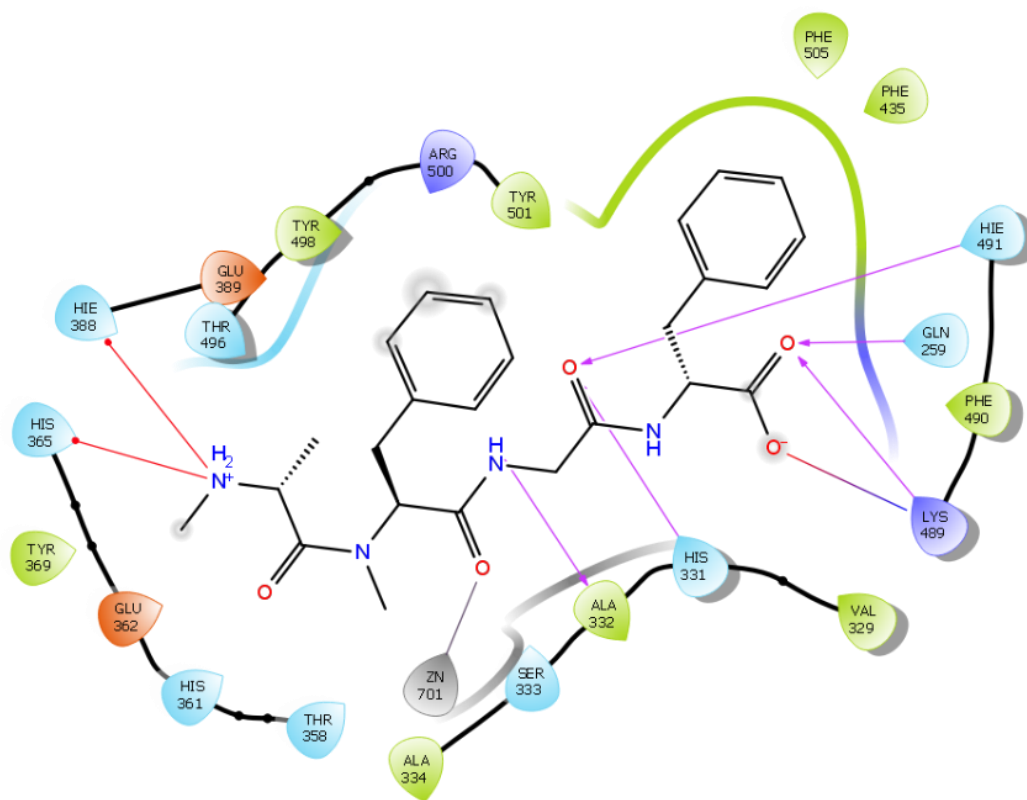


Figura 13. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc13_3R en nECA.

Las metaloenzimas estudiadas se encuentran relacionadas, aparte de su definición, en la forma en que los ligandos pueden interactuar en un organismo de ser estos utilizados como inhibidores. Las pruebas por docking de ajuste inducido y de receptor rígido nos permiten definir qué características propias de los ligandos sirven para cuál metaloenzima y otorga un estimado de afinidad, y algunos de estos ligandos poseen una afinidad relativamente alta tanto para nECA como para LasB, como el ligando LaAc13_3 para las conformaciones R y S, lo que puede resultar en efectos indeseados en el potencial uso de este ligando como un inhibidor de LasB.

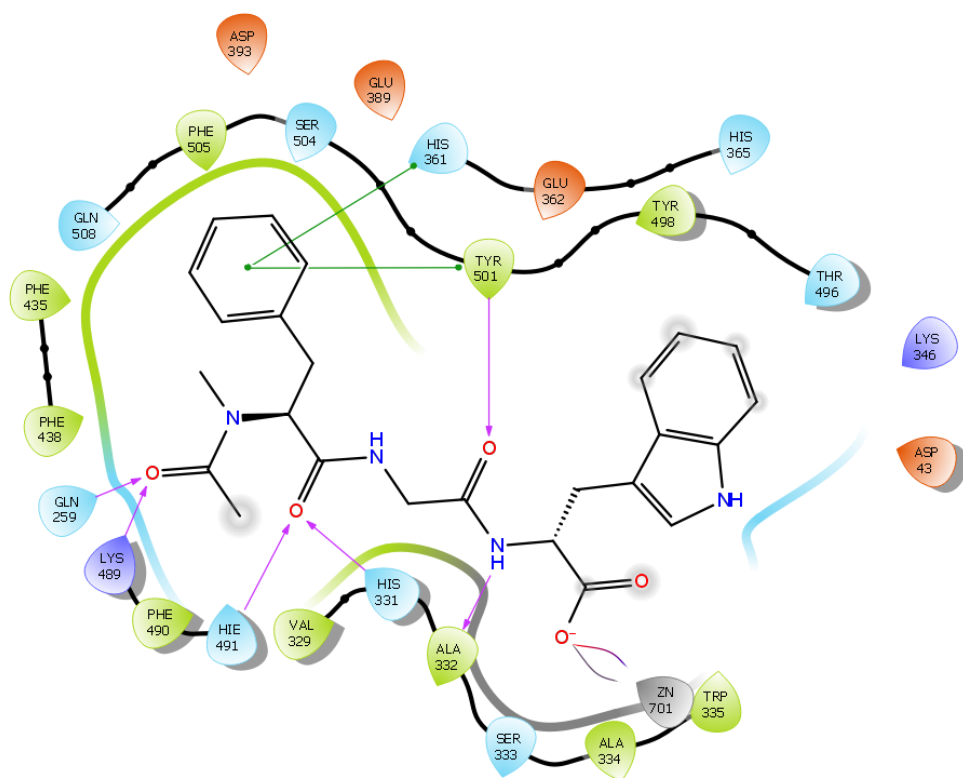


Figura 14. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc08_1R en nECA.

Los posibles efectos no deseados surgen en la mayoría de los casos en que un inhibidor de LasB puede ser utilizado como tratamiento, lo que sería en casos de infección oportunista de tejido conectivo, un hecho relativamente común en pacientes diabéticos crónicos.

Debido a la alta reactividad del grupo aldehído de la glucosa y a la elevada concentración de esta en pacientes diabéticos (>200 [mg dL⁻¹]) sostenidos por semanas en los casos más graves), las proteínas plasmáticas tanto como las proteínas de membrana de leucocitos, células endoteliales y terminales nerviosos

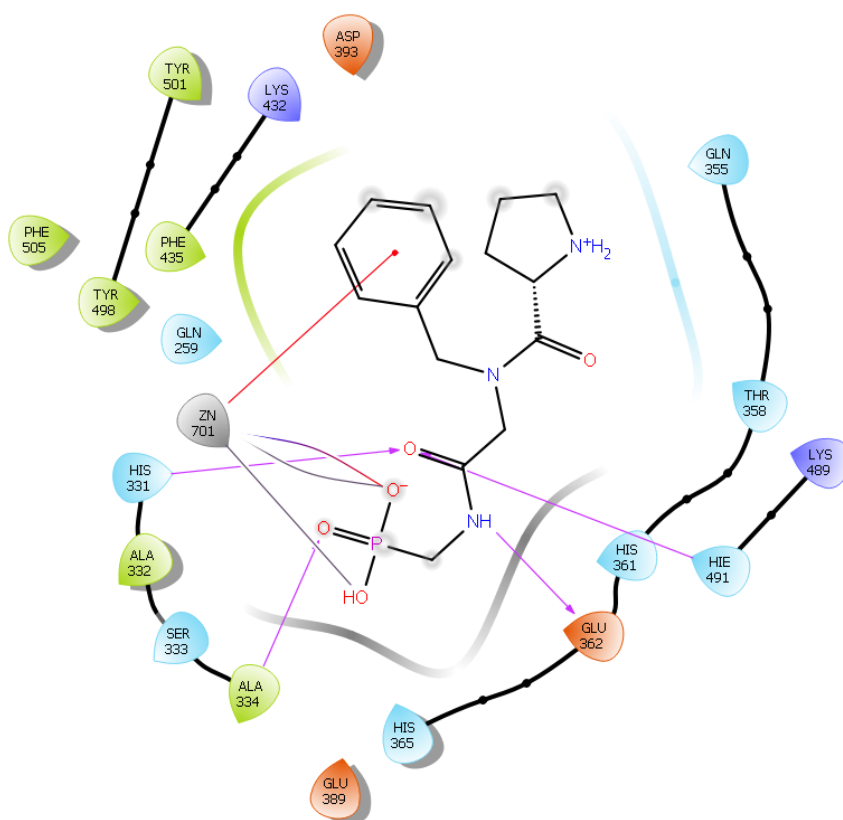


Figura 15. Mapa de interacciones, docking de ajuste inducido de LaAc04 en nECA.

sensitivos, la mayoría de las aminos expuestas al medio (Lisinas o grupos amino terminales, por ejemplo) reaccionan para formar la imina y posteriormente se forma una amina secundaria o producto de Amadori, que permanece unido hasta la degradación de la proteína.

Al tener terminales nerviosas sensitivas dañadas, el paciente crónico puede sufrir daño en sus extremidades y no sentirlas, lo que puede provocar que una herida pequeña no sea tratada ni desinfectada a tiempo. La elevada glicosilación de las proteínas plasmáticas de los leucocitos previene que estos puedan invadir estos tejidos dañados, lo que les da ventaja a las bacterias oportunistas como *P. aeruginosa* para invadir tejidos, derivando así en letales infecciones como el pie diabético. Además, la diabetes se ve asociada a daño arterial, provocando que los vasos sanguíneos pierdan flexibilidad y se genera una aterosclerosis, derivando en presión sanguínea elevada. Un paciente con diabetes mellitus tipo 2 crónico utiliza medicamentos como metformina para disminuir la glicemia, aspirina para prevenir la formación de coágulos y captopril para disminuir la presión arterial. En casos como el ligando LaAc13_3, un paciente con una infección recurrente en las extremidades puede aplicar el ligando de forma tópica (por ejemplo, debido a que *P. aeruginosa* libera LasB al medio como factor de virulencia, no tiene sentido administrar el ligando de forma oral si sólo funcionaría en daño tisular que puede derivar en casos graves de sepsis donde sería preferible optar por un tratamiento con antibióticos) podría estar absorbiendo este ligando y así podría provocar efectos alternos entre las medicaciones del paciente que ya recibe tratamiento con inhibidores de ECA, los que podrían competir entre sí y limitar el efecto de uno de estos.

Ligandos con afinidad para ambas metaloenzimas son incompatibles respecto al uso que se les puede dar, especialmente como inhibidores de LasB ya que teóricamente podrían generar efectos hipotensores indeseados, por lo que su uso puede limitarse

a inhibidores de ECA y en superficies funcionalizadas, pero no en productos de limpieza, debido a la exposición a un potencial inhibidor de nECA.

Estas conclusiones no consideran otros factores como metabolismo o la posible interacción con otras enzimas y proteínas plasmáticas, ya que esto consideraría estudios de actividad biológica y parámetros farmacocinéticos, lo que se escapa de los temas discutidos en este trabajo.

Dejando de lado ligandos de alta afinidad para ambas metaloenzimas como LaAc13, llegamos al ligando LaAc12 variedad 2, con puntaje de docking que lo sitúa al mismo nivel que los ligandos de efectividad conocida en la Tabla 3, con interacciones con los residuos clave definidos por análisis previos de IFPs para LasB. Al probar este ligando con la nECA las cosas cambian, ya que se puede ver en la Tabla 2 la falta de puntaje asociado a nECA porque las poses presentadas sólo ocurrían con el átomo de cinc y el átomo de magnesio presente de forma más interna en el bolsillo del sitio activo. Esto se puede explicar por el cambio de un grupo triptófano por una fenilalanina, eliminando de base las interacciones quelantes, puente de hidrógeno o puente salino en comparación a las interacciones pi (tipo T y stacking o catión – pi) e interacciones hidrofóbicas de menor potencia de la fenilalanina probada.

19. Conclusiones.

La biblioteca de ligandos diseñada presenta en ocasiones ligandos de puntajes altos, a veces con un puntaje similar al de inhibidores de eficacia conocida y de amplio uso farmacéutico como omapatrilat, habiendo ligandos como LaAc11_3 en sus dos variedades alcanzando un puntaje similar por ajuste inducido. Ligandos como

LaAc11, LaAc12 y LaAc13 en sus 6 variedades nos permiten evaluar casos de alta afinidad hacia ambas metaloenzimas estudiadas, existiendo el caso de LaAc12_2, que, en el caso de tener la posibilidad de utilizar un catalizador quiral para síntesis asimétrica, se podría desarrollar un ligando -en teoría- altamente selectivo a LasB.

Los resultados de la **Tabla 2** permiten deducir las características de los ligandos que permiten interactuar mejor con el sitio activo de nECA, LasB o ambos. Para el componente ácido, los mejores resultados se observan con un reactivo como la alanina *N*-metilada y ácido aspártico *N*-metilado para la ECA y con ácido acético para LasB. Para la LasB esto se debe a la carga positiva de la amina secundaria, similar a los ligandos LaAc01 – LaAc06, solo que en el caso de la prolina esta amina es más voluminosa y debido a que es parte de un heterociclo pirrolidina pierde grados de libertad, lo que previene la interacción de esta amina con el aspartato D221.

Para nECA el grupo acetilo proveniente ácido acético utilizado como componente ácido en el ligando LaAc08_1R (**Figura 15**) permite la interacción de puente de hidrógeno simultáneo con Q259 y K489, permitiendo la fijación en la 'pinza' de histidinas H331 y H491, dejando el componente ácido presentado por el isonitrilo modificado con triptófano interaccione con el cinc del sitio activo, cumpliendo con todos los requisitos importantes definidos como filtro, aunque el residuo del triptófano se expone al solvente, pudiendo solucionar esto reemplazando el triptófano por serina o glicina para los mismos efectos.

Aunque la afinidad entre estos ligandos con diferentes metaloenzimas es diferente, como la diferencia del L1_11b para LasB de la Tabla 3 es de dos órdenes de magnitud pasando de 0.47uM para LasB a 57uM para ECA, esto nos permite relacionar los

efectos de ciertos grupos funcionales al cambio en puntajes y poses, extrapolando estos efectos a la biblioteca de ligandos probados.^{54,55}

El control sobre la estereoquímica no tiende a ser relevante en la mayoría de los casos, aunque en situaciones como el ligando LaAc13_1R y LaAc12_2S (por el centro quiral formado por el aldehído utilizado) es el que presenta mejor selectividad hacia nECA que hacia LasB, con puntaje glide equivalente a -7,519 [kCal mol⁻¹] para nECA y -0,742 [kCal mol⁻¹] para LasB, mientras que el ligando LaAc12_2S presenta mejor afinidad para LasB que para nECA, siendo los puntajes para elastasa de -5.407 [kCal mol⁻¹] en comparación a 0 [kCal mol⁻¹] (hubieron poses presentadas pero ninguna de esas cumplía con más de una interacción limitante) para este ligando en nECA, siendo estos casos los más prominentes respecto a la posible selectividad si se llevara a cabo una síntesis asimétrica.

Por otra parte, el ligando LaAc12_3 en ambas configuraciones R y S se observa completa selectividad hacia LasB, con puntaje similar al del ligando L2_50 de la Tabla 3 con una K_i de 5,4 [μmol L⁻¹]. Al respecto, cabe aclarar que esta selectividad observada es sólo respecto a los puntajes, ya que para definir una verdadera selectividad sería necesario realizar pruebas de actividad biológica y en este estudio sólo nos dedicamos al análisis de resultados *in silico* y la síntesis de algunos de estos compuestos.

En la **Tabla 3** de resultados de ajuste inducido se observa que aquellos ligandos relativamente pequeños como LaAc03 – 06 derivan en puntajes elevados, semejantes a los observados en la **Tabla 4** de ligandos de efectividad conocida en las enzimas probadas, aunque no mejores que los ligandos LaAc08_1 y LaAc11_3. Estos últimos ligandos son los que obtuvieron mejores puntajes que cualquier los

otros ligandos y variedades probadas. La baja solubilidad del producto de precipitado entre el fosfonato y el catión Zn^{+2} es una de las razones por las que los ligandos que poseen este grupo funcional no varían mucho en las poses, en comparación a otros ligandos más complejos.

Debido a la alta estabilidad del producto de precipitado entre fosfonato y Zn^{+2} , el algoritmo prioriza las poses en las que hay interacciones entre estas partes y se aprecia una falta de variedad en las poses que los ligandos con este grupo funcional pueden mostrar. Una de las razones por las que se diseñaron ligandos idénticos fue para buscar si la adición del halogenuro al grupo bencilo de la amina provocaba alguna mejora en las poses y puntajes, caso que no se vio. La mayoría de las variaciones de las poses que permitían que el grupo bencilo interactuara con residuos definidos como limitación en vez de verse expuesto al solvente, las poses vieron una ligera disminución de puntaje porque para llegar a esa posición dentro del sitio activo, un átomo de oxígeno del fosfonato deja de coordinar con el metal y se reemplaza esa interacción por una de tipo catión- π entre el *m*-clorobencilo y R198 en LasB para el ligando LaAc06. El tener un ligando de mayor complejidad/tamaño y con mayor variedad de grupos funcionales como LaAc08 da una mayor posibilidad de cumplir con las limitaciones en el sitio activo en una mayor cantidad de poses, pudiendo cumplir con estas en una variedad de posiciones, permitiéndole así interactuar con el bolsillo del sitio activo de manera más libre, potencialmente dificultando la expulsión del ligando por crecientes concentraciones del sustrato de la metaloenzima (LasB o nECA). De cierta forma, la ausencia de grupos que forman productos insolubles le permitió a otros ligandos cumplir con las limitaciones en más de una posición con pequeñas variaciones. Al intercambiar la prolina como componente ácido se obtuvo en la mayoría de los casos un grupo flexible y aceptores o dadores de enlace de hidrógeno, mientras que la mayoría de los ligandos con 3 variedades de isonitrilo (isocianoacetato de etilo combinado con triptófano, tirosina y fenilalanina) ofrecen un

carboxilato capaz de coordinar el catión Zn^{+2} en conjunto a un oxígeno de las 3 amidas disponibles en la estructura del ligando, lo que le permite encontrar una mayor cantidad de poses en las que el cinc se encuentra quelado con 2 o más oxígenos.

En el diseño de la mayoría de los ligandos considera el uso de carbonilos simples como propanona o metanaldehído, y estos ligandos obtienen en su mayoría poses de puntaje similar entre sí para LasB y nECA, como se puede ver en la **Tabla 2**. Aunque la mayoría de estos ligandos dan resultados buenos, respecto a las interacciones y su comparación a los ligandos de la **Tabla 4** de efectividad conocida, se observa selectividad sólo en los casos que usaron un aldehído voluminoso, e incluso la selectividad de la enzima a estereoisómeros o la selectividad entre enzimas para un ligando.

La selectividad de la enzima hacia un producto R o S nos lleva a preguntarnos si, de ser posible llevar a cabo una síntesis asimétrica de productos R y S, la diferencia en las actividades (provista la posibilidad de hacer pruebas de actividad biológica) será igual de marcada como lo observado en docking, y puede ayudar de esa forma a obtener mejores resultados de toxicidad entre las conformaciones del producto en vez de probar con un racemato. La importancia de la selectividad entre metaloenzimas es importante si el ligando es altamente selectivo para LasB y con baja o nula actividad para la ECA en sus variedades. Esto por las potenciales aplicaciones de estos principios activos como un agente bacteriostático, para tratar infecciones o de ser usado en superficies como un aerosol, este principio activo pueda generar efectos hipotensores sobre personas expuestas, poniendo en riesgo la salud, mientras que si este principio activo es utilizado como tratamiento hipotensor además se podría contar con el beneficio de que este ligando previene la colonización de bacterias en los tejidos del paciente.

20. Referencias.

1. OMS | Medicina tradicional [Internet]. WHO. 2013. [citado 2 de febrero de 2017]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/.
2. OMS| Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. WHO. 2013 [citado 2 de febrero de 2017]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/.
3. Mackowiak, P. (2000). Brief History of Antipyretic Therapy, Clinical Infectious Diseases, Volume 31, Issue Supplement_5, Pages S154–S156.
4. Croteau, R., Kutchan, T., and Lewis, N. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan, Gruissem, Jones (editores). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. Capítulo 24.
5. Ventola, C. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P & T: a peer-reviewed journal for formulary management, 40(4), 277–283.
6. Chen, A., Adamek, R., Dick, B., Credille, C., Morrison, C., and Cohen, S. (2019). Targeting Metalloenzymes for Therapeutic Intervention. Chemical reviews, 119(2), 1323–1455.

7. Kim, J; Rees, DC (1992). Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science*. 257 (5077): 1677–82.
8. Fountain JH, Lappin SL. (2019). Physiology, Renin Angiotensin System. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Enero de 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>
9. Human Protein Atlas. Disponible en: proteomics.csb.cmu.edu/ENSG00000159640-ACE/tissue
10. Acharya, K., Sturrock, E., Riordan, J., Ehlers, M. (2003). Ace Revisited: A New Target for Structure-Based Drug Design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (11), 891–902.
11. Anthony, C., Masuyer, G., Sturrock, E. and Acharya, K. (2012). Structure Based Drug Design of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 19, 845–855.
12. Cushman, D. (1992). Development and Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. 49, 1390–1394.
13. Heeg, J., de Jong, P., van der Hem, G., de Zeeuw, D. (1989). Efficacy and variability of the antiproteinuric effect of ACE inhibition by lisinopril. *Kidney Int* ,36 (2), 272.
14. Ferguson, R., Vlasses, P. (1981) Clinical pharmacology and therapeutic applications of the new oral angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril. *Am. Heart J.* 101 (5), 650.

15. Cushman, D., Cheung, H., Sabo, E., Ondetti, M. (1982). Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Am. j. cardiol.* 49 (6), 1390.
16. Nicolau, C., Prorock, A., Bao, Y., Neves-Ferreira, A., Valente, R. and Fox, J. W. (2018). Revisiting the Therapeutic Potential of Bothrops jararaca Venom: Screening for Novel Activities Using Connectivity Mapping. *Toxins*, 10(2), 69.
17. Cushman, D., Ondetti, M. (1999) Design of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. *Nat Med*, 5 (10), 1110–1112.
18. Ferguson, R., Vlasses, P. (1981). Clinical pharmacology and therapeutic applications of the new oral angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril. *Am. Heart J.* 101 (5), 650.
19. Cushman, D., Ondetti, M. (1999). Design of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. *Nat Med*, 5 (10), 1110–1112.
20. A. Patchett. (1980). A New Class of ACE Inhibitors. *Nature*, 288, 280–283.
21. Wang, X., Wu, S., Xu, D., Xie, D., Guo, H. (2011). Inhibitor and Substrate Binding by Angiotensin-Converting Enzyme: Quantum Mechanical/molecular Mechanical Molecular Dynamics Studies. *J. Chem. Inf. Model.* 51 (5), 1074–1082.

22. Cushman, D., Cheung, H., Sabo, E., Ondetti, M. (1977). Design of Potent Competitive Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. Carboxyalkanoyl and Mercaptoalkanoyl Amino Acids. *Biochemistry*, 16 (25), 5484–5491.
23. Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D., & Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551–554.
24. Kröger, W., Douglas, R., O'Neill, H., Dive, V., Sturrock, E. (2009) Investigating the Domain Specificity of Phosphinic Inhibitors RXPA380 and RXP407 in Angiotensin-Converting Enzyme. *Biochemistry*, 48 (35), 8405–8412.
25. Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, 3(9), 541-548.
26. Travis, J., & Potempa, J. (2000). Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 35-50.
27. Nishino, N., & Powers, J. C. (1980). *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Development of a new substrate, inhibitors, and an affinity ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 255(8), 3482-3486.
28. Boyd, A., Chakrabarty, A. M. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of industrial microbiology*, 15(3), 162–168.

29. Kessler, E., Israel, M., Landshman, N., Chechick, A., & Blumberg, S. (1982). In vitro inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase by metal-chelating peptide derivatives. *Infection and immunity*, 38(2), 716-723.
30. Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., & Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, 16(25), 5484-5491.
31. Morihara, K., & Hiroshige, T. (1971). Comparative study of various neutral proteinases from microorganisms: specificity with oligopeptides. *Archives of biochemistry and biophysics*, 146(1), 291-296.
32. Cathcart, G. R., Quinn, D., Greer, B., Harriott, P., Lynas, J. F., Gilmore, B. F., & Walker, B. (2011). Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), 2670-2678.
33. Cathcart, G. R., Gilmore, B. F., Greer, B., Harriott, P., & Walker, B. (2009). Inhibitor profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB using N-alpha mercaptoamide template-based inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(21), 6230-6232.
34. Pelay-Gimeno, M., Glas, A., Koch, O., Grossmann, TN. (2015). Structure-Based Design of Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Mimicking Peptide Binding Epitopes. *Angewandte Chemie* 54 (31): 8896-927. PMC 4557054. PMID 26119925.

35. Marshall, G., and Ballante, F. (2017). Limiting Assumptions in the Design of Peptidomimetics. *Drug Development Research*, 78(6), 245–267.
36. Zuend, S., Coughlin, M., Lalonde, M., Jacobsen, E. (2009). Scaleable catalytic asymmetric Strecker syntheses of unnatural α -aminocids. *Nature* 461 (7266): 968-970.
37. Kobayashi, S., Ishitani, H., & Ueno, M. (1998). Catalytic Asymmetric Synthesis of Both Syn- and Anti- β -Amino Alcohols. *Journal of the American Chemical Society*, 120(2), 431–432.
38. Dömling, A. and Ugi, I. (2000). Multicomponent reactions with isocyanides. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 3168–3210.
39. Passerini, M. (1921). Isonitriles. II. Compounds with aldehydes or with ketones and monobasic organic acids. *Gazz. Chim. Ital.* 51, 181–189
40. Banfi, L. & Riva, R. (2005). The Passerini reaction. *Org. React.* 65, 1.
41. Banfi, L., Basso, A., Lambruschini, C., Moni, L. and Riva, R. (2021) The 100 facets of the Passerini reaction. *Chem. Sci.* 12, 15445-15472.
42. Ugi, I. (1962). The α -addition of immonium ions and anions to isonitriles accompanied by secondary reactions. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1(1), 8-21.

43. Waki, M. and Meienhofer, J. (1977). Peptide synthesis using the four-component condensation (Ugi reaction). *J. Am. Chem. Soc.* 99, 6075–6082.
44. Méndez, Y., Pérez-Labrada, K., González-Bacerio, J., Valdés, G., de los Chávez, M. Á., Osuna, J., ... & Rivera, D. G. (2014). Combinatorial Multicomponent Access to Natural-Products-Inspired Peptidomimetics: Discovery of Selective Inhibitors of Microbial Metallo-aminopeptidases. *ChemMedChem*, 9(10), 2351-2359
45. Beck, B., Hess, S., and Dömling, A. (2000) One-pot synthesis and biological evaluation of aspergillamides and analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 1701–5.
46. Tukulula, M., Njoroge, M., Mugumbate, G. C., Gut, J., Rosenthal, P. J., Barteau, S., ... & Chibale, K. (2013). Tetrazole-based deoxyamodiaquines: synthesis, ADME/PK profiling and pharmacological evaluation as potential antimalarial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(17), 4904-4913.
47. Prent-Peñaloza, L., De la Torre, A. F., Velázquez-Libera, J. L., Gutiérrez, M., & Caballero, J. (2019). Synthesis of diN-Substituted Glycyl-Phenylalanine Derivatives by Using Ugi Four Component Reaction and Their Potential as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Molecules*, 24(1), 189.
48. Caballero, J. (2020). Considerations for Docking of Selective Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Molecules*, 25(2), 295.
49. Velázquez-Libera, J., Murillo-López, J., Fernández, A. and Caballero, J. (2019). Structural Requirements of N-alpha-Mercaptoacetyl Dipeptide (NAMdP) Inhibitors

of *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Factor LasB: 3D-QSAR, Molecular Docking, and Interaction Fingerprint Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6133.

50. Koshland, D. (1958). Application of a theory enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 44 (2): 98–104.

51. D'Urzo, N., Martinelli, M., Pezzicoli, A., De Cesare, V., Pinto, V., Margarit, I., Maione, D. (2014). Acidic pH Strongly Enhances In Vitro Biofilm Formation by a Subset of Hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2176–2185.

52. Gulevich, A., Zhdanko, A., Orru, R. and Nenajdenko, V. (2010). Isocyanoacetate Derivatives: Synthesis, Reactivity, and Application. *Chemical Reviews*, 110(9), 5235–5331.

53. Friesner, R., Banks, J., Murphy, R., Halgren, T., Klicic, J., Mainz, D., Repasky, M., Knoll, E., Shelley, M., Perry, J., Shaw, D., Francis, P., Shenkin, P. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, *J. Med. Chem.*, 47, 1739-49.

54. Hanessian, S., Guesné, S., Riber, L., Marin, J., Benoist, A., Mennecier, P., Nanteuil, G. D. (2008). Targeting ACE and ECE with dual acting inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(3), 1058–1062.

55. Jullien, N., Makritis, A., Georgiadis, D., Beau, F., Yiotakis, A., & Dive, V. (2010). Phosphinic Tripeptides as Dual Angiotensin-Converting Enzyme C-Domain and Endothelin-Converting Enzyme-1 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(1), 208–220.
56. Leiris, S., Davies, D. T., Sprynski, N., Castandet, J., Beyria, L., Bodnarchuk, M. S., Everett, M. (2021). Virtual Screening Approach to Identifying a Novel and Tractable Series of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12(2), 217–227.
57. Konstantinović, J., Yahiaoui, S., Alhayek, A., Hauptenthal, J., Schönauer, E., Andreas, A., ... & Hirsch, A. K. (2020). N-Aryl-3-mercaptosuccinimides as antivirulence agents targeting *Pseudomonas aeruginosa* elastase and *Clostridium* Collagenases. *Journal of medicinal chemistry*, 63(15), 8359–8368.