



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
APLICACIÓN DE TÉCNICAS  
COMPUTACIONALES DE ACOPLAMIENTO  
MOLECULAR EN DESARROLLO ENZIMÁTICO**

Autor: Marta Maigler López

Fecha: septiembre 2020

Tutor: Almudena Perona Requena

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Enzimas y reacciones biocatalíticas.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2</b>	<b>Principios generales de la técnica docking .....</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>5.1</b>	<b>Clasificación de enzimas según el tipo de reacción que catalizan.....</b>	<b>12</b>
<b>5.2</b>	<b>Clasificación de los diferentes métodos de docking.....</b>	<b>13</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>20</b>

## 1 RESUMEN

Un elevado número de reacciones químicas pueden tener lugar de forma espontánea, mientras que otras, para que se produzcan, necesitan la presencia de catalizadores. Las enzimas son catalizadores de reacciones biológicas estudiadas desde hace años. El hecho de ser biodegradables, quimioselectivas, regioselectivas, enantioselectivas, así como la elevada velocidad de las reacciones que catalizan y las suaves condiciones a las que estas reacciones tienen lugar, han hecho que las enzimas se conviertan en un objetivo importante en el proceso de desarrollo farmacológico.

Analizar cuál es la conformación espacial del complejo sustrato-enzima y conocer las interacciones que intervienen en esta unión es un elemento de conocimiento importante tanto en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos como en el desarrollo de sustratos de mayor afinidad por la enzima. El establecimiento de un modelo conformacional se obtiene mediante la aplicación de técnicas de acoplamiento molecular, en las que el sustrato adopta diferentes poses dentro del centro catalítico de la enzima, resultando las más estables aquellas cuya energía de enlace sea menor.

En este estudio bibliográfico se detallan los aspectos más importantes de las reacciones biocatalíticas y de la técnica de acoplamiento molecular o técnica docking. Aportando finalmente ejemplos en los que se ha utilizado esta técnica para el desarrollo de fármacos en cuya actividad están implicadas las enzimas.

Palabras clave: enzima - biocatálisis - técnica - molecular - docking.

## 2 ABSTRACT

A high number of chemical reactions happen spontaneously, while others need the presence of catalysts. Enzymes are catalysts for biological reactions and they have been studied for years. Due to properties such as biodegradability, chemoselectivity, regioselectivity, enantioselectivity, as well as the high speed in the catalytic reaction and the mild conditions in which this reaction takes place, enzymes are a major goal in the process of pharmacologic development.

Analyzing the spatial conformation of the substrate-enzyme complex and defining the interactions involved in this union are considered important knowledge for new drugs discovery and high affinity substrates development. The development of a new conformational model is obtained using molecular coupling techniques, in which the substrate takes different positions inside the catalytic center of the enzyme. As a result, the more stable enzymes are those with lower bond energy.

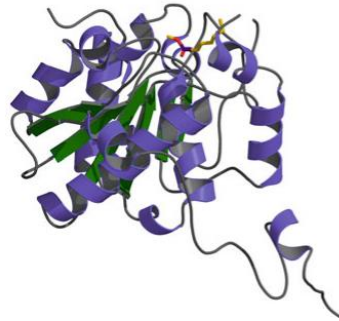
This bibliographic review details the most important aspects of biocatalytic reactions and the docking technique. It also provides several examples in which this technique has been used for the development of drugs in whose activity enzymes are involved.

Keywords: enzyme - biocatalysts - technique - molecular - docking

### 3 INTRODUCCIÓN

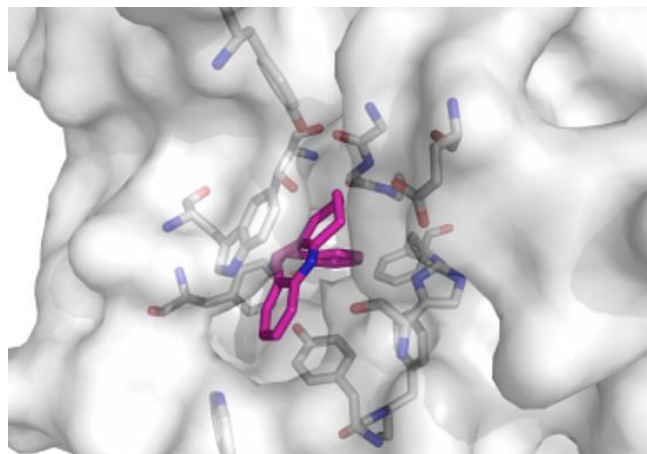
#### 3.1 Enzimas y reacciones biocatalíticas

Las enzimas son proteínas naturales, producidas por organismos vivos, con propiedades catalíticas. También denominadas catalizadores biológicos o biocatalizadores, reducen la cantidad de energía necesaria para que se produzca una reacción, acelerando así la velocidad de las reacciones químicas que tiene lugar en el organismo. No se consumen ni se alteran en el proceso de reacción. [1][2][3]



**Figura 1.** Estructura molecular de una enzima. Se representan la secuencia de aminoácidos plegados formando una estructura 3D. En amarillo, se encuentra unido un inhibidor. [3]

Suelen ser proteínas globulares de elevado peso molecular ( $10^4$ - $10^6$  g mol<sup>-1</sup>), que se entrelazan o pliegan en una o varias cadenas polipeptídicas, formando una estructura tridimensional específica. Las enzimas se encuentran en medio acuoso, esto condiciona la disposición de los grupos que forman parte de su estructura, encontrándose los grupos de naturaleza polar o grupos hidrófilos ubicados en la superficie exterior del entramado mientras que los sustituyentes lipófilos o apolares se disponen hacia el interior. Formando parte de esta red tridimensional se encuentra un grupo de aminoácidos que forman el sitio activo, centro catalítico o cavidad de unión, lugar en el que se va a producir el reconocimiento y unión del sustrato, y que es el responsable de la actividad catalítica de la enzima. El centro activo puede estar localizado en la superficie o encerrado en el interior de la estructura enzimática. A ese sitio activo se va a unir el sustrato de la reacción provocando una activación o inhibición de la enzima y desencadenando un efecto fisiológico. [1][2][3]



**Figura 2.** Complejo formado por la unión de proteína-ligando. Se muestra el centro activo y la interacción del ligando con los residuos de las cadenas laterales que forman ese centro activo. [12]

La palabra enzima deriva del griego: *en* (dentro) y *zume* (levadura). El término fue utilizado por primera vez en 1878 por el físico Kühne, para referirse a la capacidad de la levadura de producir alcohol a partir de azúcares.

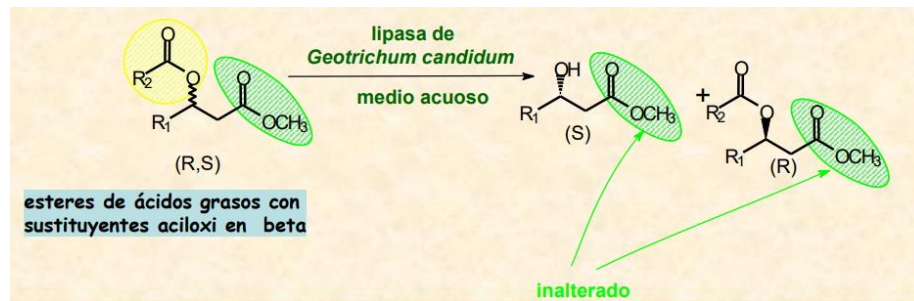
Algunos microorganismos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se han utilizado, desde hace siglos, en la producción de alimentos como el vino, el queso, la cerveza o el pan, sin saber que las reacciones que se producían en estos productos, se debían a la acción de las enzimas presentes en estos organismos vivos.

Aunque el término enzima se conoce desde hace décadas, ha sido en los últimos años cuando se han desarrollado numerosos estudios que nos han permitido un mayor conocimiento de ellas. [1][4]

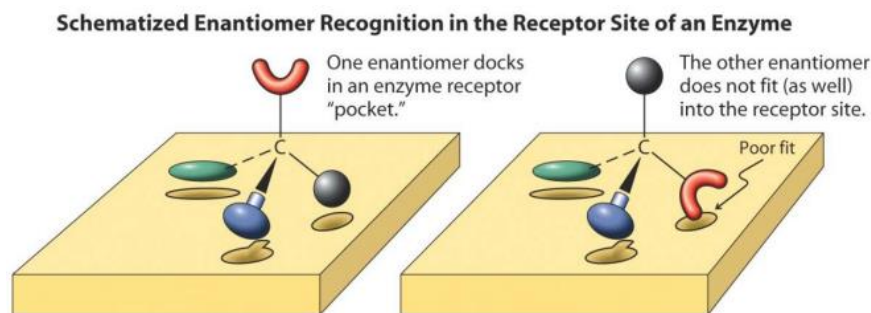
Entre las ventajas que supone el uso de biocatalizadores o enzimas en las reacciones químicas destacan:

- La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas es mucho mayor que la que pueden alcanzar aquellas reacciones no catalizadas o mediadas por catalizadores químicos. Mientras que en una reacción mediada por catalizador químico, la velocidad es del orden de  $10^{17}$ , en una reacción catalizada por enzimas se puede llegar a velocidades del orden de  $10^8 - 10^{10}$ . Además, se pueda llevar a cabo la reacción con una pequeña concentración molar de enzima (0.010 – 0.0010 %) mientras que en el caso de un catalizador químico la concentración molar necesaria sería mayor (0.1 – 1%). Una sola molécula enzimática puede catalizar miles de reacciones y transformar gran cantidad de sustratos, ya que no se consume durante la reacción y se recupera al final de cada una de ellas. Esto hace de las enzimas catalizadores muy eficientes. [3]
- Los catalizadores naturales son proteínas y por tanto son totalmente biodegradables, por los que no ejercen ningún efecto perjudicial para el medio ambiente. [2][3][5][6]
- Las condiciones suaves en las que tienen lugar las reacciones enzimáticas, con un pH entre 5-8, temperatura entre 20-40°C y a presión atmosférica, minimizan la posibilidad de que se produzcan reacciones secundarias, pudiendo suprimirse así los pasos de protección y desprotección de grupos funcionales durante las reacciones de síntesis, y reduciendo la creación de subproductos indeseables. Por lo tanto, son transformaciones más sencillas y seguras. [2][3][6]
- La compatibilidad que existe entre las diferentes enzimas hace posible que se puedan producir varias reacciones a la vez. [3]
- Además de aceptar al sustrato natural, las enzimas también son capaces de reaccionar con un gran número de sustratos no naturales. Y aunque su medio de reacción habitualmente es agua, este puede ser reemplazado por un disolvente orgánico. [2][3]
- Son reacciones reversibles, que pueden darse en ambas direcciones, sin afectar al equilibrio termodinámico de la reacción. [3]

- Las enzimas ejercen una acción específica, poseen quimioselectividad. Generalmente ejercen su acción sobre un solo tipo de sustrato o un grupo de sustratos similares, lo que se conoce como especificidad de sustrato o por otro lado pueden ejercer su acción sobre un tipo de enlace, que nada tiene que ver con el tipo de sustrato, si no con el tipo de reacción que cataliza, esto se conoce como especificidad de acción o de clase. Esta característica hace que la enzima solo afecte a un grupo funcional o a un enlace del sustrato sin alterar al resto de elementos, de manera que no se producen reacciones secundarias y por tanto no va a ser necesario eliminar impurezas en el proceso. [2][3]
- Poseen regioselectividad, es decir, tienen la capacidad de diferenciar grupos funcionales químicamente iguales que se encuentran situados en diferentes partes del sustrato y unirse solo a uno de ellos, aunque exista otro con una reactividad mayor. [2][3]



- Enantioselectividad: todos los biocatalizadores son quirales por su composición con L-aminoácidos esto hace que sea capaz de reconocer cualquier tipo de quiralidad o proquiralidad en el sustrato, mostrando selectividad solo hacia el enantiómero con la conformación adecuada. [2][3]



Algunas desventajas de este tipo de reacciones son:

- A diferencia del uso de catalizadores químicos quirales en los que se puede conseguir invertir la quiralidad de una reacción, en el caso de las enzimas este hecho es imposible, ya que la naturaleza solo proporciona L-aminoácidos y no existe la forma de crear enzimas a partir de D-aminoácidos. [3]

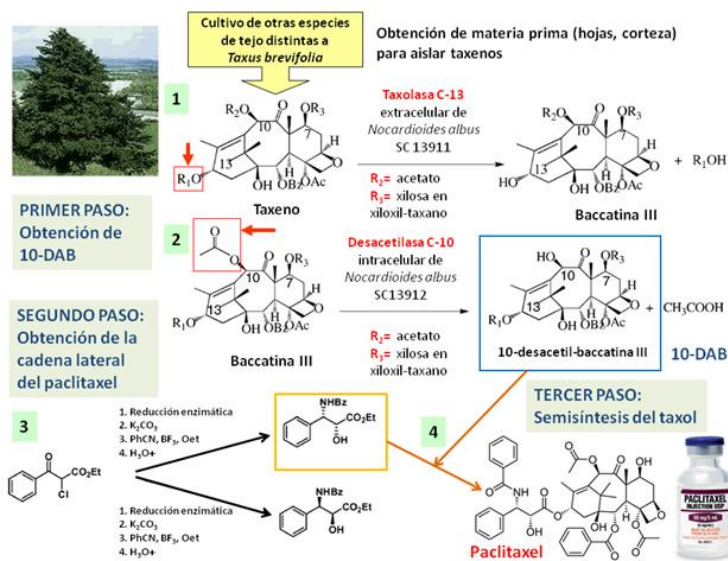
- El mayor poder catalítico de las enzimas tiene lugar en medio acuoso, pero el elevado punto de ebullición del agua y el elevado calor de vaporización, además de que la mayoría de compuestos orgánicos son poco solubles en él, convierten a este medio en el menos adecuado para la mayor parte de reacciones. Lo idóneo sería sustituir este medio de reacción por un medio orgánico en ocasiones en los que sea favorable para la reacción, pero a cambio se produce una pérdida de la actividad catalítica de la enzima. [3]
- Otro de los aspectos que encarece los procesos de biocatálisis es el hecho de que las enzimas, para su correcto funcionamiento, necesitan de la presencia de cofactores que están ligados a ellas de forma natural. Estos cofactores son donantes de equivalentes químicos para que se pueda producir el paso de oxidación y reducción en reacciones redox (NAD(P)H, flavina o grupo hemo), además de servir como reservorio de energía química, como es el caso de ATP. [3][6]  
La mayoría de estos cofactores son inestables y muy caros, ya que no pueden ser sustituidos por moléculas de síntesis artificial más económicas. En la actualidad se están empezando a acoplar sistemas de reciclaje de cofactores. [3][6]
- Son moléculas sensibles, destruidas a elevadas temperaturas y pH extremos; por lo que el mantenimiento de estos dos parámetros es un punto crítico en el transcurso de la reacción enzimática. [3]

Por su eficiencia, regioselectividad y estereoselectividad, el uso de reacciones enzimáticas es empleado en síntesis de fármacos, herbicidas, insecticidas y otros productos químicos, así como en las industrias textil o alimentaria, entre otras. Las suaves condiciones de pH y temperatura a las que se producen las reacciones y el hecho de que estos procesos se llevan a cabo en medios que respetan el medio ambiente, convierten a las reacciones biocatalíticas en una alternativa más eficiente y ecológica a la síntesis química tradicional. [4]

SECTOR SANITARIO-FARMACÉUTICO	INDUSTRIA AGROALIMENTARIA	PROCESOS INDUSTRIALES	SECTOR MEDIOAMBIENTAL
<ul style="list-style-type: none"><li>• Diagnóstico y terapéutica.</li><li>• Síntesis de fármacos u otros compuestos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fabricación edulcorantes, aromas y aditivos.</li><li>• Fabricación de ingredientes con valor nutricional.</li><li>• Fabricación de queso y productos lácteos.</li><li>• Fabricación de herbicidas e insecticidas.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fabricación de detergentes.</li><li>• Industria textil y peletera.</li><li>• Síntesis de compuestos químicos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Biorremediación.</li><li>• Obtención de plásticos biodegradables.</li><li>• Producción de combustible biológico.</li></ul>

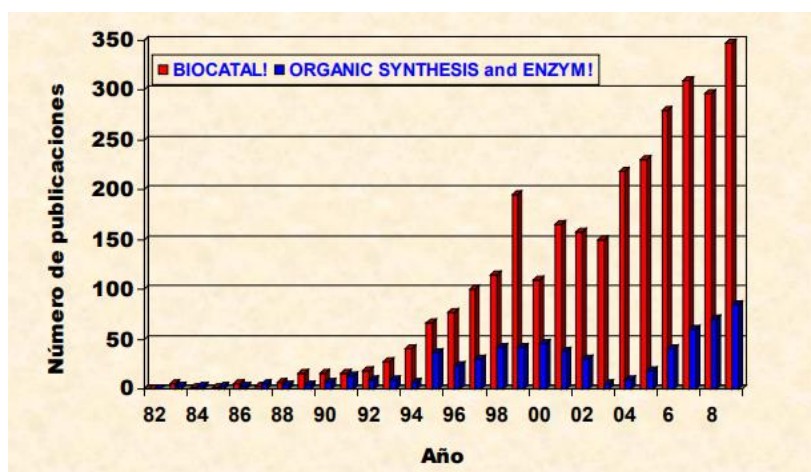
Tabla 2. Aplicaciones de las reacciones biocatalíticas. [3]

La utilización de enzimas tanto en síntesis de precursores de fármacos y semisíntesis, como en la resolución de mezclas racémicas en industria farmacéutica, es cada vez más frecuente. [4]



**Figura 5.** Ejemplo de síntesis de fármaco mediante el uso de enzimas → Paclitaxel, fármaco antineoplásico cuya semisíntesis se produce a través de reacciones biocatalíticas por la unión de dos precursores. (10-DAB y la cadena C-13). [4]

Con el gran auge de la biocatálisis y las ventajas que esta supone frente a la síntesis química tradicional, son numerosos los procesos biotecnológicos que se llevan a cabo utilizando enzimas como catalizadores. Esto hace que, en la actualidad, sea un campo de interés en investigación química y biológica. [2][4]



**Figura 6.** Evolución del uso de biocatálisis desde 1982 hasta 2008. [2]

Conocer la forma en la que el sustrato interactúa con la enzima, cual es la conformación que este adopta en el sitio catalítico y los enlaces que se establecen entre ellos es la finalidad de la aplicación de técnicas computacionales de acoplamiento molecular como docking. Se quiere conocer que modificaciones en la enzima o sustrato, podrían aumentar la afinidad y la efectividad, consiguiendo un aumento del rendimiento del proceso de síntesis de fármacos a partir de enzimas.

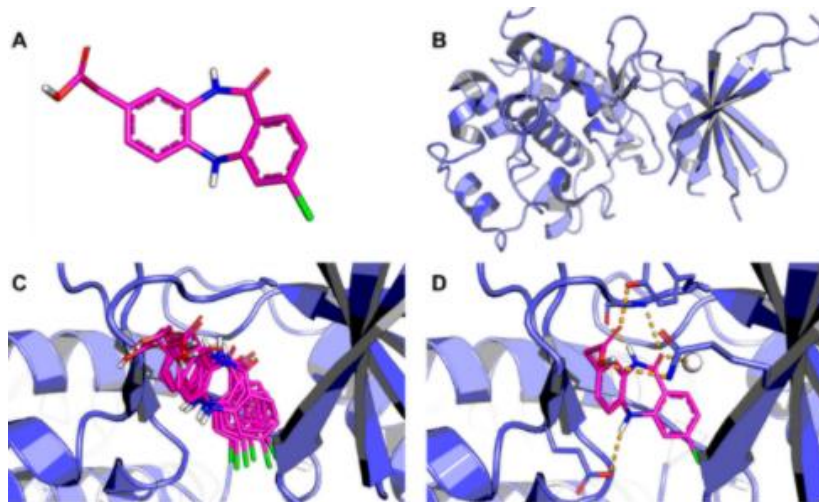


### 3.2 Principios generales de la técnica docking

La técnica docking o de acoplamiento molecular es una técnica de mecánica molecular utilizada para predecir modos de unión entre ligandos y sus dianas, así como la energía de esa unión.

Técnica que, mediante la aplicación de modelos informáticos, predice, de forma teórica, cual es la mejor orientación del ligando dentro del sitio activo, en este caso, el centro catalítico de la enzima.

A partir de la estructura tridimensional de ligando y receptor, se persigue conocer, mediante la aplicación de docking, la estructura tridimensional del complejo ligando-receptor. [8][10][12]



**Figura 7.** Esquema del proceso de acoplamiento molecular. [7] A. Estructura 3D del ligando. B. Estructura 3D del receptor. C. Exploración de las poses que adopta el ligando en el sitio activo del receptor. D. Selección de la conformación más probable e interacciones que se producen.

Forma parte de las técnicas conocidas como métodos basados en la estructura, por lo que es necesario conocer la estructura tanto del sustrato como de la enzima. Previamente a la realización de docking, la estructura de la diana se puede obtener mediante técnicas como cristalografía de rayos-X o espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (métodos experimentales) o modelado por homología (método teórico). La estructura del ligando se puede obtener de forma experimental, mediante el acceso a la base de datos de Cambridge Structural Database (CSD) o puede ser construida por modelado molecular. [7][8][9][12]

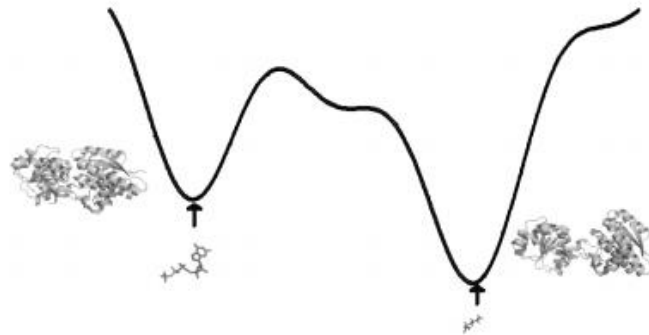
Los sustratos o ligandos pueden adoptar diferentes orientaciones dentro del sitio activo del receptor. Teniendo esto en cuenta, la técnica docking consta de dos funciones o algoritmos. Un primer método de muestreo, componente estructural de la técnica, en el que se realiza una exploración del espacio conformacional. El sustrato se coloca dentro del sitio activo de la enzima adoptando diferentes conformaciones o poses, y grados de libertad torsional y traslacional. Esta primera parte predice la conformación del ligando y su posición y orientación dentro del sitio activo.

Por otro lado cuenta con una función de puntuación o scoring, componente energético. Método matemático que clasifica las uniones en función de la puntuación obtenida, basada en el cálculo de la energía libre de unión, y evalúa como de buenas son las interacciones. Esta

segunda parte permite conocer el panorama energético de cada una de las conformaciones de unión previstas y evaluar la fuerza y afinidad de cada una de ellas. [7][9][10][12][13]

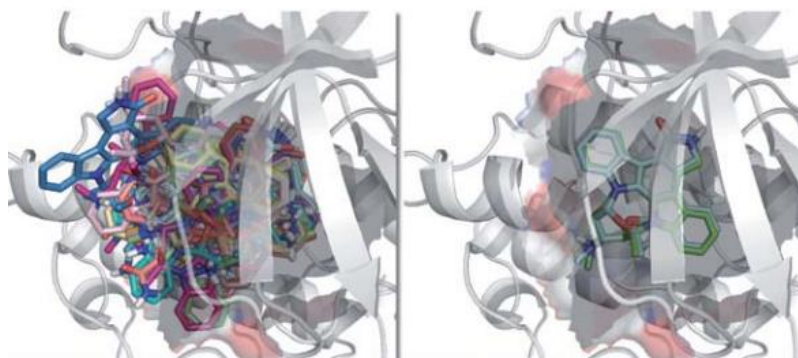
Para la estimación de la energía de unión de ligando y receptor, los métodos de acoplamiento molecular utilizan funciones de puntuación. La energía de la reacción está representada mediante la constante  $K_a$  y la energía libre de Gibbs. Para este cálculo de la energía de la reacción de unión de ligando y receptor se tienen que tener en cuenta interacciones intermoleculares entre ligando y receptor, efecto del disolvente y efectos entrópicos de la reacción. La precisión de la medida va a depender del número de parámetros físico-químicos evaluados, siendo mayor cuanto mayor sea el número de parámetros. [7]

En el cálculo de las energías de unión se van a obtener una serie de máximos y mínimos, mínimos que corresponden con situaciones en las que se obtiene un complejo estable y que la función de scoring es capaz de localizar. [12]



**Figura 8.** Representación de los mínimos y máximos de energía obtenidos en el cálculo de la energía de unión de las diferentes conformaciones del complejo ligando-diana [12]

La primera función muestra todos los modos de unión que se pueden dar y la realización de la segunda función, determina cual es el modo de unión más estable y el que realmente se produce. [7][9][10][13]



**Figura 9.** Representación de los múltiples modos de unión de un ligando a un receptor (izquierda). Comparación de la propuesta de unión por docking con la orientación obtenida experimentalmente (derecha). [9]

Por tanto, además de aportar información sobre la forma en la que el sustrato se une a la enzima, también permite obtener la energía de unión de cada una de las poses o conformaciones que el sustrato adopta, permitiendo seleccionar cual es el modelo de unión

con mínima energía y así conocer cuáles son los modelos de unión teóricos más estables, asemejándose alguno de ellos al modelo experimental. [7][12]

Debido a la precisión en la predicción de la orientación del sustrato y la enzima en su unión, es la técnica de acoplamiento molecular basada en la estructura más utilizada. Se ha convertido en una herramienta cada vez más importante en investigación farmacéutica. Es usada en investigación de nuevos fármacos con el objetivo de reducir coste y tiempo en el proceso, y también es usada para caracterizar cuáles son las partes del sustrato responsables de la interacción con la diana, y por tanto aumentar la eficacia de acción de futuros fármacos sobre la diana. [10]

Poder conocer una imagen fija de cómo se unen sustrato y enzima, nos permite conocer el sitio catalítico de la enzima, los grupos funcionales que intervienen en la interacción y cuál es la conformación más probable de la unión y realizar modificaciones estructurales favorables, mejorar la unión y conseguir un mejor rendimiento del proceso. [14]

Para poder solucionar algunos inconvenientes relacionados con el sustrato, para poder modificarlo y obtener un sustrato más eficiente, no es suficiente con la suposición de unión que nos aporta docking, sino que es necesaria la simulación de estos procesos.

Esta descripción más detallada del sistema la podemos obtener mediante Mecánica Cuántica o clásica (QM) en la que no solo se tiene en cuenta la estructura, sino que también se tienen en cuenta la distribución electrónica y la reactividad química.

La Dinámica Molecular (DM) está basada en la mecánica clásica y mediante esta técnica se lleva a cabo la simulación de macromoléculas como el ADN o las proteínas.

Por lo tanto, tras un estudio de acoplamiento molecular o docking en el que se hace una suposición del modo de unión que tiene lugar entre sustrato y enzima, se va a ver, mediante dinámica molecular, como varía esa conformación, cuando se somete a un campo de fuerza. [18]

El acoplamiento molecular, en realidad, no es una técnica que se lleve a cabo de manera aislada o independiente si no que habitualmente está integrada en una cadena de trabajo en la que intervienen diferentes técnicas tanto in silico como experimentales. [16]

#### **4 OBJETIVOS**

- Realización de una revisión bibliográfica de los principios básicos de reacciones catalizadas por enzimas y las ventajas que supone su aplicación en síntesis química.
- Revisión bibliográfica para conocer las bases de la técnica de acoplamiento molecular basada en la estructura o docking y su aplicación.
- Aportar ejemplos de aplicaciones de la técnica docking en el desarrollo de fármacos en cuya actividad intervienen enzimas.

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Clasificación de enzimas según el tipo de reacción que catalizan.

La clasificación realizada por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular de las enzimas según el tipo de reacción que cataliza, divide a éstas en 6 grupos:

- Oxidorreductasas (EC1): catalizan reacciones redox, mediante la transferencia de electrones, produciendo la reducción y oxidación del sustrato. Reducen dobles enlaces, catalizan el proceso reversible de oxidación de alcoholes y aminas, son también las responsables de los procesos de oxigenación de enlaces C-H o compuestos aromáticos. Para que las reacciones tengan lugar, necesitan de la presencia de cofactores redox, como puede ser NAD(P) o FMN, que van a ser los donantes de electrones necesarios para las reacciones. Desde hace siglos, por su participación en las reacciones de fermentación, han sido las más usadas.
- Transferasas (EC2): catalizan la transferencia de grupos funcionales entre sustratos. Actualmente tienen gran importancia las aminotransferasas, en concreto las transaminasas, al convertir cetonas en aminas enantioméricamente puras que tienen un elevado rendimiento.
- Hidrolasas (EC3): catalizan la rotura de una molécula mediante la adición de una molécula de H<sub>2</sub>O disociada ( $OH^-$  y  $H^+$ ), reacción conocida como hidrólisis.
- Liasas (EC4): catalizan reacciones en las que se rompen enlaces C-C, C-O, y C-N, obteniendo como productos moléculas con dobles enlaces o liberación de grupos químicos.
- Isomerasas (EC5): catalizan la conversión de la molécula en su isómero. Catalizan reacciones de isomerización, racemización y epimerización.
- Ligasas (EC6): catalizan la formación de enlaces entre varias moléculas dando lugar a una molécula de mayor complejidad. Para llevar a cabo su acción, necesitan energía que se obtiene de la disociación ATP. [1][2][3][5][6]

TIPO DE ENZIMAS	NÚMERO DE ENZIMAS		UTILIDAD
	Clasificadas	Disponibles	
Oxidorreductasas (EC1)	700	100	+++
Transferasas (EC2)	750	100	++
Hidrolasas (EC3)	650	180	+++
Liasas (EC4)	300	40	++
Isomerasas (EC5)	150	6	+
Ligasas (EC6)	80	5	+

**Tabla 1:** clasificación de las enzimas según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular. [3]

La utilidad en términos prácticos, es decir, la importancia para la aplicación práctica de las enzimas en la síntesis orgánica no es la misma para todos los grupos. Como puede verse en la columna de utilidad de la Tabla 1, las 4 primeras son las más utilizadas, en primer lugar oxidorreductasas e hidrolasas, seguidas de transferasas y liasas. Mientras que isomerasas y ligasas son las de menor aplicación práctica. [3][6]

Se estima que hay un total de 25000 enzimas presentes en la naturaleza, de las cuales, en la actualidad, sólo hay reconocidas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) aproximadamente 3700 enzimas, y solo un 10% de estas se encuentran comercializadas. Este hecho nos demuestra que la mayor parte de ellas están aún por descubrir. La cantidad de enzimas, de cada uno de los grupos, que están clasificadas y las que se encuentran disponibles para su utilización, también podemos verlas en los datos de la Tabla 1 con anterioridad. [3]

## 5.2 Clasificación de los diferentes métodos de docking

Para comprender los diferentes tipos de docking que existen, es necesario conocer previamente cuáles son los mecanismos propuestos de unión entre ligando y receptor:

- Teoría llave-cerradura: el ligando encaja en el receptor como lo hace una llave en una cerradura. Propuesta por Fischer. Los primeros métodos de acoplamiento se basaban en esta teoría, en la que se trataba a ligando y receptor como cuerpos rígidos.
- Luego la teoría del ajuste inducido, creada por Koshland, lleva la teoría de la llave-cerradura un paso más allá, afirmando que el sitio activo de la enzima se reforma continuamente por interacciones con los ligando a medida que estos interactúan con él. [8][9][10]

Siguiendo estas dos teorías y teniendo en cuenta la gran cantidad de grados de libertad conformacional con los que tiene que trabajar docking, han surgido diferentes metodologías basadas en las siguientes aproximaciones:

Docking rígido: ligando y diana se consideran como elementos rígidos, no tiene en cuenta los grados de libertad conformacional naturales de ambas moléculas. Ambos, se unen sin que se produzca ninguna modificación en los ángulos y longitudes de enlace. Esta aproximación no se utiliza en la práctica, ya que no tiene en cuenta la naturaleza flexible tanto del sustrato o ligando como del receptor. [8][10][12]

Docking de diana rígida y ligando flexible: principalmente se basa en la búsqueda de la conformación que adopta el ligando. En base a que la teoría de la llave-cerradura es una teoría aceptable en los posibles modelos de unión, no se considera a la diana como molécula de naturaleza flexible. Este método está basado en la teoría del ajuste inducido, donde el ligando posee flexibilidad y se adapta a la forma de la diana cuando se une. [8][10][12]

Podemos encontrar tres tipos de métodos:

- Construcción incremental. Mediante la fragmentación del ligando y unión de forma secuencial a la diana, se estudia la conformación al vuelo dentro del sitio de unión. Este método es empleado en programas como FlexX o Surflex.

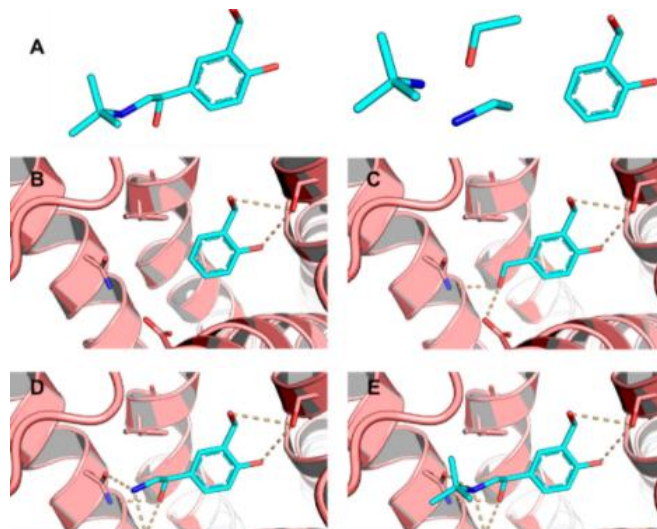


Figura 10. Ejemplo de acoplamiento molecular de diana rígida y ligando flexible por construcción incremental

- Conformaciones pre-calculadas del ligando. Antes de emplear docking, se generan y guardan en una base de datos las conformaciones del ligando. Este método es la base de programas como CRDOCK y GLIDE.
- Generación de conformaciones *in situ*, en este caso la totalidad del ligando se va adaptando al sitio de unión a la diana

Las técnicas que se usan con mayor frecuencia, son:

1. Complementariedad de forma. Evalúa la concordancia de conformación geométrica entre ligando y diana. Es usada en programa DOCK.

2. Algoritmos genéticos. Técnicas con base genética (teoría de la evolución de Darwin o teoría de la herencia de Lamarck) que son usadas en programas GOLD y AutoDock.
3. Algoritmos de Monte Carlo. Se generan grupos de rotación, traslación y orientación de los ligandos y después se evalúan mediante una función de scoring. Usado en el programa de LigandFit.
4. Búsqueda tabú. Se van probando diferentes poses y se elabora una lista con las poses que ya se hayan producido y los sitios que ya se hayan ocupado. Usado en programa PRO LEADS.
5. Y por último algoritmos bio-inspirados, inspirados en estrategias de las colonias de hormigas o en la inteligencia de los enjambre. Usado en programa PLANTS.

Docking flexible: el ligando se considera siempre flexible y en este caso los métodos utilizados son clasificados según el grado de flexibilidad de la diana. La realización de este método basado en el acoplamiento flexible requiere más tiempo y rendimiento, pero aun así es muy utilizado en la actualidad.

Entre las aproximaciones que forman este método, encontramos:

- Soft docking. Simula el efecto de acoplamiento inducido, se relajan los potenciales de la interacción y se produce una extensión del tamaño del sitio activo. Programas Glide y GOLD.
- Algoritmos de Monte Carlo. Se prueban ligandos con diferentes grados de rotación y se ven los cambios que sufre la diana. Programas GOLD, Glide, AutoDock, FlexX e ICM.
- Esquema del complejo. Cuando se dispone de diferentes estructuras de la diana, se procede a realizar varios docking con cada una de las estructuras de la diana y se calcula el valor medio de todos los resultados obtenidos. AutoDock, ICM, Glide o GOLD. [8][10][12]

Entre las aplicaciones de la técnica molecular de docking podemos encontrar:

- Filtrado virtual de gran cantidad de moléculas en el proceso de descubrimiento de fármacos
- Selección de compuestos complementarios al receptor que puedan unirse a él. Identificación de los componentes de la estructura involucrados en la unión.
- Se puede usar para identificar otra serie de dianas para los cuales los ligandos presentan también una buena complementariedad, algunos de los cuales son potencialmente responsables de reacciones adversas inesperadas a los medicamentos.
- También se emplea en la identificación de ligandos que se unen simultáneamente a un grupo de dianas de interés seleccionados, y ejercen varios efectos fisiológicos al mismo tiempo.

- Para conocer nuevas indicaciones de compuestos farmacológicos ya caracterizados, es decir, para conocer nuevas dianas terapéuticas de ligandos ya conocidos. [11]

## 6 RESULTADOS

En este apartado se realiza una búsqueda bibliográfica de ejemplos donde se aplica esta técnica de acoplamiento molecular o docking, en el estudio conformacional de la unión de sustrato y enzima, y las interacciones que se establecen entre ellos. Algunos de estos ejemplos son:

La familia Flaviviridae es una familia de virus que pueden transmitirse desde animales a humanos por vectores artrópodos como garrapatas y mosquitos. Son los causantes de gran variedad de enfermedades en humanos y en algunas especies animales. Esta familia incluye cuatro géneros principales: Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus y Pegivirus, además de algunos virus no clasificados. En total esta familia incluye 67 virus. Algunos de ellos son el virus del dengue (DENV), el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas.

Aún no se han desarrollado terapias antivirales eficaces para tratar este tipo de infecciones, a pesar del gran impacto en salud pública, a nivel mundial, que provocan virus como el virus del dengue u otros flavivirus.

El genoma del virus del dengue (DENV) consta de una sola cadena de ARN de sentido positivo, que se acopla a una serie de complejos ubicados en la membrana del retículo endoplásmico de la célula huésped. Estos complejos a los que se produce el anclaje del virus, contienen las proteínas no estructurales 3 y 5 de DENV y también otras proteínas del huésped. El ARN de este virus contiene una región no traducida 5', un marco de lectura abierto y otra región no traducida 3'. El marco de lectura abierto codifica una proteína que al ser procesada por las proteasas virales y del huésped, genera diez proteínas virales maduras: tres de ellas estructurales (cápsida y envuelta) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B Y NS5). El dominio de secuencias de la polimerasa NS5 junto con otras proteínas del virus y de la célula huésped son los responsables de la formación de intermedios de ARN bicatenario, en sentido positivo y negativo.

Las hebras de sentido negativo son las plantillas usadas por las que DENV RdRp (polimerasa) sintetiza un nuevo ARN genómico de sentido positivo. Estas enzimas con actividad RdRp son únicas de este tipo de virus y esenciales para su replicación. El hecho de que estas enzimas no se encuentren en células humanas, lo convierte en una diana de estudio para el desarrollo de fármacos antivirales.

Los inhibidores de la polimerasa son de dos tipos: análogos de nucleósidos/nucleótidos (IN) e inhibidores no nucleósidos. A veces, debido a la falta de selectividad, los IN pueden tener efectos fuera de la diana, como por ejemplo en la ADN polimerasa mitocondrial y producen efectos adversos, causando toxicidad.

El primer inhibidor alostérico de la DENV RdRp fue el compuesto NITD-1, identificado mediante cribado de alto rendimiento, el segundo se modificó en el plomo del ácido N-sulfonilantranílico, compuesto NITD-2. NITD-29 es un compuesto fotorreactivo de NITD-2, que



se ha utilizado para mapear el sitio de unión del compuesto y por tanto definir el sitio alostérico.

Tras la previa preparación de receptor y ligando, se realiza el acoplamiento molecular con AutoDock mediante el uso de una cuadrícula 24x24x24 puntos que se centran en los residuos de Arg737, Thr413 y Met343 de la proteasa DENV RdRp. Se calculan las variaciones de la energía libre y aquellas moléculas con menor energía se seleccionan como moduladores.

La espectrometría de masas del complejo NITD29/NS5 UV reticulado y las simulaciones de acoplamiento molecular han ayudado a definir mejor el bolsillo de unión alostérico cerca de los residuos de Arg737, Thr413 y Met343 situados en el túnel de la plantilla de ARN. El mejor conocimiento de la diana, permitió la selección de posibles inhibidores con mayor afinidad, buen perfil farmacocinético y baja toxicidad, lo que implica una mayor probabilidad de éxito en la búsqueda del tratamiento de infecciones causadas por este virus. [15]

Otro ejemplo de aplicación de técnicas de acoplamiento molecular se llevó a cabo en estudios de los compuestos piroxicam, meloxicam, lornoxicam, normeloxicam y 4-meloxicam. Todo ellos son AINEs, fármacos que ejercen una acción inhibitoria sobre la enzima COX (ciclooxigenasa) y son usados procesos dolorosos o inflamatorios. El piroxicam, inhibidor no selectivo, fue elegido como prototipo de esta familia. Normeloxicam y 4'-meloxicam, también inhibidores no selectivos, son elegidos para analizar cómo influye, en la selectividad por la COX-2 del meloxicam, la presencia del grupo metilo en la posición 5 del sulfatiazol. Por último, el lornoxicam, también no selectivo, se usa para ver la influencia que tiene el anillo de benceno en la interacción con la COX y qué efectos tendrá si es reemplazado por otros grupos equivalentes.

Tras efectuar un barrido del espacio conformacional mediante Dinámica Molecular, y optimización posterior de todas las conformaciones, se realiza el docking con la enzima (COX) de todas las conformaciones de mínima energía obtenidas anteriormente. La realización de este docking se realiza a través del programa FlexX versión 3.0.2. para Linux, que permite la predicción de los modos de unión de los compuestos en el sitio catalítico de la enzima y de las interacciones que tienen lugar.

Cuando se analizan los complejos de las formas enzimáticas COX-1 y COX-2 unidas a meloxicam, se observa que se establecen interacciones hidrofóbicas del grupo benceno del meloxicam con residuos adyacentes de los centros catalíticos, se forman dos enlaces de hidrógeno entre el anillo tiazina del sustrato y residuos de serina y valina de la COX-2, y un enlace de hidrógeno del anillo con un resto de serina de la COX-1. También se demostró que el anillo de tiazol que forma parte del sustrato, formaba dos enlaces de hidrógeno con el residuo de arginina de la COX-2 y además de este enlace, un enlace de hidrógeno y una interacción hidrofóbica con la tirosina de la diana. [16]



El modelo de acoplamiento molecular se utilizó para el estudio de la proteasa 3CL, responsable del control de las principales funciones del virus que hacen posible la replicación. Como base de datos se utilizó "Zinc15 database", que contiene información de diversos antivirales aprobados por agencias de alta vigilancia como la FDA.

Los fármacos analizados para estudiar su efectividad frente a SARS-CoV\_2 fueron Zanamivir, Bortezomib, Idinavir, Saquinavir, FAD Adeflavin, Coenzima A, Tiludronato, Iomperol, Cangrelos, Carfilzomib y Remdesivir.

Los estudios de acoplamiento molecular in silico demostraron que los antivirales Zanamivir, Idinavir, Saquinavir y Remdesivir son capaces de inhibir la proteasa viral 3CL. Tras los análisis con modelos computacionales, los resultados parecen ser prometedores ya que estos antivirales están aprobados para su tratamiento en otros virus ARN. Zanamivir por ejemplo está aprobado para el tratamiento de Influenza A y B, Indinavir y Sequinavir han sido utilizados en el tratamiento y prevención del SIDA. Remdesivir se ha usado para tratar SARS, ébola y actualmente está siendo usado en pacientes infectados por SARS-CoV-2.

Serán necesarias investigaciones posteriores para comprobar lo demostrado por estos modelos computacionales, pero es un buen inicio para la búsqueda de evidencia de acción, contra este virus, de fármacos ya utilizados y registrados en las distintas agencias sanitarias. [17]

## **7 CONCLUSIONES**

Tras realizar una revisión bibliográfica, tanto del concepto de reacciones biocatalíticas y sus propiedades como de los principios básicos de la técnica docking. Podemos concluir que, debido a que las enzimas son capaces de distinguir entre varios sustratos uniéndose de forma específica a uno de ellos, distinguir entre grupos funcionales, poseen afinidad por un único enantiómero, las condiciones a las que tienen lugar las reacciones son muy suaves y evitan la formación de compuestos indeseables, son biodegradables, las reacciones se producen a una elevada velocidad y tienen un elevado poder catalítico, se han posicionado como una alternativa importante en el desarrollo de nuevas moléculas químicas, compitiendo así con la química orgánica tradicional. En los últimos años se ha producido un incremento en la investigación de estas reacciones enzimáticas, se ha convertido en una diana de interés dentro de la investigación. Para llevar a cabo estos estudios de investigación y conocer mejor cuál es la estructura de la enzima, la de los sustratos que se unen a ella y poder conocer la orientación del complejo que forman en su unión, se han comenzado a aplicar técnicas informáticas de acoplamiento molecular.

La técnica de acoplamiento molecular basada en la estructura o técnica docking nos va a permitir conocer mediante la simulación de las diferentes conformaciones o poses que adoptan sustrato y enzima cuando se unen, cuales de estas poses tienen menor energía de enlace y por tanto conocer cuales van a ser las posiciones más estables. Este conocimiento nos da información de que residuos se podrían modificar, de la estructura de diferentes sustratos y enzimas, haciendo que aumente la afinidad de complejo de unión y produciendo así un aumento de la efectividad de la acción. Este hecho aumenta la probabilidad de éxitos en las reacciones enzimáticas. Este punto es de especial interés en el desarrollo de

tratamientos para las distintas patologías, ya que nos puede ayudar a la consecución de nuevos tratamientos más eficaces o a la mejora de tratamientos ya existentes.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. K. Robinson, "Enzymes: principles and biotechnological applications," *Essays Biochem.*, vol. 59, pp. 1–41, Nov. 2015, doi: 10.1042/BSE0590001.
- [2] S. Alcántara, "Biotransformaciones-Biocatalisis Conceptos básicos." [Online]. Available: [www.biotransformaciones.com](http://www.biotransformaciones.com).
- [3] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [4] M. Arroyo, C. Acebal, and I. De La Mata, "Biocatálisis y biotecnología," *Arbor*, vol. 190, no. 768, p. a156, Aug. 2014, doi: 10.3989/arbor.2014.768n4010.
- [5] Tao, J. A.; Kazlauskas, R. J. *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, John Wiley & Sons: 2011
- [6] V. Gotor, M.J. Hernáiz. "Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica". *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, ISSN 1575-3417, ISSN-e 1575-3417, Nº 1, 2017, págs. 27-35.
- [7] L. Ferreira, R. dos Santos, G. Oliva, and A. Andricopulo, "Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies," *Molecules*, vol. 20, no. 7, pp. 13384–13421, Jul. 2015, doi: 10.3390/molecules200713384.
- [8] M. Gupta, R. Sharma, and A. Kumar, "Docking techniques in pharmacology: How much promising?," *Computational Biology and Chemistry*, vol. 76. Elsevier Ltd, pp. 210–217, Oct. 01, 2018, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005.
- [9] R. Pouplana, X. Barril and F.J. Luque. "Química computacional en diseño de fármacos" <http://www.xrqtc.com/wp-content/uploads/2014/07/articlemarchLSL.pdf>.
- [10] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, "Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery," *Curr. Comput. Aided-Drug Des.*, vol. 7, no. 2, pp. 146–157, Nov. 2012, doi: 10.2174/157340911795677602.
- [11] L. Pinzi and G. Rastelli, "Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 18. MDPI AG, Sep. 01, 2019, doi: 10.3390/ijms20184331.
- [12] A. Morreale, A. Perona, J. Klett, A. Cortés-Cabrera y H. G. Dos Santos. Parte V. "Dinámica estructural y diseño de fármacos". Cap 16. "Diseño de fármacos asistido por ordenador" págs. 401-424.
- [13] T. A and B. VA, "Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock," *J. Mol. Med. Clin. Appl.*, vol. 2, no. 1, Feb. 2018, doi: 10.16966/2575-0305.106.
- [14] M. M. Rachman, X. Barril, and R. E. Hubbard, "Predicting how drug molecules bind to their protein targets," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 42. Elsevier Ltd, pp. 34–39, Oct. 01, 2018, doi: 10.1016/j.coph.2018.07.001.
- [15] V. Galiano, P. Garcia-Valtanen, V. Micol, and J. A. Encinar, "Looking for inhibitors of the dengue virus NS5 RNA-dependent RNA-polymerase using a molecular docking approach," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 10, pp. 3163–3181, Oct. 2016, doi: 10.2147/DDDT.S117369.
- [16] J. H. Gris, M. A. Dragonetti, B. M. Fernández, and A. G. Moglioni, "Modelado Molecular e Interacción Enzima-Ligando (Docking) de Antiinflamatorios Derivados de 4-Hidroxi 1,2-

Benzotiazinas-3-Carboxamidas, 1,1-Dióxido,” Inf. tecnológica, vol. 20, no. 4, pp. 51–61, 2009, doi: 10.4067/s0718-07642009000400007.

[17] Hall D et al. A Search for Medications to Treat COVID-19 via in silico Molecular Docking Models of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein and 3CL Protease. Travel Medicine. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101646>.

[18] J.A. Bueren-Calabuig. Parte V. “Dinámica estructural y diseño de fármacos”. Cap 17. Dinámica Molecular.