



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
EL MODELADO MOLECULAR COMO
HERRAMIENTA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE
NUEVOS FÁRMACOS QUE INTERACCIONAN CON
PROTEÍNAS**

Autor: Claudia Hernández Robledo

Fecha: Febrero 2020

Tutor: Giorgio Giorgi

ÍNDICE

1. Resumen	3
Abstract	3
2. Introducción y antecedentes	3
2.1 Modelado molecular	3
2.2 Etiología y patogénesis de la enfermedad de Alzheimer	5
2.3 Dianas terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer	5
3. Objetivos	8
4. Material y métodos	9
5. Resultados y conclusiones	9
6. Discusión	17
7. Bibliografía	18

1. RESUMEN

Uno de los objetivos del modelado molecular en el ámbito farmacológico consiste en el análisis de ciertas dianas terapéuticas a fin de encontrar el mejor diseño posible para que nuestra molécula interactúe de la forma más eficaz con dicha diana y desencadene el efecto deseado.

En esta revisión bibliográfica daremos pie a esta técnica en el campo de la investigación de nuevos fármacos que interactúan con proteínas, en concreto los inhibidores de colinesterasas, utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, describiendo los métodos utilizados, los logros conseguidos hasta la actualidad, y nuevas perspectivas de cara al futuro.

Palabras clave: modelado molecular, Alzheimer, acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, *docking*

ABSTRACT

One of the objectives of molecular modelling regarding the pharmacology field consists on the analysis of concrete therapeutic targets in order to find the best design for our molecule to interact as effectively as possible with the aforesaid target and trigger a desired effect.

In this literature review we will lead to describing this technique on the research field of new drugs which interact with proteins, in particular cholinesterase inhibitors, used in the treatment of Alzheimer's disease, passing through the methods used, goals achieved to today, and future perspective.

Key words: molecular modelling, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, *docking*

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Modelado molecular

El modelado molecular consiste en una serie de métodos teóricos y técnicas computacionales las cuales son utilizadas para simular el comportamiento de moléculas y sistemas moleculares. Hasta hace unos pocos años, somos conscientes de que la síntesis de nuevos compuestos que tenían como finalidad unirse a una diana, era al azar o, en cualquier caso, motivada por el estudio de los efectos en la actividad farmacológica que tenían las variaciones en la estructura de los ligandos conocidos. Este campo ha cambiado enormemente en los últimos años gracias a numerosos avances que han dado pie al reconocimiento y análisis de variadas dianas, así como sus estructuras, lo que permite un mejor diseño de sus correspondientes ligandos, ya sean inhibidores, agonistas, etc ^[1].

Existen bastantes métodos para construir estructuras que luego nos permitan llevar a cabo los ensayos pertinentes de cara a una investigación, en este caso la mejor interacción fármaco-diana. Estas técnicas son algo complejas y en su mayoría con un gran componente matemático y computacional, pero nos van a permitir utilizar la información de una determinada molécula para crear modelos en tres dimensiones de receptores y ligandos, observar sus prioridades conformacionales, describir su naturaleza y la dimensión de fuerzas interatómicas. Así, esto nos va a permitir vislumbrar el comportamiento de estos sistemas y con ello podremos realizar algunas predicciones cuantitativas de cara al diseño de nuevas moléculas. Todo esto además nos acerca a la realidad, a lo que de verdad ocurriría in vivo ^[2].

En la **(Tabla 1)** podemos ver la evolución de las técnicas computacionales en base al conocimiento o no de los receptores y sus respectivos ligandos.

<i>ESTRUCTURA DEL LIGANDO</i>	<i>ESTRUCTURA DEL RECEPTOR</i>	
	<i>CONOCIDA</i>	<i>DESCONOCIDA</i>
<i>CONOCIDA</i>	Interacciones ligando-receptor	Modelos de farmacóforos
	Dinámica Molecular y Técnicas de <i>docking</i>	Búsquedas 3D basadas en el ligando/ farmacóforo
		QSAR 2D y 3D
<i>DESCONOCIDA</i>	Diseño <i>de novo</i>	Generar estructuras en 3D
	Búsquedas 3D basadas en el diseño	Medidas de Similitud y Diversidad Molecular
		Química Combinatoria

Tabla (1): técnicas computacionales usadas en el modelado molecular.

Una de las técnicas más utilizadas en la investigación de nuevos fármacos a día de hoy es el *docking* molecular, que se basa en la predicción de las formas de unión predominantes de un ligando con una proteína de estructura tridimensional conocida. Las técnicas para un acoplamiento adecuado consisten en la búsqueda de espacios dimensionales y la utilización de una función de puntaje que clasifique los acoplamientos que puedan ser candidatos.

De cara a las perspectivas de este trabajo, nos centraremos en una clase de fármacos concreta, los inhibidores de colinesterasas, utilizados actualmente como tratamiento en la enfermedad de Alzheimer, repasando estudios pasados o actuales basados principalmente en el diseño *de novo* y el *docking* molecular, ya mencionado anteriormente.

2.2 Enfermedad de Alzheimer: etiología y patogénesis

La enfermedad de Alzheimer (EA) se trata de una patología neurodegenerativa que normalmente se desarrolla en personas de avanzada edad. Se trata de un problema de salud pública que ha ido creciendo desmesuradamente en las últimas décadas, y que deriva de la alta esperanza de vida y las condiciones socioeconómicas favorables [3].

Las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad abarcan perturbaciones en las áreas de la memoria y el lenguaje, la orientación espacial y funciones de ejecución complejas. Además, también se producen cambios no cognitivos en las personas que padecen esta patología, así como cambios en la personalidad, psicosis, cambios bruscos de humor, y trastornos del sueño, entre otros.

De cara a la patogénesis de la EA, destacaremos la acumulación de placas del péptido β -amiloide, aunque otras alteraciones tales como la agregación de proteínas τ o estrés oxidativo también juegan un papel importante. El péptido β -amiloide parece resultar tóxico para las neuronas, directa o indirectamente, causando inflamación y la generación de radicales libres.

Por otro lado, ya en estados avanzados, contemplamos una disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa por encima del 90% dando lugar a gran parte del deterioro cognitivo y mnésico. La degeneración del núcleo basal de Meynert, que resulta ser la eferencia colinérgica hacia el neocórtex más importante, es la responsable del déficit progresivo en la memoria anterógrada. Se han comprobado cambios precoces en el flujo cerebral regional, lo que puede estar ligado al declive de la población colinérgica reguladora [4]. Por otra parte, la actividad butirilcolinesterásica, comparada con su enzima hermana experimenta un aumento aparente, o en ciertos casos incluso permanece inalterada, y aún así, se presenta como uno de los *targets* de la terapia farmacológica de la EA.

2.3 Dianas terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer

Ya que la EA se caracteriza primordialmente por una pérdida de neuronas colinérgicas en el cerebro, así como bajos niveles de acetilcolina en el espacio sináptico, la principal estrategia terapéutica para esta patología es el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa, con el fin de tratar los síntomas, pues todavía no existe una cura. Puesto que numerosos procesos fisiológicos vinculados a la EA afectan y destruyen células que producen y utilizan la acetilcolina reduciendo la suma disponible para entregar los mensajes a otras células, al inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa conseguiríamos mantener los niveles de acetilcolina reduciendo su índice de ruptura. Por lo tanto, estimulan la transmisión colinérgica en áreas frontales del cerebro compensando así la pérdida de neuronas funcionales.

Existen varias dianas que han sido objeto de estudio en el tratamiento de la EA a lo largo de los años. Las más relevantes, y probablemente las que más han dado resultados en la búsqueda de nuevos fármacos son las colinesterasas (ChE): Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa, siendo además el punto clave de este trabajo, en el que analizaremos algunas de las estrategias que se están utilizando para mejorar el perfil de eficacia de los inhibidores de estas enzimas utilizando el modelado molecular.

2.3.1 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima, concretamente una serina hidrolasa localizada en la membrana post-sináptica, que tiene un papel fundamental en la finalización de la transmisión de impulsos en el sistema nervioso central y periférico. Esto lo hace mediante una rápida hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) que es liberada al espacio sináptico, dando lugar a colina y ácido acético, siendo esta reacción imprescindible para que dichas neuronas colinérgicas vuelvan a su estado de reposo tras su activación. Por otro lado, la colina que se ha liberado de la reacción anteriormente mencionada es recaptada por el nervio presináptico y se vuelve así a sintetizar ACh combinándose con acetil coA gracias a la intervención de la colina acetiltransferasa (**Fig 1**) [5].

El sitio activo de la AChE se compone de un sitio catalítico aniónico (CAS), integrado a su vez por la triada Ser203, His447 y Glu534, y un subsidio aniónico que contiene los residuos de los aminoácidos Trp84, Tyr130, Tyr330 y Phe331. En el borde del surco, se encuentra el sitio aniónico periférico (PAS) compuesto por los residuos Tyr70, Tyr121, Trp279, Tyr334 y el negativamente cargado Asp74 (**Fig 2.**)

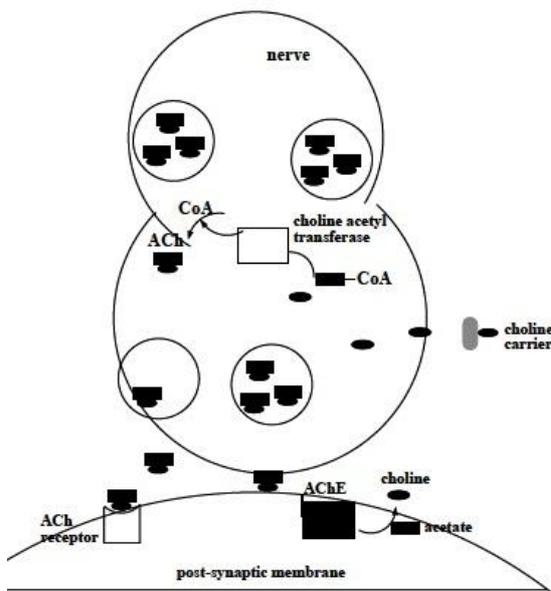


Fig (1). Ciclo de la acetilcolina en la neurotransmisión.

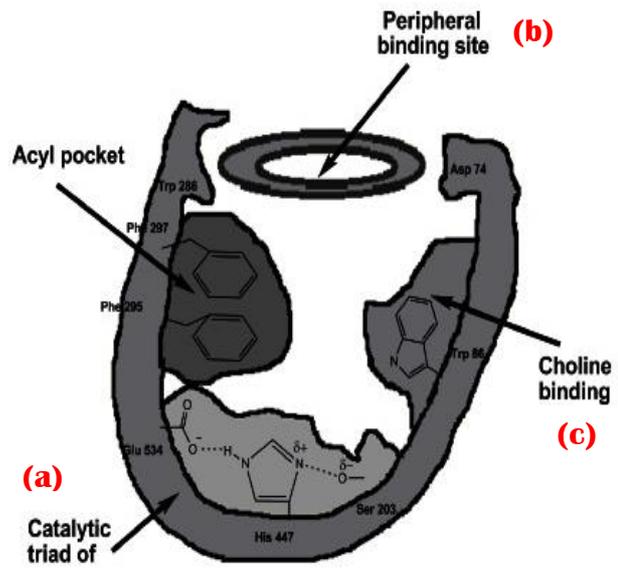


Fig (2). Esquema de la estructura de la AChE: CAS (a), PAS (b), sitio de unión de la ACh (c)

2.3.2 Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa (BuChE) es una hidrolasa de función no perfectamente definida, pero que juega un rol medianamente relevante en la EA pues su función se ve disminuida, aunque en ciertas ocasiones permanece intacta siendo la función de la AChE la única que decrece.

Opera de la misma manera que su esterasa hermana ya mencionada, hidrolizando las moléculas de ACh para finalizar la neurotransmisión.

En el cerebro humano se encuentra principalmente en la materia blanca, células gliales y poblaciones neuronales de la amígdala, hipocampo y tálamo, implicadas directamente en el conocimiento y el comportamiento [6]. Muchos de los síntomas se deben a la asociación de placas del péptido β -amiloide con esta enzima (**Fig 3**), cosa que no se observa en cerebros perfectamente sanos.

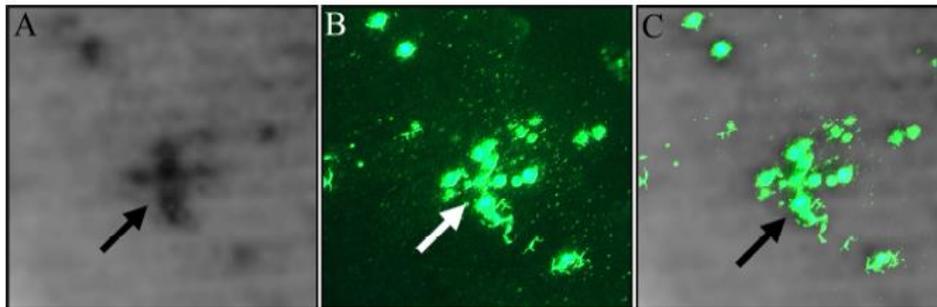
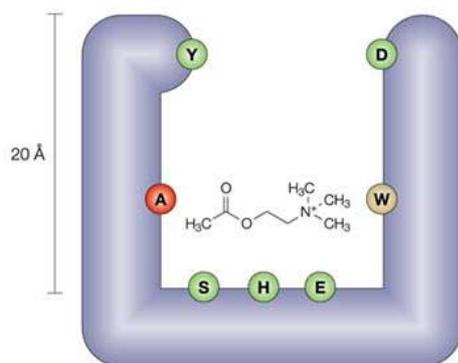


Fig (3). Imágenes del córtex cerebral con EA, revelado con fenil 4-¹²³I-yodofenilcarbamato (A), agregados fibrilares de péptido β -amiloide (B), y la fusión de ambos (C).

Respecto a su estructura, la BuChE humana está compuesta por un resto de serina, Ser198, en su centro catalítico y que trabaja juntamente con restos de Glutamato (Glu325) e Histidina (His438) adyacentes para dar lugar a un intermediario tetraédrico a partir del grupo carbonilo de la molécula de ACh. En los alrededores del valle encontramos un residuo aniónico de Aspartato, Asp70, que interacciona con el ester catiónico de la ACh y que indudablemente dirige al sustrato a la porción catalítica. Además, el nitrógeno cuaternario de la ACh interacciona con un residuo de Triptófano (Trp82) que se sitúa en el sitio aniónico ya mencionado (**Fig 4**).



Nature Reviews | Neuroscience

Fig (4). Esquema de la estructura de la BuChE: (S) serina, (H) histidina, (E) glutamato, (A) bolsillo de acilo, (W) triptófano, (Y) tirosina, (D) aspartato

La investigación alrededor de la inhibición de esta enzima ha dado lugar a ciertos avances en la terapia de la EA, los cuales veremos en el apartado de resultados, pero que aún están por demostrar resultados in vivo.

2.3.3 Fármacos aprobados para el tratamiento de la EA

Antes de presentar los estudios revisados, debemos ponernos en antecedentes, pues muchos de estos estudios han utilizado moléculas ya aprobadas y utilizadas en la terapia contra la EA, y a partir de ellas han introducido las pertinentes modificaciones con el fin de modificar su eficacia, rendimiento, etc.

De los fármacos que tenemos al alcance hoy en día, uno de los utilizados en el tratamiento de primera línea es el donepezilo. Se trata de una piperidina que actúa como inhibidor reversible no competitivo de nuestras enzimas estrellada ^[7]. Se ha demostrado que el donepezilo además de mermar los síntomas de demencia, mejora la función cognitiva, e incluso retrasa el deterioro a nivel mental.

Por otro lado, tenemos la rivastigmina, un carbamato pseudo-irreversible que tiene actividad inhibidora de la AChE y la BuChE selectivamente a nivel cerebral, concretamente en el hipocampo y córtex que es donde los bajos niveles de ACh son más acentuados ^[8]. Además, teniendo en cuenta la baja unión a proteínas que posee, nos interesa especialmente pues la producción de interacciones eventuales con otros fármacos es casi inexistente, siendo de gran importancia en la población diana de este tratamiento, pues las personas ancianas suelen estar polimedizadas. Varios estudios demuestran que el tratamiento temprano y continuado con rivastigmina aumenta los efectos beneficiosos percibidos contra el deterioro cognitivo y la demencia.

Por último, tenemos la tacrina, la cual fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la EA. Se trata de un inhibidor reversible y considerado un farmacóforo de inhibidor de colinesterasa clásico. Además, también se han observado otros efectos farmacológicos como el bloqueo de los canales de calcio, y la inhibición de la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina. Aun así, no está extensivamente utilizado por una serie de efectos adversos y toxicidad registrados durante la fase clínica, pero la molécula se está empleando como modelo para la síntesis de nuevos análogos que veremos a continuación

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son la revisión de artículos publicados en diversas plataformas científicas sobre el diseño de nuevos fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa que tengan como objetivo una mejora en las características de los ya existentes, o la síntesis *de novo*, para una mayor efectividad o eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Concretamente nos centraremos en el modelado molecular, así como en el uso de herramientas computacionales que nos permitan entender los modos de inhibición de las colinesterasas con el fin de predecir los compuestos más adecuados para tal fin.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Al tratarse de una revisión bibliográfica, no se ha llevado a cabo ningún acto experimental, por lo tanto, se han utilizado únicamente fuentes como bases de datos, libros y sitios web científicos oficiales. Estos fueron: PubMed, SciELO, Google Scholar, Science direct, ResearchGate y la web oficial de la AEMPS.

Los criterios de búsqueda principales fueron *molecular modeling AND acetylcholinesterase AND/OR butyrylcholinesterase; molecular modeling AND Alzheimer's disease; molecular modeling AND cholinesterase inhibitors*. Como términos de exclusión están todos aquellos artículos que hablaran de tratamientos para la EA que no fueran inhibidores de colinesterasas. Sólo se realizaron búsquedas en inglés, a excepción de dos referencias, pues se consideró que el rango de artículos y publicaciones sería más amplio y completo.

5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La búsqueda de potentes inhibidores de estas enzimas, y sobre todo específicos, llegó a centrar las investigaciones en los compuestos *N*-10-carbonil derivados de fenotiazina. Se trata de inhibidores reversibles y que bloquean la unión del sustrato al sitio activo, incorporándose al anillo tricíclico de la fenotiazina mediante enlaces π - π , con residuos de aminoácidos aromáticos [9].

En la (Fig 5) contemplamos el área de la molécula de tacrina (1) que es apta para su modificación mediante bioisosterismo, siendo el núcleo de quinolina el grupo farmacóforo (a). Esta región aromática es la que interacciona con los inhibidores de AChE mediante interacciones varias como ión-dipolo y puentes de hidrógeno. Estudios realizados por Pang *et al* se llevaron a cabo para determinar la táctica de la doble interacción entre el inhibidor y

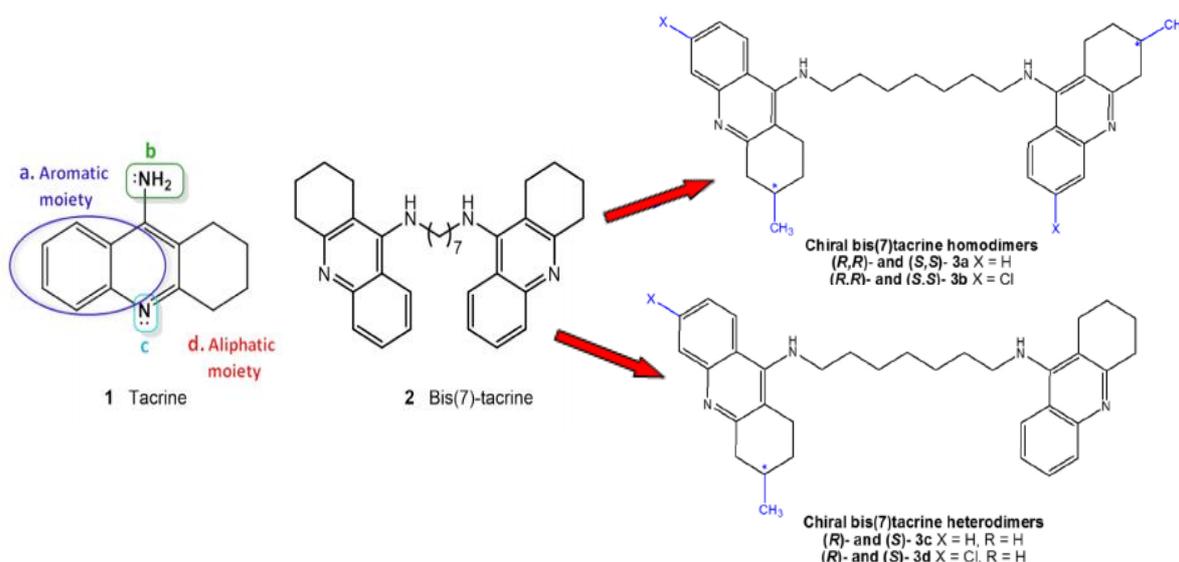


Fig (5). Estructuras de la tacrina (1), Bis (7)-tacrina (2) y los dímeros quirales obtenidos (3a-3d)

la enzima, y encontraron que las cadenas metilénicas espaciadoras unidas a dos moléculas de tacrina admitían una doble interacción simultáneamente con el sitio catalítico aniónico (CAS) y el sitio aniónico periférico (PAS). Así, los compuestos obtenidos tras esta unión, a lo que llamaron Bis(7)-tacrina (**2**), demostró ser 1500 veces más potente que la tacrina sola.

Tras llevar a cabo la síntesis química de estos dímeros quirales de tacrina, se llegó a la conclusión de que los dos grupos de enantiómeros eran fuertes inhibidores de colinesterasas, y cuya IC₅₀ se encontraba en concentraciones nanomolares. Por otro lado, el compuesto (*R,R*)-3b (X = Cl) demostró ser el que más actividad presentaba frente al resto de análogos de su grupo, y el heterodímero (*R*)-3d (X = Cl) el más activo del total de moléculas, con unas IC₅₀ de 4.73 nM y 2.80 nM respectivamente. Ambos resultaron ser más activos que la Bis (7)-tacrina.

Comparando las estructuras químicas y moleculares de todos los análogos, se llegó a ver que la presencia de un átomo de Cl aumentaba la actividad inhibitoria contra la AChE, salvo alguna excepción, y además influía directamente sobre la inhibición de la BuChE, viendo que el rendimiento disminuía en todos los grupos de compuestos, pero sin afectar significativamente a la serie (*S*) de homodímeros.

Con respecto a la estereoselectividad, las moléculas que presentaron mayor afinidad por la AChE fueron el grupo de compuestos con isomería (*R*) con un átomo de Cl en la fracción de tacrina, y por el conjunto de isómeros (*S*) sin este Cl. Esta variación de afinidad entre los distintos estereoisómeros nos apunta a que la AChE tiene cierta preferencia por compuestos quirales de bis-cognitina.

Por último, se llevaron a cabo estudios de *docking* y afinidad de unión mediante las herramientas GlideScore y DockTScore y permitió predecir que absolutamente todas las moléculas obtenidas a partir de la Bis (7)-tacrina eran intensos inhibidores de colinesterasas, observando el *score* obtenido. Una de las particularidades fue la forma de asociación del ligando con el receptor, y se trata del enlace entre la fracción de tacrina con el Trp276 y la Tyr67 del PAS de la colinesterasa junto con las interacciones mantenidas con el CAS. En la (Tabla 2) podemos observar los *scores* de los diferentes compuestos de estudio.

Compound	X	AChE ^a / nM	GlideScore ^b	DockTScore ^b
(<i>R,R</i>)-3a	H	11.21 ± 3.41	-14.554	-14.030
(<i>S,S</i>)-3a	H	7.64 ± 0.45	-14.994	-14.076
(<i>R,R</i>)-3b	Cl	4.73 ± 0.67	-14.549	-14.207
(<i>S,S</i>)-3b	Cl	16.08 ± 1.85	-14.467	-14.123
(<i>R</i>)-3c-7	H	76.23 ± 15.16	-14.291	-13.867
(<i>S</i>)-3c-6	H	13.73 ± 1.12	-14.521	-13.834
(<i>R</i>)-3d	Cl	2.80 ± 0.92	-14.526	-14.223
(<i>S</i>)-3d	Cl	9.97 ± 1.01	-14.817	-14.076
Bis(7)-tacrine	-	5.33 ± 0.48	-15.333	-13.907

^a± 95% confidence limits; ^bpredicted binding affinities given in kcal mol⁻¹.

Tabla (2): Resultados del *docking* y afinidad de enlace obtenidos con GlideScore y DockTScore, y el índice de IC₅₀ de los dímeros de Bis (7)-tacrina.

Como hemos comentado antes, los nuevos compuestos interactúan con ambos PAS y CAS, y añadido a esto, los cuales contienen un átomo de Cl, éste se encuentra orientado hacia el Glu275 interactuando con él mediante un enlace halógeno. Al otro lado, en el opuesto a una de las partes de la tacrina, el grupo metilo se presenta expuesto hacia fuera, hacia el solvente, mientras que la otra fracción estaría interactuando con el fondo de la garganta de la enzima mediante una serie de enlaces como puentes de hidrógeno e interacciones π - π con apilamiento. Además, se previó que el Cl que se encuentra en la posición 6 interactuaba con el sitio alostérico formado por los restos Trp429 (432), Met433 (436) e Ile436 (439). De cara a hablar de los heterodímeros, se vio que los que cuya fracción de tacrina poseía sustituyentes tenían de algún modo una preferencia por la unión con el fondo del valle de la esterasa, con exactamente las mismas interacciones que la tacrina sola con el CAS descritas anteriormente.

A raíz de estos resultados, se podría concluir que la existencia de un átomo de Cl aumenta considerablemente la afinidad de enlace gracias a interacciones hidrofóbicas con el CAS, además de otro enlace entre el halógeno y el resto de glutamato (Glu275) en el PAS. Por otro lado, los homodímeros que contienen dicho átomo de Cl, el grupo metilo contenido en el PAS está destinado a ser expuesto hacia el solvente, lo que dificultaría e incluso sería contraproducente para la afinidad de enlace entre la esterasa y su sustrato. También que la selectividad por la AChE es un hecho en todos los compuestos, pero algunos dímeros (*R,R*)-3b y (*R*)-3c no inhibieron la BuChE.

En la imagen inferior (**Fig 6**) se expone el modo de unión del compuesto más activo como inhibidor, el (*R*)-3d (X = Cl), a la AChE de *Tetronace californica*.

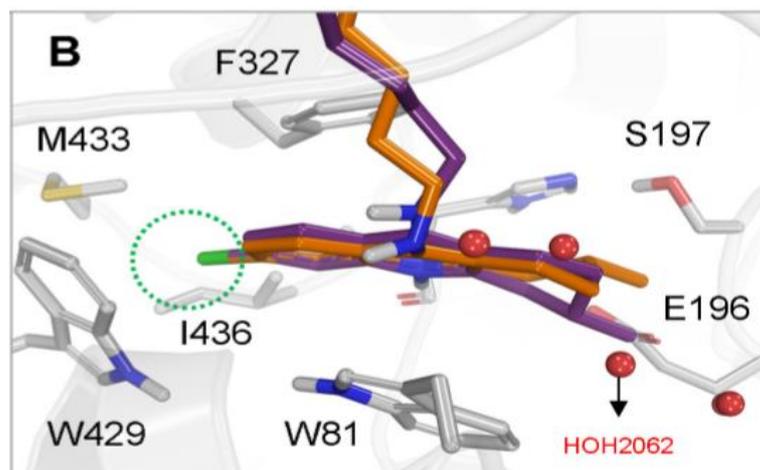


Fig (6). Predicción del modo de unión del inhibidor (*R*)-3d (X = Cl), en naranja, a un modelo de AChE. Rodeado en verde, el átomo de Cl; moléculas de H₂O como bolas rojas.

En otros estudios llevados a cabo por Asadi *et al* se encontró una nueva actividad inhibitoria de la AChE en derivados de ftalimida, así como buena actividad colinesterasa en derivados de ditiocarbamatos^[10]. A partir de estos, que consideraremos los grupos farmacóforos, se quiso unirlos entre ellos mediante un "linker" y obtener híbridos (**Fig 7**).

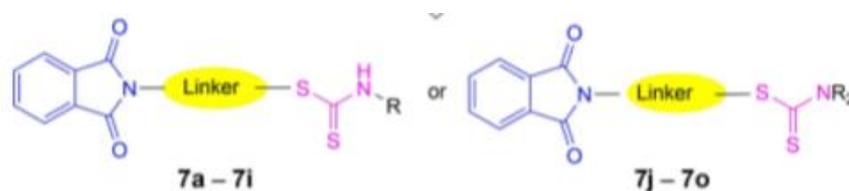


Fig (7). Híbridos de inhibidores de colinesterasas. En azul, el grupo ftalimida, y en rosa el grupo ditiocarbamato, unidos por un *linker* en amarillo.

Tras la síntesis *in vitro* de estos híbridos mediante una serie de reacciones, se obtuvieron los siguientes resultados con respecto a la actividad inhibitoria de la AChE:

Para poder interpretar los resultados tras realizar varias técnicas de *docking* molecular, se compararon las IC₅₀ de las moléculas sintetizadas con fármacos estándar de referencia como el donepezilo y la rivastigmina. De los 15 posibles inhibidores, 4 de ellos dieron como producto una fuerte actividad inhibitoria, siendo el más potente de ellos, 2.5 veces más activo que la rivastigmina, con una IC₅₀=4.6±0.18 μM versus IC₅₀=11.07±0.01 μM.

Estructuralmente, los compuestos obtenidos los podemos separar en dos grupos: derivados de aminas secundarias y derivados de aminas terciarias. En cada uno de los grupos lo que se hizo fue modificar la distancia entre los grupos farmacóforos de ftalimida y ditiocarbamato, variando la posición de los grupos amino y la longitud del *linker*. Se vio que cuanto más largo era el *linker* en los derivados de aminas secundarias, la actividad inhibitoria sobre la AChE era menor, y por tanto el compuesto con más actividad fue un derivado de benzilpiperidina con una cadena metilénica. En relación a la actividad inhibitoria sobre la BuChE, las aminas secundarias con un *linker* de un grupo etilo mostró más actividad frente a aquellas con un propilo o metilo, las cuales mostraron una inhibición moderada o incluso nula. Para los derivados de aminas terciarias, un derivado de fenilpiperidina con una cadena de 3 carbonos como linker, fue el compuesto que presentó más actividad inhibitoria sobre la BuChE.

Para los estudios de *docking* molecular utilizaron el software AutoDock 4.2, y como modelo de las esterasas a estudiar, las estructuras cristalizadas con rayos X sacadas de la plataforma del banco de proteínas (*Protein Data Bank RSCB*), cuyos códigos son 6O4W para la AChE, y 4BDS para la BuChE. Además, como fuente de fiabilidad y validación se realizó otro *docking* a parte con los compuestos de referencia, la tacrina y el donepezilo, sobre la BuChE y la AChE respectivamente. El criterio utilizado para considerar una posición óptima fue que su RMSD fuera menor de 2 Å, y se obtuvieron como resultados: 0,40 Å para el donepezilo y 0,29 Å para la tacrina sobre sus respectivas enzimas. Por lo tanto, se considera un acoplamiento óptimo. [11, 12]

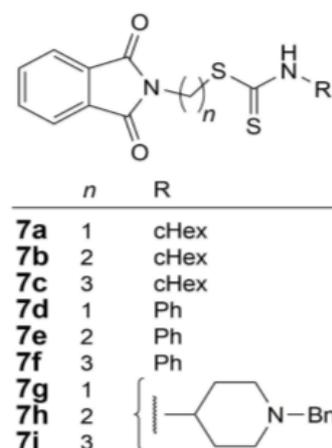
Al realizar el docking del donepezilo con el centro activo de la enzima, se llegó a la conclusión de que el anillo bencílico junto al fragmento de indeno interaccionaban con los restos aminoacídicos Trp86 y Trp286 mediante interacciones π - π , respectivamente.

Por otro lado, la amina cuaternaria del anillo piperidínico estaba interaccionando con la fracción aromática de los restos Trp86 y Phe338 a través de interacciones π -catión, y el grupo carbonilo del indeno formaba puentes de hidrógeno con el esqueleto N-H de Phe295 (**Fig 8a**) Asimismo, se demostró el papel preponderante de los restos de Trp82 e His438 en la estabilización del ligando en el bolsillo de unión gracias a la realización del docking de la tacrina con la BuChE. Esto era posible gracias a interacciones π - π y π -catión con la parte aromática de la molécula de acridina y de puentes de hidrógeno con la amina cuaternaria (**Fig 8b**).

Si bien queremos llegar a comprender el criterio utilizado para el diseño razonable y útil de inhibidores de colinesterasas, necesitaremos exhibir las alteraciones en la estructura desencadenadas por los compuestos inhibidores de colinesterasas obtenidos más potentes,

así como su efecto en el centro activo de la enzima. Aquí la estabilidad del complejo proteína-ligando se define por la RMSD (*root-mean-square deviation*) del esqueleto de la proteína desde su conformación inicial hasta la final tras un tiempo de más de 20 nanosegundos de simulación.

La simulación RMSD reveló que el compuesto **7g** en complejo con la AChE y el donepezilo conservaba la estabilidad durante los últimos 2-5 nanosegundos, respectivamente, y mostraba mayores fluctuaciones si bien se estabilizaba por completo a una media de 2.2 Å para ambos sistemas. Mientras tanto, la rivastigmina en complejo con el compuesto **7h** y la BuChE exhibió un tiempo de equilibrio mayor (alrededor de los 15 nanosegundos finales) y con menos fluctuaciones. Además, los estudios de docking revelaron que la unión iónica persistente de los ligandos seleccionados con Asp en el PAS, contribuyen significativamente a la inhibición de colinesterasas.



En conclusión para este apartado, se podría afirmar que los derivados de aminas secundarias fueron las moléculas con mayor poder inhibitorio sobre las colinesterasas, en concreto el compuesto **7g** sobre la AChE y el **7h** sobre la BuChE. Así pues, se realizaron diversos estudios con el fin de comprender en detalle el comportamiento dinámico y las interacciones que mantenían estos compuestos con sus respectivas enzimas donde ejercen su acción, y para ello se utilizaron como referencia los fármacos ya aprobados donepezilo y rivastigmina. Además, los estudios de dinámica molecular, MD (*molecular dynamics* en inglés), mostraron la capacidad de los complejos de conservar su estructura y entereza durante las simulaciones de RMSD, RMSF y estudios de evaluación de energía.

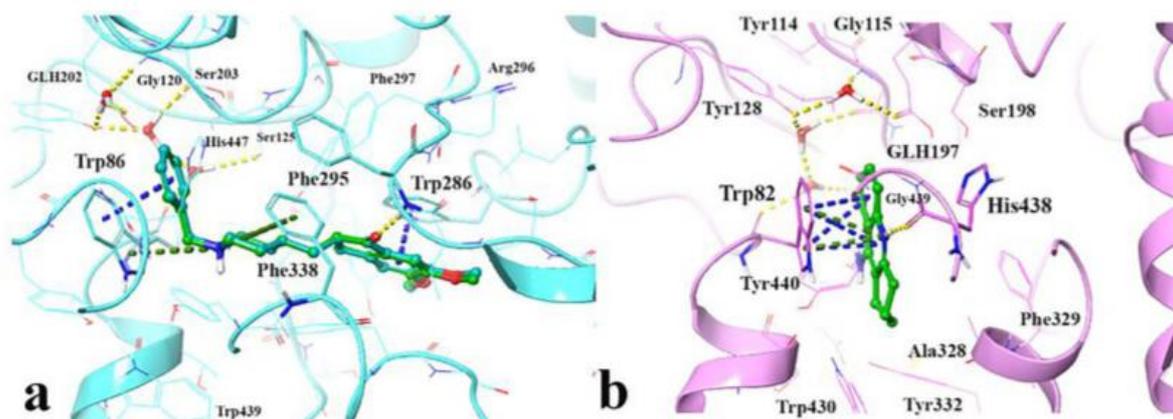


Fig (8). Representación de las interacciones del donepezilo (verde) y la tacrina (azul) co-cristalizados y tras el docking, sobre la AChE (a) y la BuChE (b)

Por último, los ensayos farmacocinéticos *in silico* revelaron que los compuestos estrella, **7g** y **7h**, poseían una buena farmacocinética, así como una buena farmacodinámica por la buena penetración de la BHE (barrera hemato-encefálica). Esto se demostró gracias a las herramientas computacionales MarvinSketch 5.8.3, ChemDrawUltra 12.0, y Autodock con el objetivo de ver el cumplimiento de la regla de Lipinski [13]. Los resultados concluyeron que estos compuestos cumplían los 5 puntos de la regla de Lipinski, y utilizando un marcaje de referencia al que le llamaron *BBB score*, el cual consideraba que una puntuación > 0.02 significaba una buena penetración, que también dio un resultado favorable pues su *score* fue de 0.056 para el compuesto **7g** y de 0.053 para el **7h**. La rivastigmina tiene una puntuación de referencia de 0.042 y el donepezilo de 0.103. Por tanto podríamos clasificar a estos compuestos derivados de ditiocarbamatos y ftalimida como potenciales candidatos para la terapia farmacológica en la EA.

En los últimos años, los compuestos derivados de quinolinas han mostrado una actividad anticolinesterásica, lo que los propone como candidatos para el tratamiento de la EA.

Se sintetizaron las tetrahydroquinolinas (THQ) a través de una serie de reacciones químicas monitorizadas, dando lugar a 8 compuestos, y tras esto fueron caracterizadas utilizando métodos espectroscópicos (IR, ¹H-RMN y espectroscopía de masas). Como compuesto de referencia se utilizó la galantamina [14].

Para el *docking* molecular se utilizó una vez más el software GlideScore, que incluye una serie de filtros para encontrar las mejores formas de unión del ligando a un receptor previamente creado en un espacio y localización concretas. Por ello se llevaron a cabo aproximaciones de búsqueda sistemática y la orientación, conformación y posición del ligando en el espacio antes de realizar la evaluación de energía entre este y la proteína.

Las estructuras proteicas a estudiar fueron extraídas de la cristalización de la AChE de *Torpedo californica* en complejo con tacrina (código PDB: 1ACJ). A partir de ella se realizó el *docking*, además de simulaciones de MD con el fin de comprobar la estabilidad de las interacciones que se forman en cada uno de los complejos.

De los 8 compuestos obtenidos, ninguno mostró actividad inhibitoria contra la BuChE, con valores de IC_{50} de más de $500\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, todos mostraron actividad sobre la AChE, y en concreto los que tuvieron la mayor fueron el número **3** con una IC_{50} de $805\mu\text{M}$, y el número **4** con un valor de IC_{50} de $618\mu\text{M}$. Aunque estos muestren valores por debajo de los de referencia, se ha visto que pueden ser unos excelentes aspirantes como farmacóforos para el diseño de nuevos fármacos contra enfermedades neurodegenerativas.

Por otro lado, se vio que los compuestos **4** y **8** poseían numerosas interacciones a lo largo del valle del centro activo de la AChE, con la única diferencia siendo su orientación en este lugar (**Fig 9**). Para el compuesto **4** las interacciones más importantes se observaron que son apilamientos π - π con el anillo piperidínico y el Trp84; dos puentes de hidrógeno entre la Gly123 y el oxígeno del grupo metoxi; y puentes disulfuro S-S entre la Phe300 y el oxígeno del anillo de furano. Mientras, el compuesto **8** se acopla en el receptor, donde hay evidencias de la existencia de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, leves interacciones polares, y apilamientos π - π . En este acoplamiento también se observa una interacción de la triada catalítica de la enzima: el residuo His440, a través de puentes de hidrógeno con el oxígeno carbonílico del anillo de pirrolidina; el Asp72 mostró también enlaces de hidrógeno con el oxígeno del grupo metilendioxo del anillo; y la Phe330 formaba apilamientos π - π con el anillo aromático del ligando.

Además, se demostró que la presencia del átomo de oxígeno del anillo de metilendioxo daba lugar a un puente de hidrógeno complementario, lo que se observó que contribuía activamente a la fuerza de unión del compuesto **8** a la enzima, incrementando su potencia de inhibición. También los residuos aminoacídicos concurrentes en las interacciones de este ligando-receptor se consideraron esenciales para dicha unión, contribuyendo incluso a la buena posición en el sitio activo, y la variación en la actividad biológica de todos los compuestos estudiados podría estar directamente ligada a un aumento en el número de interacciones entre el compuesto y el sitio activo, y una disminución en la longitud de enlace entre dicho compuesto y los residuos aminoacídicos del centro activo [15, 16].

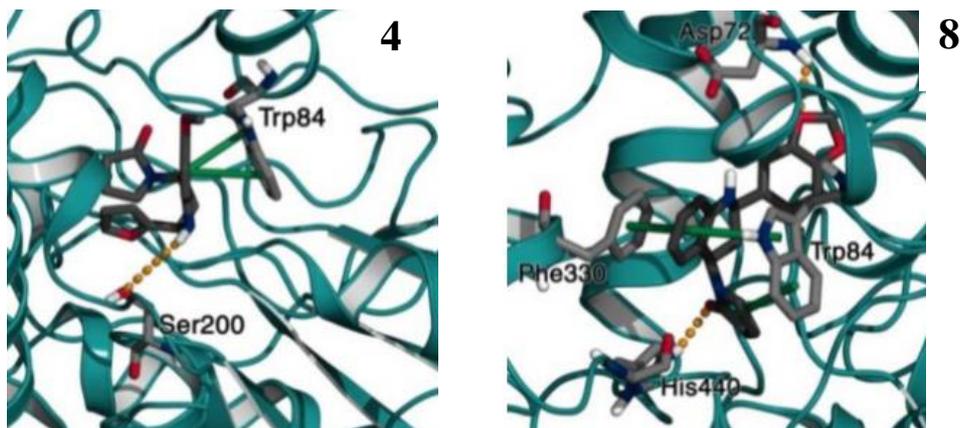


Fig (9). Docking molecular de los compuestos **4** y **8** en el sitio activo de la AChE, resaltando los aminoácidos que forman las interacciones más importantes con ellos.

Con respecto a la farmacocinética, aspecto importante a considerar en el diseño de nuevos fármacos, se llegó a la conclusión, tras la realización de estudios con el software *Molinspiration* y experimentos *in silico*, de que la variación en los sustituyentes de las moléculas de THQ podría permitir sintetizar inhibidores de colinesterasas más potentes e innovadores. Estos estudios se están llevando a cabo en la actualidad, pero se ha considerado de interés mencionar este experimento de cara a comprender las trabas en el camino del modelado molecular para el diseño de nuevos fármacos.

En un estudio llevado a cabo en 2015 por F. Rahim *et al* y colaboradores se sintetizaron de novo 30 análogos de tiazol, ya que se ha demostrado que los compuestos heterocíclicos gozan de una gran actividad biológica en receptores colinérgicos, además de tener otras importantes aplicaciones [17].

Como en el resto de los artículos que hemos mencionado, todas las moléculas de estudio fueron sintetizadas en el laboratorio mediante una serie de reacciones, las cuales no mencionaremos porque no es el objetivo de este trabajo. Tras dicha síntesis en cadena, los compuestos fueron caracterizados por ^1H NMR, ^{13}C NMR y espectroscopía de masas. Todos y cada uno de ellos mostraron actividad inhibitoria sobre la AChE en rangos de IC_{50} entre 21.3 ± 0.08 y 452.1 ± 0.27 μM , y el más potente de todos fue el compuesto **15** poseyendo una IC_{50} de 21.3 ± 0.50 μM . Dicho compuesto tiene dos grupos hidroxilo localizados en el anillo de fenilo, y su presencia parece jugar un papel importante en la actividad inhibitoria y también en ciertos puentes de hidrógeno. El segundo compuesto más potente fue el **7**, conteniendo una fracción de antraceno y un anillo de fenilo clorado, y cuya actividad puede estar atribuida a las interacciones π - π .

El análogo **12** posee un grupo hidroxilo en uno de sus anillos y un átomo de cloro en otro de ellos, y se puede deducir que su menor actividad en comparación con el compuesto **15** se debe a la presencia de un único grupo hidroxilo. Los análogos del **1** al **30** también mostraron un buen potencial, pero sorprendentemente el análogo **1** posee grupos aceptores de electrones en ambas partes aromáticas, y en el compuesto **30** vemos grupos donadores, dándonos a entender que los análogos con grupos donadores o aceptores en ambos anillos son menos potentes comparado con aquellos que tienen un grupo aceptor en un anillo, y uno donador en el otro. Todos los demás análogos mostraron una actividad moderada.

Todas las moléculas excepto la **3**, **5** y **29** mostraron inhibición sobre ambas colinesterasas, que puede deberse a la posición de los sustituyentes en el fenilo que pueda no interactuar adecuadamente con el sitio activo de la enzima. La predicción del acoplamiento de todos estos análogos en la BuChE se confirmó gracias a estudios de *docking*. Estas predicciones dieron como resultado que las interacciones más importantes con este receptor se producen con los residuos Tyr128 y Tyr332 del sitio activo mediante puentes de hidrógeno, y especialmente el compuesto **15**, que resultó ser el más activo, estableciendo 5 de ellos, además de interacciones π - π . (**Fig 10**) [18]. Además, los grupos hidroxilo son buenos activadores que polarizan la molécula facilitando las interacciones con otros aminoácidos.

El compuesto **7**, el segundo más activo, se vio que formaba 4 interacciones con residuos muy importantes del sitio activo. Como podemos ver en la Figura 10b, la Thr284 interacciona con el grupo NH de la molécula, el cual está directamente arraigado al grupo de azometina. Mientras tanto, la Ser287 interacciona con el átomo de nitrógeno del grupo de tiazol y con el NH adyacente al grupo de azometina, y la Tyr332 establece interacciones π con el anillo de benceno sustituido por cloro (**Fig 10b**).

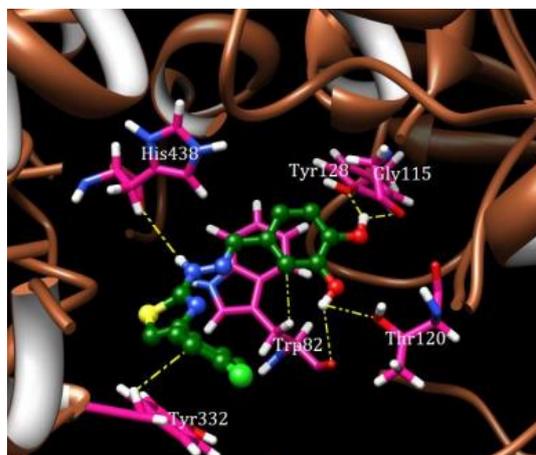


Fig 10a. Predicción del modo de unión del compuesto 15 con la BuChE

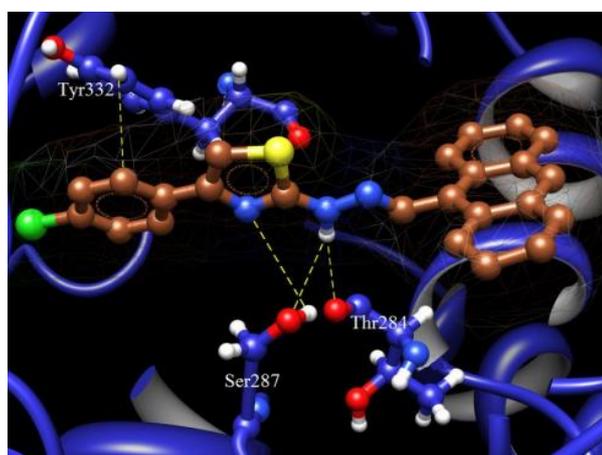


Fig 10b. Predicción del modo de unión del compuesto 7 con la BuChE

6. DISCUSIÓN

Si bien hemos hablado de diferentes compuestos que han sido diseñados gracias a multitud de herramientas computacionales y softwares, además de técnicas desarrolladas de modelado molecular como mencionamos al principio, debemos concluir afirmando que la síntesis de estos inhibidores creados con diferentes instrumentos nos permite entender mejor el mecanismo de acción de la diana, así como las formas en las que podemos abordarla con un objetivo terapéutico, que en este caso es la EA y síndromes demenciales. Por otro lado, también se pretende mostrar la efectividad de los métodos informáticos en el diseño de fármacos, lo cual reduciría el tiempo empleado habitualmente en su síntesis, y asegurar un buen uso de los recursos disponibles.

Las diferentes estrategias que hemos descrito en este trabajo sugieren una visión global de cómo a partir de moléculas muy diversas podemos dar con inhibidores de colinesterasas muy potentes, incluso más de los que ya están en el mercado, lo que nos da esperanza para seguir investigando en este campo con el fin de encontrar la molécula más adecuada, es decir, aquella que se acople mejor al receptor, tenga unas buenas farmacocinética y farmacodinamia, y sea accesible y de bajo coste.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Gago Bádenas, F. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. Diseño de Medicamentos. Monografías Real Academia de Farmacia, Farmaindustria, 1994
2. Sánchez-Montero, J. M, (2016). Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, ISSN-e 1697-4271, N°2
3. Schachter AS, Davis KL. Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2000;2(2):91–100.
4. Álvarez Sánchez Mario, et al. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer *Rev Mex Neuroci* 2008; 9(3): 196-201
5. Colović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., & Vasić, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315–335. doi:10.2174/1570159X11311030006
6. Darvesh, Sultan. (2016). Butyrylcholinesterase as a Diagnostic and Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*. 13. 10.2174/1567205013666160404120542.
7. Dooley M1, Lamb HM. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. 2000 Mar;16(3):199-226
8. Onor, M. L., Trevisiol, M., & Aguglia, E. (2007). Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical interventions in aging*, 2(1), 17–32. doi:10.2147/cia.2007.2.1.17
9. Lopes, João P. B., Costa, Jessie S. da, Ceschi, Marco A., Gonçalves, Carlos A. S., Konrath, Eduardo L., Karl, Ana L. M., Guedes, Isabella A., & Dardenne, Laurent E.. (2017). Chiral Bistacrine Analogues: Synthesis, Cholinesterase Inhibitory Activity and a Molecular Modeling Approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(11), 2218-2228
10. Asadi M. (2019). Design, Synthesis, Molecular Docking, and Cholinesterase Inhibitory Potential of Phthalimide-Dithiocarbamate Hybrids as New Agents for Treatment of Alzheimer's Disease. Tehran University of Medical Sciences, 1417653761 Tehran, Iran. DOI: 10.1002/cbdv.201900370
11. J. W. M. Nissink, C. Murray, M. Hartshorn, M. L. Verdonk, J. C. Cole, R. Taylor, 'New test set for validating predictions of protein-ligand interaction', *Proteins Struct. Funct. Genet*. 2002, 49, 457–471
12. J. Kara, P. Suwanhom, C. Wattanapiromsakul, T. Nualnoi, J. Puripattanavong, P. Khongkow, V. S. Lee, A. Gaurav, L. ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy', *J. Med. Chem*. 2004, 47, 45–55

- 13.** D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, 'Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates', *J. Med. Chem.* 2002, 45, 2615–262
- 14.** M. Gutiérrez, F. Valdés, B. Arévalo, G. Vallejos (2015). Synthesis, molecular docking and design of Tetrahydroquinolines as acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7(3):351-358
- 15.** Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, C.J.C. Fontecilla, F. Nachon, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 41141–41147
- 16.** N Toda; Y Iwata; K Tago; H Kogen; T Kaneko; S Miyamoto., *Chem-Bio Informatics Journal.*, 2003, 3, 46-57.
- 17.** F. Rahim, M.T. Javed, H. Ullah, A. Wadood, M. Taha, M. Ashraf, Qurat-ul-Aine, M.A. Khan, F. Khan, S. Mirza, K.M. Khan. Synthesis, Molecular Docking, Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Potential of Thiazole Analogs as New Inhibitors for Alzheimer Disease, *Bioorganic Chemistry* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.08.002>
- 18.** W Sippl; JM Contreras; I Parrot; YM Rival; CG Wermuth, *J Comput Aided Mol Des.*, 2001, 15 (5), 395-410
- 19.** Agis-Torres, A., Sölhuber, M., Fernandez, M., & Sanchez-Montero, J. M. (2014). Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Current neuropharmacology*, 12(1), 2–36. doi:10.2174/1570159X113116660047
- 20.** Morris GM1, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Methods Mol Biol.* 2008;443:365-82. doi: 10.1007/978-1-59745-177-2_19.