

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica**

**Receptor-based drug design, virtual screening and molecular docking studies for new human acetylcholinesterase inhibitors with potential therapeutic application**

**Diego Alejandro Silva Valero**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
2023

**Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica**

**Diego Alejandro Silva Valero**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Químico Farmacéutico**

Director (a):  
Fabián Orozco López. Ph.D.

Grupo de Investigación:  
Grupo de Estudios en Síntesis y Aplicaciones de Compuestos Heterocíclicos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
Año 2023

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

*“En las montañas de la verdad, nunca puedes escalar en vano: o llegarás a un punto más alto hoy, o entrenarás tus poderes para poder escalar más alto mañana.”*  
*-Friedrich Nietzsche-*

## **Agradecimientos**

A mis queridos padres y hermano, cuyo inquebrantable apoyo ha sido mi mayor fortaleza a lo largo de mi carrera universitaria. Su amor, aliento y sacrificios han sido la luz que ilumina este camino académico.

A Angie, Nicolás, Camila y a todos quienes me acompañaron a lo largo de este proceso académico. Su apoyo y amistad no solo contribuyó a mi desarrollo académico, sino que también fue fundamental en mi crecimiento personal.

A Pablo y Ana, les agradezco sinceramente por su comprensión y apoyo constante durante este proceso. Su presencia, paciencia y aliento fueron fundamentales en los momentos desafiantes. Valoré mucho sus consejos y guía.

Al profesor Fabian Orozco, mi director de tesis, quien generosamente compartió su conocimiento y me brindó la oportunidad de sumergirme en el fascinante mundo de la investigación de fármacos. Su orientación fue invaluable a lo largo de este trabajo.

A Cresset y BioSolveIT, agradezco la oportunidad de acceder a sus software mediante licencias académicas.

## **Resumen**

La enfermedad de Alzheimer es la causa principal de demencia y preocupa por su acelerado crecimiento, proyectándose a 113 millón de afectados para el año 2050. Este trastorno impacta significativamente las capacidades cognitivas, afectando la vida social y laboral de los individuos. Los tres tratamientos actuales, limitados a tres fármacos: donepezilo, galantamina y rivastigmina; enfrentan eventos adversos y múltiples administraciones diarias, desafiando la adherencia del paciente.

Este proyecto se enfocó en desarrollar inhibidores de acetilcolinesterasa mediante un enfoque *in silico*. Primero se identificaron las características farmacofóricas de estos inhibidores para llevar a cabo una búsqueda de moléculas que cumplieran con éstas en la base de datos ZINC 12. Las moléculas obtenidas se sometieron a un cribado virtual, donde más del 70% mostró una energía de afinidad inferior a la del donepezilo. Luego se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de las moléculas mejor puntuadas y se seleccionaron las dos más prometedoras. A partir de estas, se propusieron siete análogos optimizados que tuvieran mayor afinidad por el receptor con características toxicológicas y farmacocinéticas favorables.

**Palabras clave:** *Enfermedad de Alzheimer, acetilcolinesterasa, docking molecular, cribado virtual, farmacóforo.*

## **Abstract**

Alzheimer's disease is the principal cause of dementia rising concern due to its escalating prevalence, with projections indicating 113 million affected individuals by 2050. This disease affects cognitive capacities that damage the social and work life of individuals. Nowadays there are three available pharmacological treatments (donepezil, galantamine, and rivastigmine) that carry various adverse effects and multiple doses a day which represent a challenge to the adherence to this treatment.

The aim of this project is to develop acetylcholinesterase inhibitors from a *in silico* approach. First, the characteristics of the pharmacophore were identified to then perform a research of molecules that satisfied these characteristics in the database ZINC 12. The obtained molecules were put through a virtual screening in which more than 70% showed a smaller affinity energy than donepezil. Pharmacokinetic properties were then evaluated in the molecules with higher scores, from which the two most promising ones were selected. From these, seven optimized analogues were proposed so that they presented greater affinity for the receptor with favorable toxicological and pharmacokinetic characteristics.

**Keywords:** *Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, molecular docking, virtual screening, pharmacophore.*

## TABLA DE CONTENIDO

1	OBJETIVOS .....	12
1.1	Objetivo general .....	12
1.1.1	Objetivos específicos.....	12
2	INTRODUCCIÓN .....	13
3	MARCO TEÓRICO.....	14
3.1	Descubrimiento de fármacos en la historia.....	14
3.2	Diseño de fármacos asistido por computador .....	14
3.3	Docking molecular .....	15
3.3.1	Algoritmo de muestreo.....	16
3.3.2	Función de puntuación .....	18
3.4	Modelamiento farmacofórico .....	19
3.4.1	Cribado virtual.....	20
3.5	Enfermedad de Alzheimer .....	20
3.5.1	Placas seniles.....	21
3.5.2	Enredos neurofibrilares .....	21
3.5.3	Perdida sináptica .....	21
3.5.4	Hipótesis colinérgica.....	21
3.6	Acetilcolinesterasa.....	21
4	ESTADO DEL ARTE.....	24
4.1	Inhibidores de acetilcolinesterasa.....	24
4.1.1	Tacrina.....	25
4.1.2	Donepezilo .....	25
4.1.3	Rivastigmina.....	25
4.1.4	Galantamina .....	26
4.2	Nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa .....	26
4.2.1	Búsqueda de inhibidores de acetilcolinesterasa de origen natural .....	26
4.2.2	Búsqueda de inhibidores de acetilcolinesterasa con herramientas DFAC .....	28
5	METODOLOGÍA .....	31
5.1	Software y recursos utilizados .....	31
5.2	Refinamiento de estructuras cristalinas utilizadas.....	32

5.3	Extracción de características para el modelo farmacofórico .....	32
5.4	Construcción del modelo farmacofórico y búsqueda .....	32
5.5	Cribado virtual con herramientas de docking.....	32
5.5.1	AutoDock .....	33
5.5.2	AutoDock Vina .....	33
5.5.3	DOCK6.....	33
5.5.4	Flare.....	34
5.6	Promedio de puntuación de auto escalado.....	34
5.7	Propiedades farmacocinéticas.....	34
5.8	Optimización 3D-QSAR bioisostérica .....	34
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
6.1	Modelo farmacofórico y búsqueda .....	36
6.2	Cribado virtual con herramientas de docking.....	39
6.3	Consenso y análisis farmacocinético.....	45
6.4	Optimización bioisostérica 3D-QSAR y propiedades tóxicas.....	53
6.4.1	Optimización de NAPH .....	53
6.4.2	Optimización de CHRO .....	62
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
7.1	Recomendaciones .....	71
8	BIBLIOGRAFÍA .....	72

## Figuras

<b>Figura 1.</b> Diseño de fármacos asistido por computador.....	15
<b>Figura 2.</b> Enfoque del docking rígido: .....	16
<b>Figura 3.</b> Formas de la acetilcolinesterasa: .....	22
<b>Figura 4.</b> Representación del sitio activo de la enzima AChE. ....	23
<b>Figura 5.</b> Estructura de los fármacos inhibidores de AChE usados en terapéutica. ....	24
<b>Figura 6.</b> Estructuras de los tres norditerpenoides aislados de <i>Delphinium uncinatum</i> con actividad inhibitoria sobre AChE. ....	27
<b>Figura 7. A:</b> Estructura de la molécula 64 (CMNPD8714) encontrada por Gade y su equipo <b>B:</b> Estructuras de las moléculas con actividad inhibitoria moderada frente a AChE, encontradas por Atanasova y su equipo.....	28
<b>Figura 8. A:</b> Estructura de la molécula A1 encontrada por El Khatabi y su equipo <b>B:</b> Estructuras de los compuestos promisorios como AChEi, encontrados por Targowska-Duda y su equipo.....	29
<b>Figura 9. A:</b> Estructura de la molécula S-I 26 con mayor potencia encontrada por David y su equipo <b>B:</b> Estructuras de los compuestos promisorios como AChEi, encontrados por Khan y su equipo. ....	30
<b>Figura 10.</b> Diagramas de interacción 2D del re-docking del DNP. ....	36
<b>Figura 11.</b> Diagrama de interacciones 2D de la AChE en complejo con GNT (4EY6).....	37
<b>Figura 12.</b> Construcción del modelo farmacofórico. ....	38
<b>Figura 13.</b> Diagramas de dispersión de la energía de afinidad de los compuestos obtenidos en ZINC12.....	42
<b>Figura 14.</b> Estructuras de las moléculas con peores resultados en DOCK6. ....	43
<b>Figura 15.</b> Diagrama de dispersión del promedio de puntuación de auto escalado para el set de moléculas sometidas al cribado virtual. ....	48
<b>Figura 16.</b> Diagrama del huevo hervido para las moléculas que no violaron la regla de Lipinski. ....	52
<b>Figura 17.</b> Diagrama de interacciones 2D para los complejos NAPH – AChE. ....	54
<b>Figura 18.</b> Ruta de optimización para NAPH_AD.....	55
<b>Figura 19.</b> Diagrama de interacciones 2D para NAPH_AD optimizado. ....	56
<b>Figura 20.</b> Ruta de optimización para NAPH_D.....	57
<b>Figura 21.</b> Diagrama de interacciones 2D para NAPH_D optimizado. ....	58
<b>Figura 22.</b> Ruta de optimización para NAPH_V.....	59
<b>Figura 23.</b> Diagrama de interacciones 2D para NAPH_V optimizado. ....	60
<b>Figura 24.</b> Ruta de optimización para NAPH_F. ....	60
<b>Figura 25.</b> Diagrama de interacciones 2D para NAPH_F optimizado.....	61
<b>Figura 26.</b> Diagrama de interacciones 2D para los complejos CHRO – AChE.....	62
<b>Figura 27.</b> Ruta de optimización de para CHRO_AD.....	63
<b>Figura 28.</b> Diagrama de interacciones 2D para CHRO_AD luego de la optimización.....	64
<b>Figura 29.</b> Ruta de optimización para CHRO_D. ....	65
<b>Figura 30.</b> Diagrama de interacciones 2D para CHRO_D optimizado. ....	66

<b>Figura 31.</b> Ruta de optimización para CHRO_V. ....	66
<b>Figura 32.</b> Diagrama de interacciones 2D para CHRO_V optimizado. ....	67
<b>Figura 33.</b> Ruta de optimización para CHRO_F. ....	68
<b>Figura 34.</b> Diagrama de interacciones 2D para CHRO_F optimizado. ....	69

## Tablas

<b>Tabla 1.</b> Listado de software utilizado. ....	31
<b>Tabla 2.</b> Listado de estructuras cristalinas utilizadas. ....	31
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de configuración del grid para 7XN1. ....	33
<b>Tabla 4.</b> Características del modelo farmacofórico construido con ZINCPharmer. ....	39
<b>Tabla 5.</b> Energías de afinidad frente a AChE del set de moléculas encontradas mediante el modelo farmacofórico en los cuatro softwares de docking. ....	39
<b>Tabla 6.</b> Valores de $X_{\max}$ y $X_{\min}$ de energía obtenidos en cada software. ....	45
<b>Tabla 7.</b> Resultados del método de consenso para el set de moléculas sometidas al cribado virtual con docking. ....	45
<b>Tabla 8.</b> Parámetros de la regla de Lipinski aplicados a las moléculas elegidas por cribado virtual. ....	49
<b>Tabla 9.</b> Propiedades tóxicas de los candidatos elegidos para optimización. ....	53
<b>Tabla 10.</b> Propiedades farmacocinéticas y tóxicas de las moléculas resultado de la optimización de NAPH. ....	62
<b>Tabla 11.</b> Propiedades farmacocinéticas y tóxicas de las moléculas resultado de la optimización de CHRO. ....	69
<b>Tabla 12.</b> Estructuras de las moléculas propuestas como inhibidores de AChE con aplicación en terapéutica. ....	70

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo general**

Desarrollar nuevos heterociclos inhibidores de acetilcolinesterasa con potencial actividad biológica sobre el sistema nervioso central desde una metodología de diseño racional asistido por computador, teniendo en cuenta la determinación de propiedades ADMET, cribado virtual y acoplamiento molecular.

#### **1.1.1 Objetivos específicos**

- Revisar los antecedentes en la literatura sobre el uso de la acetilcolinesterasa como blanco molecular en el diseño de compuestos con actividad biológica sobre el sistema nervioso central.
- Establecer el estado del arte con respecto a los inhibidores de acetilcolinesterasa, su estructura química y su aplicación en el tratamiento de afecciones del sistema nervioso central.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular (docking) de los candidatos preseleccionados empleando herramientas computacionales.
- Determinar propiedades ADMET y optimizar estructuras para llevar a cabo una preselección de prototipos moleculares más promisorios y candidatos a continuar el estudio.

## 2 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que está caracterizado por la presencia neuronal de placas de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) extracelulares, y ovillos neurofibrilares intracelulares de la proteína tau. La presentación más frecuente de la enfermedad de Alzheimer es el deterioro cognitivo asociado con amnesia, no obstante, también es posible, aunque menos frecuente, que se presente sin esta (1).

La epidemiología de la EA guarda una estrecha correlación con la demencia, dado que la EA constituye la principal etiología de este trastorno cognitivo. Se espera que la prevalencia de la demencia por cualquier causa aumente de 50 millones de personas en 2010 a 113 millones en 2050 en todo el mundo, este aumento está estrechamente relacionado con una mayor esperanza de vida en países de ingresos medios-altos y altos (1). Este incremento acelerado plantea un desafío considerable para los sistemas de salud, lo que subraya la necesidad urgente de encontrar tratamientos más efectivos para aliviar la carga social y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Hasta la fecha, las aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de la EA se limitan a unos pocos inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEi) y un agonista del receptor NMDA. Sin embargo el desarrollo de nuevos medicamentos ha resultado ser un reto complejo, pues los esfuerzos por desarrollar nuevas terapias no han resultado exitosos. Un claro ejemplo es el esfuerzo por desarrollar medicamentos anti- $A\beta$ , que en un principio parecen prometedores, sin embargo, no demuestran ningún efecto positivo en ensayos clínicos. A pesar de que existen otros trabajos enfocados en el desarrollo de nuevas terapias, como medicamentos dirigidos a disminuir la acumulación de la proteína tau, persiste la necesidad de desarrollar nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa que superen las limitaciones actuales en términos de seguridad y eficacia terapéutica.

En este escenario, el presente proyecto se centra en el diseño y evaluación *in silico* de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa, utilizando la información disponible en la literatura sobre el receptor, herramientas de cribado virtual basadas en propiedades ADMET y docking molecular. Con el propósito de proponer leads con un buen perfil de seguridad, capaces de continuar en el proceso de desarrollo.

## 3 MARCO TEÓRICO

### 3.1 Descubrimiento de fármacos en la historia

Indagar en la historia del descubrimiento de fármacos es hacerlo en la propia historia de la humanidad, la civilización, y por supuesto, la ciencia. La naturaleza curiosa, observadora y metódica del hombre permitió en un principio encontrar en la naturaleza fuente de comida, identificar productos venenosos y también medicinas.

Es ampliamente reconocido que las primeras civilizaciones mantenían una estrecha relación entre el conocimiento médico-curativo y sus costumbres religiosas, esto implicaba que no todas las personas tenían acceso a él, y en la mayoría de las ocasiones se transmitía por tradición oral de una generación a otra. Una de las escasas muestras escritas de este conocimiento son los papiros de Ebers y de Smith, son documentos del antiguo Egipto cuya información se puede considerar como la primera farmacopea de la historia (2, 3).

El desarrollo del pensamiento humano en la antigua Grecia también influyó en el concepto de la salud y enfermedad de la época, pues creían que los medicamentos devolvían el balance de los humores corporales que se perdía cuando se presentaba la enfermedad. Otras grandes civilizaciones como la hindú y la china, también aportaron al crecimiento de la fitoterapia con tratados médicos como la medicina Ayurveda, entre otras.

En los siglos siguientes la fitoterapia fue el principal camino para el tratamiento de enfermedades, hasta principios del siglo XIX, donde la capacidad técnica-científica permitió extraer de las plantas los primeros fármacos, la primera de ellas fue la morfina, extraída del opio por Serturmer en 1817. Tan importante fue el aislamiento de los principios activos de las plantas, que la incipiente industria farmacéutica del momento se volcó en busca de nuevas moléculas, muchas de las cuales aún las seguimos utilizando como medicamento.

A finales del siglo XX el interés por los compuestos activos de plantas decayó, pues los tediosos métodos de extracción y la dificultad para hallar compuestos con actividad entorpecía el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas, esto impulsó el desarrollo de métodos que facilitaron la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos (2).

### 3.2 Diseño de fármacos asistido por computador

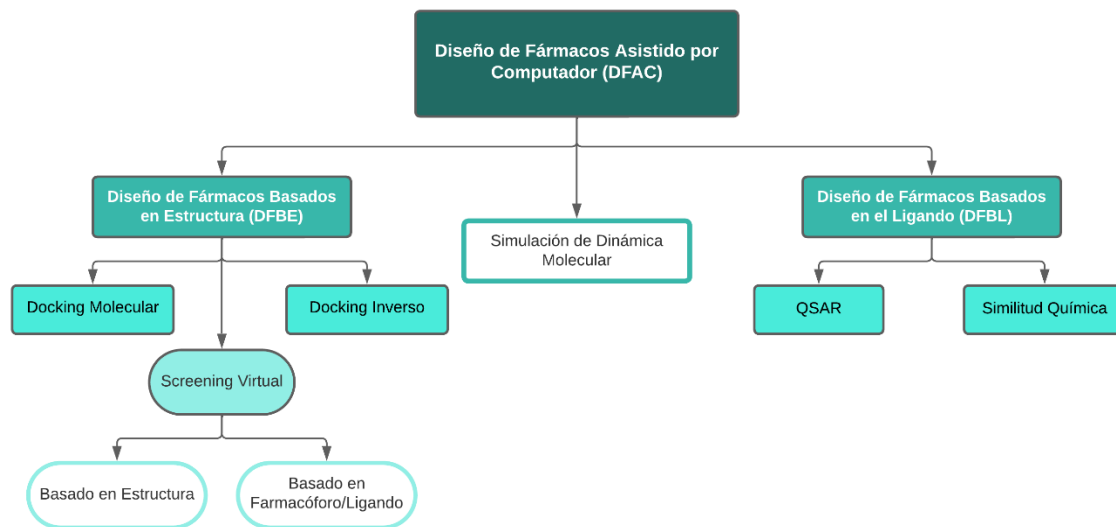
El proceso de investigación y desarrollo (I&D) tradicional de nuevos fármacos, fundamenta su enfoque en filtrar de forma iterativa en busca de moléculas activas que cumplan características específicas de cada fase de investigación. Naturalmente, esta búsqueda está ligada a la seguridad y eficacia en el paciente, por lo que el primer filtro busca encontrar moléculas activas frente a una diana molecular; el segundo, moléculas seguras y eficaces en animales, y el tercero lo hace en humanos. Según estadísticas de la industria farmacéutica se pueden sintetizar y probar alrededor de 10000 compuestos, solo 100 superan las pruebas de seguridad y eficacia, de los cuales solo 10

llegan a ser probados en humanos, con una alta probabilidad de que ninguno llegue al mercado. Es un proceso complicado y costoso que aproximadamente toma alrededor de 10 años (4).

Debido a los altos costos y el tiempo de desarrollo que son necesarios en el enfoque de I&D tradicional, el diseño de fármacos asistido por computador (DFAC) ofrece una ruta que disminuye el tiempo y la inversión de desarrollo, aumentando la probabilidad de éxito.

Si la comprensión de una patología es tal, que se puede entender lo que sucede a nivel molecular, entonces es posible diseñar moléculas que interactúen con una diana involucrada en el mecanismo de la enfermedad. Es aquí donde el surgimiento de técnicas como la cristalografía de rayos x, resonancia magnética nuclear y técnicas de purificación de alto rendimiento abren la puerta al DFAC, pues la información que proveen es capaz de dar un entendimiento sobre mecanismos moleculares y como los ligandos ejercen su actividad en una ruta específica (4, 5).

Según la calidad de la información disponible sobre la diana, el investigador puede seleccionar entre una u otra técnica de DFAC (Figura 1). Si se desconoce la estructura de la diana se puede recurrir a métodos de diseño basados en ligandos; pero si se conoce la estructura se puede usar el docking molecular, aprovechando la estructura tridimensional de la diana.



*Figura 1. Diseño de fármacos asistido por computador. Adaptado de (4).*

### 3.3 Docking molecular

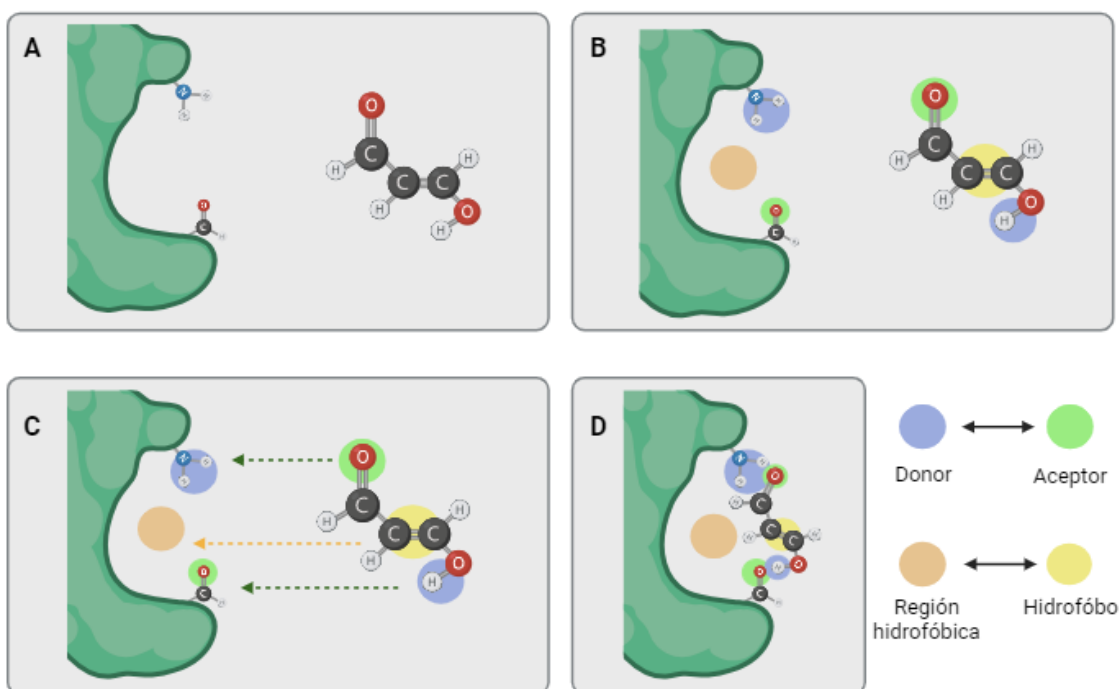
Desde la primera aproximación al docking molecular, publicada en 1982 por Kuntz y su equipo (6), el docking se ha convertido en el método de diseño de fármacos basados en estructura (DFBE) más ampliamente usado (7). El objetivo del docking es predecir el mejor complejo ligando-receptor, generando una serie de poses del ligando dentro del sitio de unión o sitio activo del blanco

molecular (4, 7, 8). Inicialmente el docking fue diseñado para realizarse entre una molécula pequeña y una proteína, pero actualmente ha aumentado el interés por desarrollar paquetes de software capaces de realizarlo entre proteína-proteína, ADN/ARN-ligando y ADN/ARN-proteína-ligando (7). Las aplicaciones del docking molecular en la I&D de nuevos fármacos es variada, pues este es útil en estudios de estructura actividad, optimización e identificación de leads.

El docking molecular consta principalmente de dos grandes etapas: Un algoritmo de muestreo, que busca las orientaciones del ligando energéticamente más favorables dentro del sitio activo y una evaluación de la calidad de cada pose por medio de una función de puntuación (4, 7, 8).

### 3.3.1 Algoritmo de muestreo

Aunque pueda parecer sencillo, el muestreo no es tarea trivial debido a los numerosos grados de libertad presentes tanto en el ligando como en la proteína. Esto, a su vez, determina las múltiples conformaciones posibles del complejo ligando-receptor, las cuales resultan ser inmensas. Por consiguiente, la identificación de todas ellas plantea un desafío computacional que supera la capacidad tecnológica actual.



**Figura 2.** Enfoque del docking rígido:

**A.** Proteína y ligando. **B.** Se añaden puntos a la proteína y ligando que describen sus características químicas. **C.** El algoritmo intenta emparejar donantes con aceptores y regiones hidrofóbicas con porciones hidrofóbicas. **D.** El algoritmo encuentra una posible solución. Adaptado de (7)

Los primeros algoritmos trataban de simplificar el problema al considerar a la proteína y al ligando como cuerpos rígidos, reduciendo así el problema a solo seis grados de libertad. Esta aproximación,

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

conocida actualmente como docking rígido, se ha mantenido en algunos softwares famosos, tal es el caso de DOCK (6). DOCK representa el sitio de unión de la proteína y al ligando como un conjunto de esferas de tamaño variable que busca superponer en función de la complementariedad geométrica y química (Figura 2). Versiones más recientes de DOCK, tienen en cuenta la flexibilidad del ligando generando un número de conformaciones al azar, que es múltiplo de los enlaces giratorios del ligando (4, 9).

La imposibilidad de muestrear la flexibilidad del ligando hace que el enfoque de docking rígido tenga una efectividad limitada, ya que la conformación óptima de un ligando depende de su energía interna mínima y de las interacciones que forma con el sitio de unión. Esto tiene especial importancia en el docking con fines predictivos, pues es conocido que un ligando puede tener una conformación diferente cuando se encuentra libre y otra cuando se encuentra unido a una proteína.

Para superar las limitaciones del docking rígido, se comenzó a considerar la flexibilidad del ligando mientras se limita la flexibilidad a una pequeña parte del receptor (por ejemplo, solo el sitio de unión) o considerándolo totalmente flexible (docking flexible) (7, 9). No obstante, la consideración de un receptor completamente flexible conlleva un costo computacional considerable. Por lo tanto, una aproximación que permite un balance adecuado entre tiempo de computación y precisión es aquella que considera solo al receptor como un cuerpo totalmente rígido (docking semiflexible) (9). La mayoría de softwares de docking emplean el enfoque semiflexible, algunos de los más reconocidos son AutoDock y FlexX. Los algoritmos basados en el enfoque de semiflexibilidad se pueden clasificar como sistemático o estocástico.

### **3.3.1.1 Métodos sistemáticos**

Estos métodos muestrean el espacio de búsqueda a intervalos predefinidos, estos se clasifican en métodos exhaustivos, de fragmentación y conjuntos conformacionales.

Los métodos exhaustivos se rotan todos los enlaces giratorios dentro del intervalo definido, esto lo convierte en un problema combinatorio, en consecuencia, se deben establecer restricciones o criterios de finalización para evitar que ocurra una explosión combinatoria. También, es posible restringir estos enfoques a moléculas pequeñas que no demanden un alto poder de cálculo. Glide es uno de los softwares que usa un método de búsqueda exhaustiva como algoritmo de muestreo (7, 9).

El método de fragmentación fue propuesto en 1986 (10), cuya implementación permite simular la flexibilidad del ligando de forma parcial, pues se debe fragmentar el ligando, acoplar cada fragmento como una entidad rígida en el sitio de unión y posteriormente unir covalentemente cada fragmento (9). Existe una variación conocida como construcción incremental, que acopla primero un fragmento y a partir de este se adjuntan sucesivamente los demás, generalmente el primer fragmento se acopla buscando la mejor interacción con el receptor, es decir, puentes de hidrógeno (7).

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

Otra forma de simular la flexibilidad del ligando, conocido con el nombre de conjuntos conformacionales, es generando un conjunto de conformaciones previo al proceso de acoplamiento en el sitio de unión, este proceso de acoplamiento sigue una dinámica de docking rígido, por lo que la dificultad radica en las técnicas para generar el conjunto de conformaciones; otra limitación es que el conjunto de conformaciones puede no incluir la conformación activa del ligando (7, 9).

### **3.3.1.2 Métodos estocásticos**

A diferencia de los métodos sistemáticos, los estocásticos no siguen una secuencia de búsqueda, en cambio muestrean el espacio conformacional con parámetros producto del azar, y posteriormente un parámetro del algoritmo decide si acepta o rechaza la conformación encontrada. Esto permite que sean mucho más veloces, pero no aseguran una búsqueda completa, lo que significa que pueden pasar por alto la conformación real. Una forma de solucionar esta desventaja es aumentando el número de iteraciones del algoritmo.

Algunos de los métodos estocásticos más famosos son aquellos que están basados en el algoritmo de Monte Carlo, que añaden un criterio de aceptación para cada pose generada. Cada vez que se lleva a cabo una iteración del algoritmo, este genera al azar un cambio en los grados de libertad del ligando y evalúa la energía de unión de la pose, si esta pose tiene una energía peor a la pose con la que compara, la pose generada se descarta, pero si es mejor se conserva hasta encontrar otra pose con mejor energía de unión. Softwares como AutoDock y AutoDock Vina poseen este tipo de métodos de búsqueda implementados (7, 9).

Los algoritmos evolutivos se basan en la idea de la evolución biológica, y toman conceptos como gen, mutación, cromosoma y cruce. Los grados de libertad del ligando se codifica en genes, por lo que cada conformación del ligando se considera un cromosoma que es puntuado, las mutaciones y los cruces ocurren en una población de cromosomas, por lo que aquellos con mayor puntuación son los que sobreviven. AutoDock también ofrece algoritmos genéticos para realizar la etapa de muestreo (8).

### **3.3.2 Función de puntuación**

El objetivo de la función de puntuación es distinguir de forma rápida entre poses adecuadas e inapropiadas, o moléculas inactivas y activas (4). Estas funciones son aproximaciones matemáticas y debido a esto, se deben tener en cuenta cuatro parámetros a la hora de evaluar la confiabilidad de dicha función: el poder de puntuación, se refiere a la capacidad de producir puntuaciones que se correlacionan con los datos experimentales de afinidad; el poder de clasificación, es la habilidad para categorizar de manera precisa un conjunto específico de ligandos que se unen a un receptor, de acuerdo a sus afinidades de unión, cuando se conocen las poses de unión; poder de acoplamiento, la capacidad de identificar la postura activa, cuando se han generado poses señuelo inactivas; poder de detección, es la habilidad de detectar las moléculas activas frente a un ligando de entre una biblioteca de moléculas aleatorias. Idealmente una función de puntuación debe ser buena en todos estos parámetros, pero en la realidad las funciones de puntuación son capaces de cumplir solo uno dos (7).

Las funciones de puntuación se pueden clasificar en dos grandes grupos, las funciones de puntuación clásicas y las funciones de puntuación basadas en machine learning. Dentro de las funciones clásicas se encuentran las funciones basadas en propiedades físicas, empíricas y basadas en el conocimiento. Todas las funciones clásicas se basan en la premisa de que la energía libre del complejo ligando-receptor se puede expresar como la suma de todas las contribuciones de energía libre (7).

Las funciones de puntuación basadas en propiedades físicas calculan la energía de enlace sumando los estiramientos del ligando, flexión de ángulos y torsión de ángulos del ligando más las interacciones de Van der Waals, fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno. La principal limitación de estas funciones es la dificultad de considerar al solvente en la unión del ligando. AutoDock es un software que usa este tipo de función de puntuación (7).

Las funciones empíricas, usan un enfoque más sencillo que las hace más veloces. Estas consideran los factores energéticos involucrados en la unión ligando-receptor, como los puentes de hidrógeno, los efectos hidrofóbicos, las interacciones estéricas, entre otros. Cada factor se multiplica por un coeficiente derivado de un análisis de regresión lineal aplicado a conjuntos de entrenamiento ligando-receptor con afinidades de unión conocidas. Estas funciones son tan limitadas como lo sean los datos de entrenamiento utilizados para generar el modelo. La función de puntuación de Glide es una función empírica (8).

Las funciones basadas en el conocimiento, se sustentan en la idea estadística de que las interacciones ligando-receptor más frecuentes se correlacionan con las más favorables. A partir de bases de datos de estructuras cristalinas, las frecuencias de contacto entre los pares de átomos ligando-receptor se calculan y se convierten en componentes energéticos. Cuando se evalúa una pose, se suman aquellas contribuciones energéticas que se presentan en el complejo ligando-receptor (8).

### **3.4 Modelamiento farmacofórico**

La IUPAC define a un farmacóforo como “un conjunto de características estéricas y electrónicas que son necesarias para garantizar las interacciones supramoleculares optimas con una estructura objetivo biológica específica y para desencadenar (o bloquear) su respuesta biológica” (11). En consecuencia, un farmacóforo no se debe entender como una molécula real o un conjunto de grupos funcionales, por el contrario, su interpretación está ligada a una representación abstracta que refleja la capacidad de interacción de una molécula con su diana biológica (12, 13). En otras palabras, el farmacóforo puede ser entendido como las características comunes más ampliamente compartidas entre un conjunto de moléculas bioactivas (12).

Los farmacóforos son formas sencillas y útiles que describen la ubicación espacial y la naturaleza de los grupos funcionales involucrados en la interacción ligando-receptor. Por lo general dichas

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

características son representadas con un conjunto predeterminado de figuras geométricas y vectores. Esta simplificación de la estructura molecular tiene especial utilidad en el desarrollo de nuevas moléculas activas y en la predicción de su actividad (13).

### **3.4.1 Cribado virtual**

La aplicación más interesante de los farmacóforos es su uso para encontrar nuevas moléculas bioactivas mediante la búsqueda en grandes bases de datos (12). Son usados como filtros de búsqueda de moléculas con un conjunto de propiedades estereoelectrónicas deseadas. A pesar de que existen métodos de búsqueda bidimensional basada en subestructuras moleculares, en muchos casos esta búsqueda arroja compuestos muy similares a los de partida. Sin embargo, la búsqueda con farmacóforos permite una diversidad química mayor, pues lo único que se desea es hacer coincidir espacialmente las características estereoelectrónicas descritas por el farmacóforo con las moléculas de la base de datos (13). Lo anterior asegura que las moléculas resultantes posean las características del farmacóforo y en consecuencia una alta probabilidad de poseer actividad.

### **3.5 Enfermedad de Alzheimer**

El término demencia se utilizó por primera vez en el año 600 d.C. por San Isidoro, obispo de Sevilla. La palabra deriva del latín y está conformada por el prefijo “de”, que significa pérdida o privación; la raíz “ment”, que significa mente; y el sufijo “ia” que indica un estado. Por lo tanto, la demencia es un estado donde hay pérdida de la lucidez mental (14).

Hoy en día, caracterizamos la demencia como una disminución adquirida en las capacidades cognitivas en diferentes esferas del funcionamiento mental, que es lo bastante severa como para afectar el desempeño social y laboral. Dada la amplia definición de demencia, no representa una única patología, sino más bien un conjunto de trastornos, siendo la EA su principal representante. Otras enfermedades del grupo de la demencia que son frecuentes, son la enfermedad de cuerpos de Lewy y la demencia frontotemporal (15).

La EA, nombrada así en honor al psiquiatra Alois Alzheimer, es una enfermedad neurodegenerativa que progresa lentamente, caracterizada por la aparición de acúmulos del A $\beta$  en el espacio extracelular (placas seniles) y fibras retorcidas de proteína tau dentro de la neurona (ovillos neurofibrilares). Estos cambios celulares ocurren únicamente en áreas específicas del cerebro: lóbulo temporal medial y estructuras neocorticales. El primer paciente identificado de la EA sufrió acumulación de placas amiloides, muerte masiva de neuronas, pérdida de memoria y cambios de personalidad antes de morir (16).

Existen dos tipos de evidencia clara sobre el desarrollo de la EA, que además se relacionan con la aparición de los síntomas. La primera de ellas es la aparición de lesiones positivas, que consiste en la acumulación de A $\beta$ , proteína tau, neuritas distróficas y otras lesiones neuronales encontradas en los cerebros de pacientes de la EA. En segundo lugar, se encuentran las lesiones negativas, que se caracteriza por una gran atrofia cerebral, asociada a la pérdida neuronal y sináptica (16).

### **3.5.1 Placas seniles**

Son depósitos extracelulares de A $\beta$  con diferentes morfologías, incluyendo placas difusas, compactas, centrales clásicas (17). La formación de placas seniles se lleva a cabo por la intervención de las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa. Estas enzimas generan fragmentos de 43 a 51 aminoácidos, a partir de la proteína precursora de amiloide transmembrana (APP), que se transforman en las formas finales A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42. El A $\beta$  se puede agregar con otros monómeros de A $\beta$  formando fibrillas grandes e insolubles, o incluso oligómeros solubles. La acumulación de placas de A $\beta$  en áreas como el hipocampo y la corteza cerebral desencadena respuestas en la glía y daños neuronales, lo que contribuye al deterioro cognitivo de la EA (16).

### **3.5.2 Enredos neurofibrilares**

Consisten en filamentos anormales e hiperfosforilados de proteína tau, que pueden enrollarse entre sí para formar filamentos helicoidales que se acumulan en el citoplasma, axones y dendritas, lo que provoca una pérdida de microtúbulos del citoesqueleto, conduciendo a una pérdida de función celular (16).

### **3.5.3 Pérdida sináptica**

El daño en la neocorteza y sistema límbico, conduce a la pérdida de memoria y es posible observarlo en las primeras fases de la EA. La pérdida sináptica se asocia a defectos en el transporte axonal, daño mitocondrial, estrés oxidativo y la acumulación de A $\beta$  y proteína tau en sitios sinápticos. Todos estos procesos conducen a una distrofia axonal y una pérdida de espinas dendríticas (16), causando el aislamiento neuronal y en última instancia la muerte celular.

### **3.5.4 Hipótesis colinérgica**

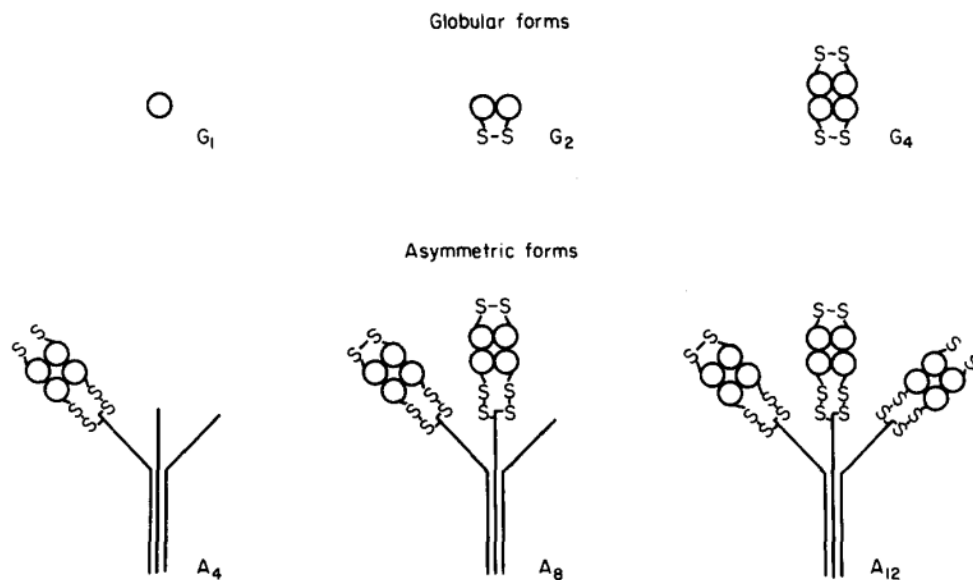
Se conoce que la ACh participa en procesos fisiológicos como la memoria, la atención, la información sensorial, el aprendizaje, entre otras. Se ha observado que en la EA se produce degeneración en las neuronas colinérgicas lo que provoca la disminución en las capacidades cognitivas y la memoria. La hipótesis colinérgica sostiene que los signos de la EA están vinculados a una disminución de la neurotransmisión colinérgica.

Esta hipótesis se basa en el hecho de que se ha relacionado la pérdida sináptica colinérgica con la formación de fibrillas A $\beta$ , además de la interacción de estos acúmulos con la acetilcolinesterasa. Otros factores que apoyan la hipótesis es la disminución de receptores nicotínicos y muscarínicos en las terminales colinérgicas presinápticas en etapas avanzadas de la enfermedad. Mientras que otras observaciones que apoyan la hipótesis, es la de los antagonistas colinérgicos, como la escopolamina, que inducen amnesia (16).

## **3.6 Acetilcolinesterasa**

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima colinérgica encargada de terminar la transmisión neuronal y la señalización entre sinapsis para prevenir la dispersión de ACh y la activación de receptores cercanos. La AChE es una enzima que puede existir como monómero, aunque a menudo se polimeriza formando un dímero unido por un enlace disulfuro y fuerzas de Van der Waals, dos dímeros pueden unirse para formar tetrámeros, por su parte los tetrámeros son capaces de unirse a estructuras denominadas “colas” que están compuestas por tres hebras que son químicamente

similares al colágeno. En resumen, la AChE se puede encontrar de dos grandes formas: globular (monómero, dímero, tetramero) o asimétrica (un tetramero, dos tetrameros o tres tetrameros) (18), como se observa en la figura 3.



**Figura 3.** Formas de la acetilcolinesterasa:

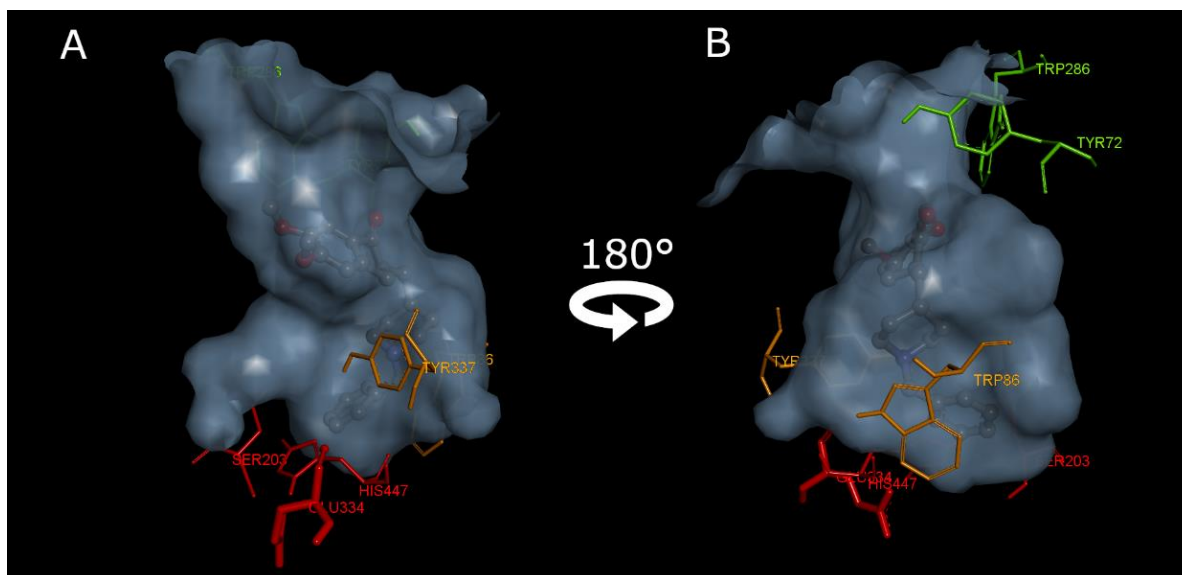
*La forma globular de la AChE se etiqueta con “G”, mientras que la forma asimétrica con una “A”. Además, se añade un número a la etiqueta que permite conocer la cantidad de monómeros que conforman cada estructura cuaternaria, así pues, para la forma globular tetramérica se da la etiqueta “G<sub>4</sub>”, mientras que para la asimétrica con dos tetrameros se da la etiqueta “A<sub>8</sub>”.*

*Tomado de (19).*

La AChE cuenta con un sitio activo en forma de “garganta angosta” cuya profundidad es de aproximadamente 20 Å, en el fondo de este se encuentra el bolsillo catalítico, que a su vez está conformado por el subsitio esteárico y el subsitio aniónico o aromático, como se muestra en la figura 4. El subsitio esteárico se encarga de la hidrólisis del éster y está conformado por tres aminoácidos: Ser 203, His 447 y Glu 334 (20); la reacción de hidrólisis se lleva a cabo gracias al ataque del hidroxilo de la serina al carbonilo de la ACh eliminando así la colina, la histidina permite la transferencia de un protón entre las moléculas de oxígeno de la serina como de la ACh, mientras que el glutamato ayuda a estabilizar a la histidina, en otras palabras la reacción se puede ver como un ciclo de acilación desacilación, donde una molécula de agua interviene para permitir la liberación de ácido acético y una serina con poder catalítico (18).

El subsitio aniónico está conformado por dos aminoácidos: Tyr 337 y Trp 86, su función es posicionar el sustrato para la catálisis por medio de interacciones catión- $\pi$ , se cree que estos dos aminoácidos son fundamentales para la selectividad de la enzima por lo cual son de vital importancia en el desarrollo de nuevos inhibidores (20, 21).

Fuera del bolsillo catalítico existen otro sitio que destaca por su importancia en la función enzimática, se trata del sitio aromático periférico (SAP), se encuentra ubicado en el borde de la garganta y se compone por Tyr 72 y Trp 286, ambos aminoácidos de carácter aromático juegan el papel de dirigir hacia dentro de la garganta los sustratos. Simulaciones de dinámica molecular han mostrado la importancia de las interacciones catión- $\pi$  que forma el SAP con el sustrato para estabilizarlo antes de entrar al fondo de la garganta (20, 21).



**Figura 4.** Representación del sitio activo de la enzima AChE.

La superficie del sitio activo describe forma de garganta angosta de aproximadamente 20 Å, se observa la superficie del sitio en azul. En la parte superior de la imagen se encuentra la boca de la garganta o la entrada al sitio activo, en la parte inferior se encuentra el subsitio esteárico. En rojo destacan los aminoácidos pertenecientes al subsitio esteárico, en naranja los aminoácidos del subsitio aniónico y en verde los aminoácidos del SAP.

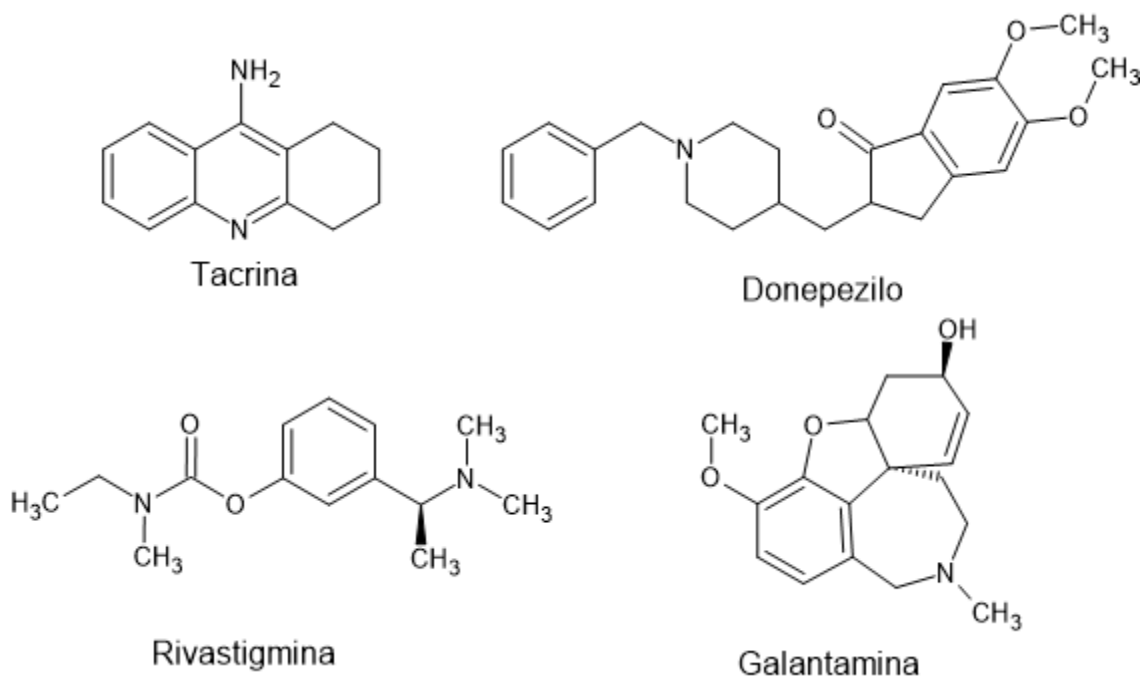
## 4 ESTADO DEL ARTE

### 4.1 Inhibidores de acetilcolinesterasa

Desde los años 70's se observó que la EA se caracteriza por la pérdida de neuronas colinérgicas. De aquí nace la hipótesis colinérgica de la enfermedad, es un razonamiento simple: si en la EA hay pérdida de la neurotransmisión colinérgica, el aumento de esta podría disminuir las manifestaciones sintomáticas de la enfermedad.

La ACh se degrada por dos enzimas la AChE y la butirilcolinesterasa (BuChE). La BuChE es una esterasa que se encarga de la hidrolisis de ésteres exógenos de ácido carboxílico y ácido fosfórico, se encuentra principalmente en hígado y pulmón, a diferencia de la AChE cuya distribución principal es en musculo esquelético y cerebro (22), por un tiempo se denominó a la BuChE como "pseudocolinesterasa" por su distribución y función ambigua en el organismo. BuChE tiene una concentración plasmática mucho mayor que AChE, se encuentra en una gran variedad de vertebrados y tolera muchas más mutaciones, lo que llevo a pensar que evoluciono a partir de AChE para trabajar como un desintoxicante general (21). Los inhibidores de acetilcolinesterasas se clasifican en inespecíficos cuando inhiben AChE, BuChE y otras colinesterasas, y son específicos cuando solo inhiben AChE.

En la historia solo han existido solo cuatro fármacos comercializados para el tratamiento sintomático de la EA, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de AChE, estos son la tacrina, el donepezilo, la galantamina y la rivastigmina (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura de los fármacos inhibidores de AChE usados en terapéutica.

#### **4.1.1 Tacrina**

La tacrina se desarrolló como un antibacteriano, pero su capacidad bactericida resultó ser débil, en cambio mostró ser un estimulante respiratorio en animales sedados con morfina. Resultó ser un potente inhibidor de AChE con una  $CI_{50} = 125$  nM, es 100 veces más afín por BuChE que por AChE, además también es capaz de aumentar la concentración de ACh en el espacio sináptico por inhibición de los receptores presinápticos  $M_1$ , y la inhibición de ambas isoformas de MAO. La tacrina fue el primer inhibidor de AChE lanzado al mercado para el tratamiento de la EA, durante los dos siguientes años después del comienzo de la comercialización se evaluaron los efectos clínicos de esta en más de 190 mil pacientes, encontrando que el desempeño cognitivo no fue estadísticamente diferente frente al placebo. Además, se observó que la tacrina tenía fuertes efectos colinérgicos secundarios, el 29% de los pacientes presentaron aumento de 3 veces el valor normal de la alanina aminotransferasa, 28% náuseas y vómito, 14% diarrea, 9% dispepsia o anorexia, 7,5% mialgias. La administración de la tacrina era de cuatro veces al día, lo que aumentaba los efectos secundarios, sumado a esto está su hepatotoxicidad que hizo que en 2013 fuera retirada del mercado (23).

#### **4.1.2 Donepezilo**

En 1996 se aprobó el donepezilo para el tratamiento de los síntomas de la EA, es un inhibidor de AChE altamente específico con una  $CI_{50} = 5,7$  nM, siendo 1250 veces más afín por AChE que por BuChE. El donepezilo cuenta con varias propiedades farmacológicas entre las que destacan la modulación de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, mejora de la plasticidad neuronal, reduce las citoquinas proinflamatorias y mejora del flujo sanguíneo cerebral. Además, disminuye el nivel de proteína precursora amiloide (APP) y la lesión excitotóxica, modula los efectos colinérgicos y el estrés oxidativo, influye en la expresión de la isoforma AChE e interactúa con la regulación de los receptores nicotínicos en la corteza cerebral. Cuenta con una biodisponibilidad del 100% y un pico de concentración sérica de entre 3 a 4 horas, es metabolizado por las CYP2D6 y CYP3A4 con una vida media de 60 a 90 horas, lo que permite una administración de una vez al día. Según estudios clínicos dosis de 5 y 10 mg/día son capaces de mejorar la cognición a corto y largo plazo, los principales efectos adversos informados son leves, de tipo colinérgico, y se observan beneficios significativos en el tratamiento de los síntomas cognitivos en etapas leves y moderadas. Hoy en día se considera tratamiento de primera línea a pesar de que el aumento de dosis aumenta la frecuencia de efectos adversos y esto hace que los pacientes abandonen el tratamiento (23).

#### **4.1.3 Rivastigmina**

En el 2000 es aprobada la rivastigmina, se trata de un inhibidor no competitivo pseudoirreversible inespecífico con una  $CI_{50} = 1030$  nM. Está disponible en capsulas y en parches transdérmicos, la absorción de la capsula es rápida y completa, en una hora, y el parche de entre 30 a 60min. La concentración máxima en sangre se alcanza en 1,5 horas para la capsula y 3 horas para el parche. La rivastigmina tiene buena penetración de la barrera hematoencefálica (BHE) y se metaboliza ampliamente por hidrólisis mediada por colinesterasas, es excretada por los riñones, el metabolismo de esta no es mediada por el sistema CYP lo que disminuye las posibles interacciones

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

fármaco-fármaco. La rivastigmina proporciona beneficios de función cognitiva mejorando así la calidad de vida en demencia leve a moderada con pocos efectos adversos (23).

#### **4.1.4 Galantamina**

También en el 2000 fue aprobada la galantamina en los Estados Unidos. Es un alcaloide inhibidor reversible competitivo selectivo de AChE, además es capaz de interactuar alostéricamente con receptores nicotínicos, potenciando la acción agonista de la ACh, promueve la supervivencia de células neuronales precursoras y se ha observado que en ratones transgénicos atenúa la deposición de placas A $\beta$  y la neuro inflamación. La concentración máxima en plasma se alcanza en una hora con una vida media de aproximadamente 7 horas y buena penetración de la BHE, es metabolizado por CYP2D6. Según estudios se ha demostrado que el tratamiento crónico reduce los síntomas conductuales de la enfermedad y evita que un paciente tenga que ir a una residencia, sin embargo, los efectos secundarios gastrointestinales a menudo causan la interrupción del tratamiento (23).

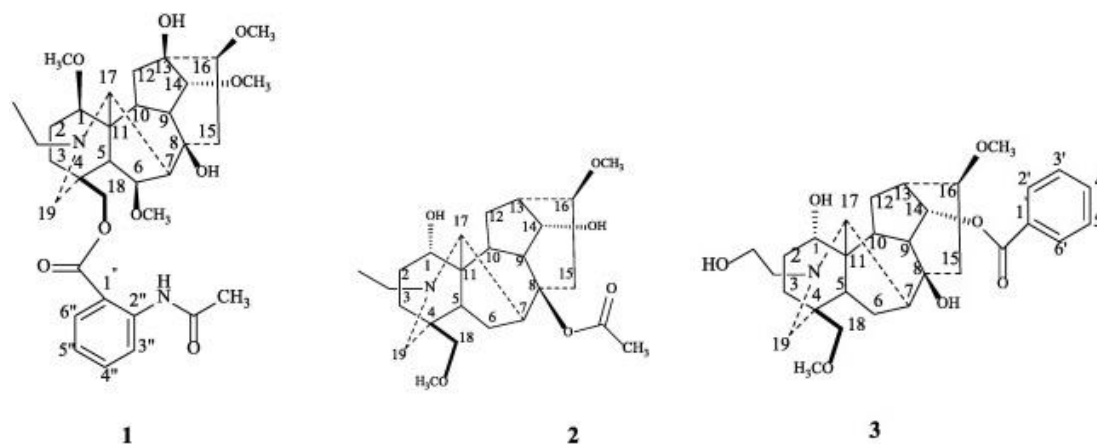
## **4.2 Nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa**

La mayoría de los esfuerzos dirigidos a identificar nuevos inhibidores de AChE han recurrido a técnicas de DFAC, como el cribado virtual aplicado a enormes bancos de moléculas de diferentes orígenes. Mientras que otra pequeña proporción continúan la búsqueda en plantas y organismos acuáticos.

### **4.2.1 Búsqueda de inhibidores de acetilcolinesterasa de origen natural**

La búsqueda de compuestos naturales activos ha experimentado un renacimiento en la investigación científica. No obstante, esta exploración ha evolucionado notablemente, ya que en la actualidad no se limita únicamente al enfoque fitoquímico tradicional. En cambio, ha adoptado técnicas computacionales vanguardistas que buscan identificar compuestos activos en bases de datos moleculares de origen natural.

A pesar de esta evolución en los métodos de búsqueda, aun se siguen utilizando los métodos fitoquímicos tradicionales, como lo demostró Nadia Gul y su equipo. Ellos lograron aislar tres nuevos norditerpenoides (Figura 6) de la *Delphinium uncinatum*, una planta perenne ampliamente distribuida en Pakistán, elucidaron las estructuras y llevaron a cabo estudios *in vitro* de inhibición de AChE. Se encontró que los nuevos norditerpenoides son inhibidores dependientes de la concentración e inhibidores específicos de AChE. Siendo la Uncinatina C el compuesto más activo con una  $IC_{50} = 94,33 \pm 1,5 \mu M$  en comparación con la galantamina, cuyo  $IC_{50} = 0,5 \pm 1,5 \mu M$ . Finalmente se realizaron estudios de docking molecular observando una interacción importante con los aminoácidos Tyr 341, Glu 292, Leu 76, Trp 286, Ser y Phe 338 de la AChE (24).

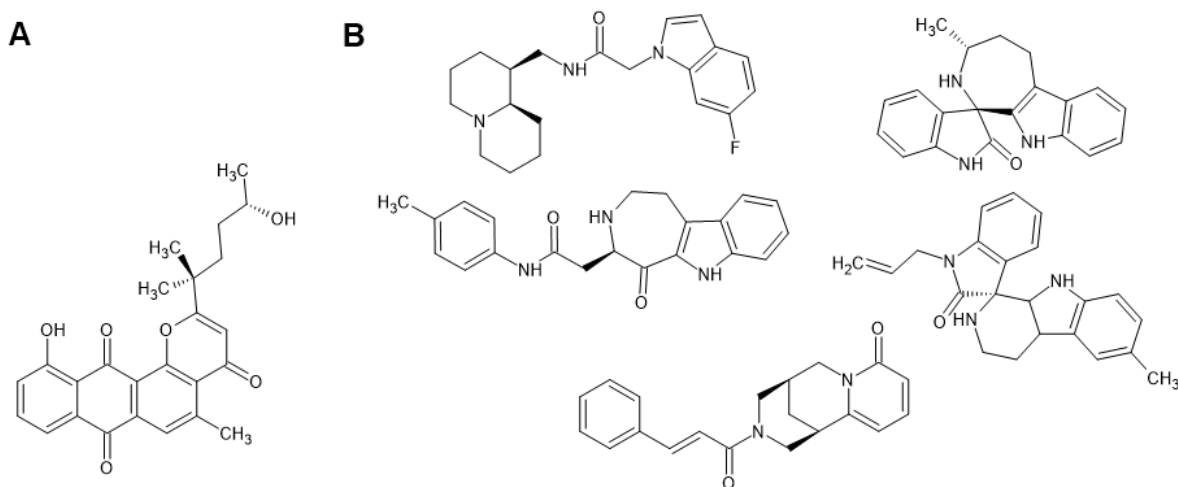


**Figura 6.** Estructuras de los tres norditerpenoides aislados de *Delphinium uncinatum* con actividad inhibitoria sobre AChE.  
Tomado de (24).

Otros estudios han utilizado herramientas computacionales para encontrar moléculas activas en bases de datos moleculares de origen natural, este es el caso de Gade y su equipo quienes llevaron a cabo un estudio cuyo propósito fue la identificación de posibles AChEi a partir de la base de datos exhaustiva de productos naturales marinos (CMNPD) empleando enfoques computacionales. Para este fin, se estableció un modelo de farmacóforo basado en la estructura, utilizando la conformación de la AChE cocrystalizada con galantamina (PDB ID: 4EY6), y se utilizó este modelo para el análisis de la CMNPD. Las moléculas que superaron el filtro farmacóforo fueron posteriormente sometidas a una evaluación de similitud con el fármaco. Además, se realizaron estudios de acoplamiento molecular en las moléculas seleccionadas para medir su afinidad de unión. De estas, las diez con mejores puntuaciones de acoplamiento fueron identificadas para un análisis más profundo. Para asegurar la seguridad de estas moléculas, se realizó un perfil de toxicidad. De las diez moléculas evaluadas, la molécula 64 (CMNPD8714) emergió como la opción más segura. Para un análisis más detallado, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular. En estas simulaciones, la molécula 64 (Figura 7) exhibió interacciones estables, incluyendo enlaces de hidrógeno y apilamiento con Tyr 341, facilitados por puentes de agua (25).

En otro estudio realizado por Atanasova y su equipo se llevó a cabo un análisis virtual abarcando alrededor de 150.000 compuestos naturales contenidos en la base de datos ZINC12, con el objetivo de identificar aquellos con potencial actividad inhibitoria de la AChE. Mediante acoplamiento molecular y un proceso de filtrado basado en propiedades ADME, se logró seleccionar un total de 32 ligandos pertenecientes a 23 grupos estructurales distintos. Para determinar la idoneidad de estos compuestos, se recurrió a la simulación de dinámica molecular, la cual permitió evaluar la estabilidad de los complejos formados entre los ligandos y la AChE. Como resultado, se identificaron 10 compuestos que demostraron la capacidad de formar complejos estables con la AChE. Estos 10 compuestos fueron sometidos a ensayos para evaluar tanto su actividad inhibitoria como su potencial antioxidante frente a la AChE. Entre ellos, cinco compuestos mostraron una

inhibición moderada de la AChE (Figura 7), mientras que tres de ellos exhibieron una marcada actividad antioxidante (26).



**Figura 7. A:** Estructura de la molécula 64 (CMNPD8714) encontrada por Gade y su equipo **B:** Estructuras de las moléculas con actividad inhibitoria moderada frente a AChE, encontradas por Atanasova y su equipo.

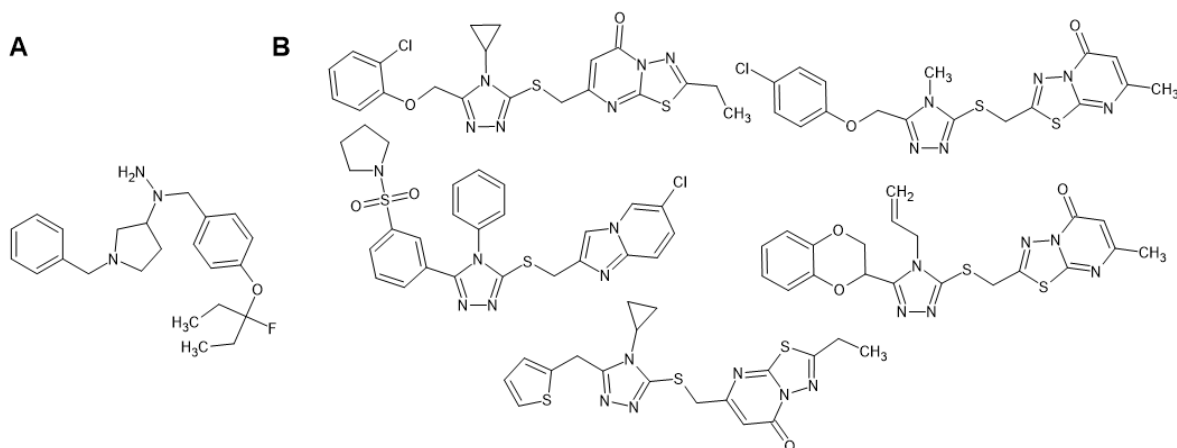
#### 4.2.2 Búsqueda de inhibidores de acetilcolinesterasa con herramientas DFAC

Las herramientas computacionales han demostrado ser de gran utilidad para explorar el espacio químico de posibles candidatos activos, evaluar sus propiedades fisicoquímicas y predecir su afinidad e interacción con la AChE. En este apartado, se presenta una revisión de algunos de los estudios más recientes que han empleado métodos computacionales para diseñar y optimizar inhibidores de AChE, destacando sus principales hallazgos.

En el estudio realizado por El Khatabi y su equipo se adoptó un enfoque tridimensional de relación estructura-actividad cuantitativa (3D-QSAR) mediante una serie de derivados de la N-bencilpirrolidina, con el propósito de desarrollar inhibidores altamente activos de la AChE. Los modelos CoMFA y CoMSIA generados en este contexto fueron validados desde el punto de vista estadístico y demostraron una sólida capacidad de predecir la inhibición de la acetilcolinesterasa. A partir de los mapas de contorno 3D-QSAR, se obtuvo información valiosa que profundiza la comprensión de las características estructurales esenciales para la inhibición de la acetilcolinesterasa. Esto, a su vez, facilita el diseño de nuevos AChEi. Como resultado de esta metodología, se diseñaron seis nuevos inhibidores de la acetilcolinesterasa. Entre ellos, el compuesto A1 destacó por ser el de mayor actividad prevista (Figura 8), según los cálculos realizados. Para validar la viabilidad de los resultados, se llevaron a cabo simulaciones de docking molecular y dinámica molecular, las cuales contribuyeron a confirmar la estabilidad de los compuestos seleccionados y respaldar su potencial utilidad como AChEi (27).

Targowska-Duda y su equipo realizaron un estudio en el que se empleó un enfoque de análisis virtual fundamentado en la estructura, utilizando la base de datos Enamine, con el fin de descubrir nuevos AChEi. Para el proceso de selección, se aplicaron cálculos basados en WaterMap, un método fundamentado en simulación de dinámica molecular que permite evaluar las propiedades de solvatación de los compuestos. Se evaluó la actividad inhibidora de 29 compuestos, cuidadosamente seleccionados, contra la AChE de anguila eléctrica, esta fue cuantificada mediante el método de Ellman. Tres de los compuestos demostraron actividad inhibitoria, mostrando un nivel de éxito del 10% en términos de selección y potencial inhibición. Usando el compuesto más potente como base, se llevó a cabo una búsqueda basada en similitud entre enaminas, lo que condujo al descubrimiento de 20 derivados adicionales. Finalmente, este enfoque permitió la identificación de cinco compuestos prometedores como inhibidores de la AChE (Figura 8). Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para estos compuestos variaron en el rango de 6,3 mM a 17,5 mM (28).

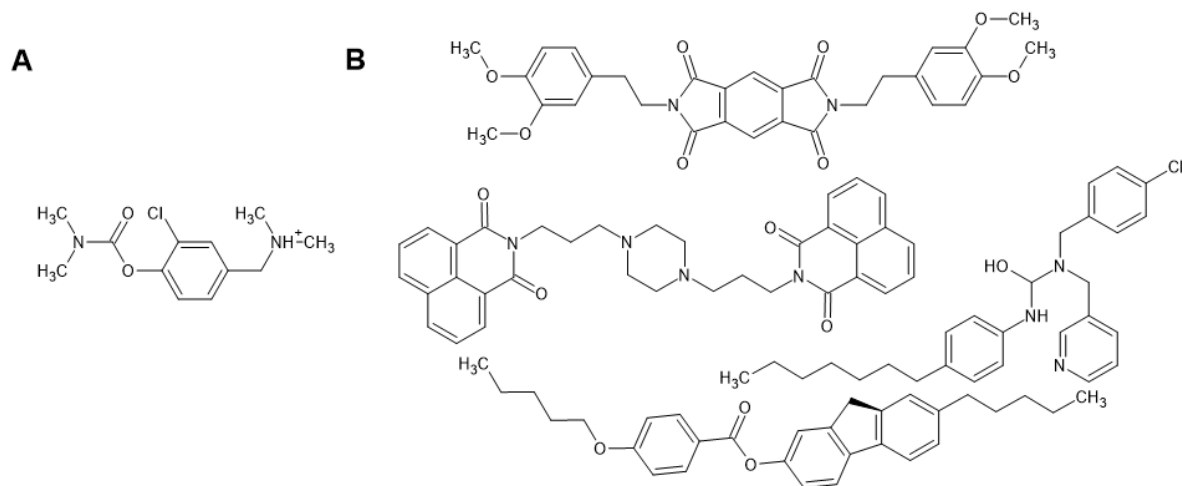
El trabajo de David y su equipo se enfocó en la búsqueda de nuevos AChEi, con relevancia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, empleando un enfoque combinado de detección virtual y análisis *in vitro*. Mediante un análisis virtual exhaustivo de las bases de datos ZINC15 y MolPort, se llevó a cabo la búsqueda de análogos sintéticos tanto de la fisostigmina como del donepezilo, que son reconocidos como potentes AChEi. Con una caracterización *in vitro* enfocada en la concentración inhibitoria, se evaluaron 11 compuestos en total. Entre ellos, el compuesto más potente (S-I 26) demostrando una concentración inhibitoria cinco veces mayor que la de la rivastigmina (Figura 9). En el proceso, se identificaron inhibidores con moderada actividad, portadores de nuevas estructuras químicas. Estos compuestos representan un punto de partida que podría ser optimizado aún más, con el objetivo de impulsar el desarrollo de nuevas clases de inhibidores de la AChE con potencial terapéutico (29).



**Figura 8. A:** Estructura de la molécula A1 encontrada por El Khatabi y su equipo **B:** Estructuras de los compuestos promisorios como AChEi, encontrados por Targowska-Duda y su equipo.

El estudio de Khan y su equipo se apoyó en modelos predictivos de machine learning y enfoques *in silico* para la búsqueda de AChEi. Los compuestos identificados a través de este análisis

demonstraron tener potencial como AChEi, lo cual sugiere su posible aplicación en el diseño futuro de agentes inhibidores altamente eficaces. La estrategia adoptada implicó la utilización de tres métodos de aprendizaje automático, junto con un proceso de cribado virtual. Los compuestos que sobresalieron en esta selección inicial fueron sometidos a un análisis más riguroso mediante simulaciones de dinámica molecular, que permitieron evaluar su interacción con la proteína AChE y su estabilidad en contexto molecular (Figura 9). La convergencia exitosa del aprendizaje automático con los métodos *in silico*, basados en algoritmos genéticos, introduce una estrategia altamente promisorio para la identificación de nuevos AChEi (30).



**Figura 9. A:** Estructura de la molécula S-I 26 con mayor potencia encontrada por David y su equipo **B:** Estructuras de los compuestos promisorios como AChEi, encontrados por Khan y su equipo.

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Software y recursos utilizados

A continuación, se enlista el software y recursos en línea utilizados para la realización del presente proyecto:

**Tabla 1.** Listado de software utilizado.

SOFTWARE	VERSIÓN	APLICACIÓN
UCSF Chimera (31)	1.16	Visualización y manejo de archivos pdb y mol2
Discovery Studio 2021 (32)	21.1.0.20298	Visualización, manejo y análisis de archivos pdb y mol2
Open Babel (33)	2.3.1	Manejo y conversión de archivos moleculares
Avogadro (34)	1.2.0	Optimización de moléculas
AutoDock Tools (35, 36)	1.5.7	Interfaz gráfica de AutoDock 4 y AutoDock Vina
AutoDock 4 (35)	4.2.6	Docking molecular
AutoDock Vina (37, 38)	1.1.2	Docking molecular
DOCK (39, 40)	6.9	Docking molecular
Raccoon (41)	1.0f	Cribado virtual con AutoDock
ZINCPharmer (42)	-	Modelo farmacofórico y cribado
Flare (43–46)	7.2.0	Docking molecular
SwissADME (47)	-	Análisis ADME
SeeSAR (48)	13.0.4 Midas	Optimización 3D-QSAR bioisostérica
pkCSM (49)	-	Análisis de toxicidad
PoseView (50, 51)	1.1.2	Diagramas de interacciones 2D
ACD/ChemSketch (52)	2021.2.0	Editor molecular

**Tabla 2.** Listado de estructuras cristalinas utilizadas.

PDB ID	NOMBRE	APLICACIÓN
7XN1 (20)	Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with tacrine	Docking molecular
7E3H (20)	Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with donepezil	Modelo farmacofórico
4EY6 (53)	Crystal Structure of Recombinant Human Acetylcholinesterase in Complex with (-)-galantamine	Modelo farmacofórico

## **5.2 Refinamiento de estructuras cristalinas utilizadas**

Las estructuras cristalinas utilizadas en este proyecto se sometieron a un pretratamiento con el fin de homogenizar sus estructuras previo a cualquier procedimiento o análisis subsecuente. Este pretratamiento fue llevado a cabo con el software Chimera, e incluyó la remoción de moléculas co-cristalizadas, como solventes y otras especies sin valor biológico. Dado que todas las estructuras cristalinas corresponden a homodímeros, se procedió a la exclusión de la subunidad B, de esta manera se guardaron archivos pdb que contenían la subunidad A junto con el ligando co-cristalizado para cada una de las estructuras cristalinas.

## **5.3 Extracción de características para el modelo farmacofórico**

La estructura 7E3H fue empleada como la principal fuente de información para la extracción de características. Para ello se llevó a cabo un procedimiento de re-docking utilizando AutoDock, AutoDock Vina, DOCK6 y Flare. Los resultados fueron analizados utilizando Discovery Studio, observando las interacciones que se conservaban. El mismo análisis se llevó a cabo con el complejo ligando-receptor original.

Adicionalmente, se analizó el complejo ligando-receptor de la estructura 4EY6 con Discovery Studio, extrayendo las interacciones de mayor relevancia con el propósito de contribuir a la construcción del modelo farmacofórico.

## **5.4 Construcción del modelo farmacofórico y búsqueda**

Debido a que se extrajeron características de dos ligandos diferentes, se tomó la decisión de superponer las estructuras cristalinas de ambos complejos, en este caso, 7E3H y 4EY6. Esto se llevó a cabo con el fin de obtener coordenadas consistentes para la posterior construcción del modelo farmacofórico. La herramienta “align sequences/structures” de Chimera fue empleada para efectuar la superposición de las estructuras, tras lo cual se eliminaron las cadenas proteicas y se procedió a guardar cada ligando en un archivo mol2.

A continuación, se cargó la estructura del donepezilo, extraído de 7E3H, en ZINCPharmer. Se seleccionaron las características previamente identificadas durante el análisis de las interacciones. Luego, se siguió el mismo proceso con la galantamina, obtenida de 4EY6. Con el modelo farmacofórico debidamente construido, se procedió a realizar la búsqueda de compuestos en la base de datos vinculada a ZINCPharmer, es decir ZINC12. Los resultados obtenidos se descargaron en un archivo sdf.

## **5.5 Cribado virtual con herramientas de docking**

Los resultados de la búsqueda utilizando el modelo farmacofórico en ZINCPharmer fueron sometidos a un proceso de cribado virtual a través de herramientas de docking molecular. Para ello, se emplearon cuatro softwares, a continuación, se detalla el procedimiento realizado en cada uno de ellos.

### 5.5.1 AutoDock

Se realizó un primer proceso de docking en AutoDock Tools utilizando el donepezilo (DNP) como ligando, que previamente había sido optimizado con Avogadro. El archivo pdb del receptor (7XN1), el cual había sido preprocesado en Chimera, se sometió a la adición de hidrógenos polares y se guardó nuevamente como un archivo pdbqt. Luego, se procedió a importar el archivo del ligando y se aplicaron las cargas Gasteiger, guardándolo como pdbqt. La configuración del *grid* se basó en las dimensiones del ligando co-cristalizado, con el objetivo de abarcar todo el sitio activo. Los parámetros específicos del *grid* se detallan en la tabla 3. Además, se configuró el archivo de salida como lamarckian GA.

Con respecto al proceso de docking de las moléculas obtenidas en ZINCPharmer, se inició la conversión del archivo sdf en un archivo pdbqt multiligando, empleando Open Babel. Luego, se aplicó Vina Split para la división del archivo multiligando en archivos individuales. El procedimiento de docking iterativo para cada uno de los compuestos fue configurado con la herramienta Raccoon. Se ajustaron las configuraciones de Raccoon para la utilización de mapas precalculados, y se hizo uso del archivo de configuración correspondiente al DNP para establecer los parámetros de cada proceso de docking.

**Tabla 3.** Parámetros de configuración del *grid* para 7XN1.

	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>Z</b>
<b>CENTRO</b>	48.099	-38.322	30.508
<b>TAMAÑO</b>	52 Å	40 Å	48 Å

### 5.5.2 AutoDock Vina

Los archivos pdbqt individuales, junto con los parámetros del *grid* previamente generados para AutoDock, se emplearon en el proceso de cribado ejecutado mediante Vina. Se implementó un *script* que facilitó la ejecución iterativa del docking con todos los ligandos, empleando un archivo de configuración que contenía todos los parámetros necesarios para la configuración de Vina.

### 5.5.3 DOCK6

Se llevó a cabo un procedimiento de redocking utilizando el ligando co-cristalizado en 7XN1, la tacrina (THA). Tras obtener los archivos de configuración para el docking, se procedió a transformar el archivo sdf en un archivo mol2 multiligando a través del uso de OpenBabel. Posteriormente, se editó el archivo dock.in para permitir el docking multiligando con los resultados previamente obtenidos de la búsqueda en ZINCPharmer.

Además, se creó un archivo multiligando adicional que incluía tanto al DNP como al GNT, utilizando OpenBabel. Nuevamente, se editó el archivo dock.in para llevar a cabo el docking con estos ligandos.

#### 5.5.4 Flare

Los ligandos se introdujeron en el software a partir del archivo sdf generado por la búsqueda en ZINCPharmer, y se incluyó el archivo multiligando que contenía tanto GNT como DNP para DOCK6. El *grid* se configuró para abarcar una distancia de 6 Å con respecto al ligando co-cristalizado, se utilizó un método de cálculo normal.

### 5.6 Promedio de puntuación de auto escalado

Después de completar los estudios de docking con los cuatro programas mencionados, se optó por emplear un enfoque de consenso de puntuación. En este caso, se aplicó el método de auto escalado, que consiste en ajustar cada puntuación a un valor dentro del rango de 0 a 1 mediante la fórmula siguiente (54):

$$X_{Escalada} = \frac{(x - x_{min})}{(x_{max} - x_{min})}$$

Donde  $X_{Escalada}$  representa el valor de auto escalado para cada ligando,  $x$  es la puntuación de cada ligando,  $x_{min}$  corresponde al valor de puntuación más alto entre los ligandos evaluados, y  $x_{max}$  corresponde al valor de puntuación más bajo entre los ligandos probados, es decir el mejor valor de energía de afinidad (54). Se debe tener en cuenta que  $X_{Escalada}$  debe ser calculada para todos los softwares utilizados. En el presente trabajo se calculó  $X_{Vina}$ ,  $X_{DOCK6}$ ,  $X_{AutoDock}$  y  $X_{Flare}$  para cada uno de los ligandos.

Una vez obtenidos todos los valores de auto escalado, se realiza un promedio, obteniendo el valor de promedio de puntuación de auto escalado (PPAE):

$$PPAE = \frac{X_{Vina} + X_{DOCK6} + X_{AutoDock} + X_{Flare}}{4}$$

### 5.7 Propiedades farmacocinéticas

Luego de clasificar los ligandos según su PPAE, se seleccionaron los diez con los valores más altos y se procedió a realizar un análisis de parámetros fisicoquímicos que permiten predecir las propiedades ADME. Se obtuvo el código SMILES de estos ligandos a partir de la página web de ZINC12, y empleando SwissADME, se calcularon parámetros significativos, tales como la regla de 5 de Lipinski (55) y el diagrama del huevo hervido (56).

### 5.8 Optimización 3D-QSAR bioisostérica

Los compuestos elegidos a través del filtrado ADME se sometieron a un proceso de optimización mediante el software SeeSAR. Para cada compuesto seleccionado, se optimizó cada pose propuesta por los cuatro programas de docking, con el objetivo de mejorar su afinidad con el receptor. Esto resultó en un conjunto de compuestos optimizados que se sometieron a la evaluación de ciertas propiedades relacionadas con la toxicidad, al igual que se vigilaron las propiedades ADME con el fin de que se conservaran los parámetros de Lipinski y la penetración de la barrera hematoencefálica. Entre estas evaluaciones se estudió la capacidad de inhibir hERG y la LD<sub>50</sub> en

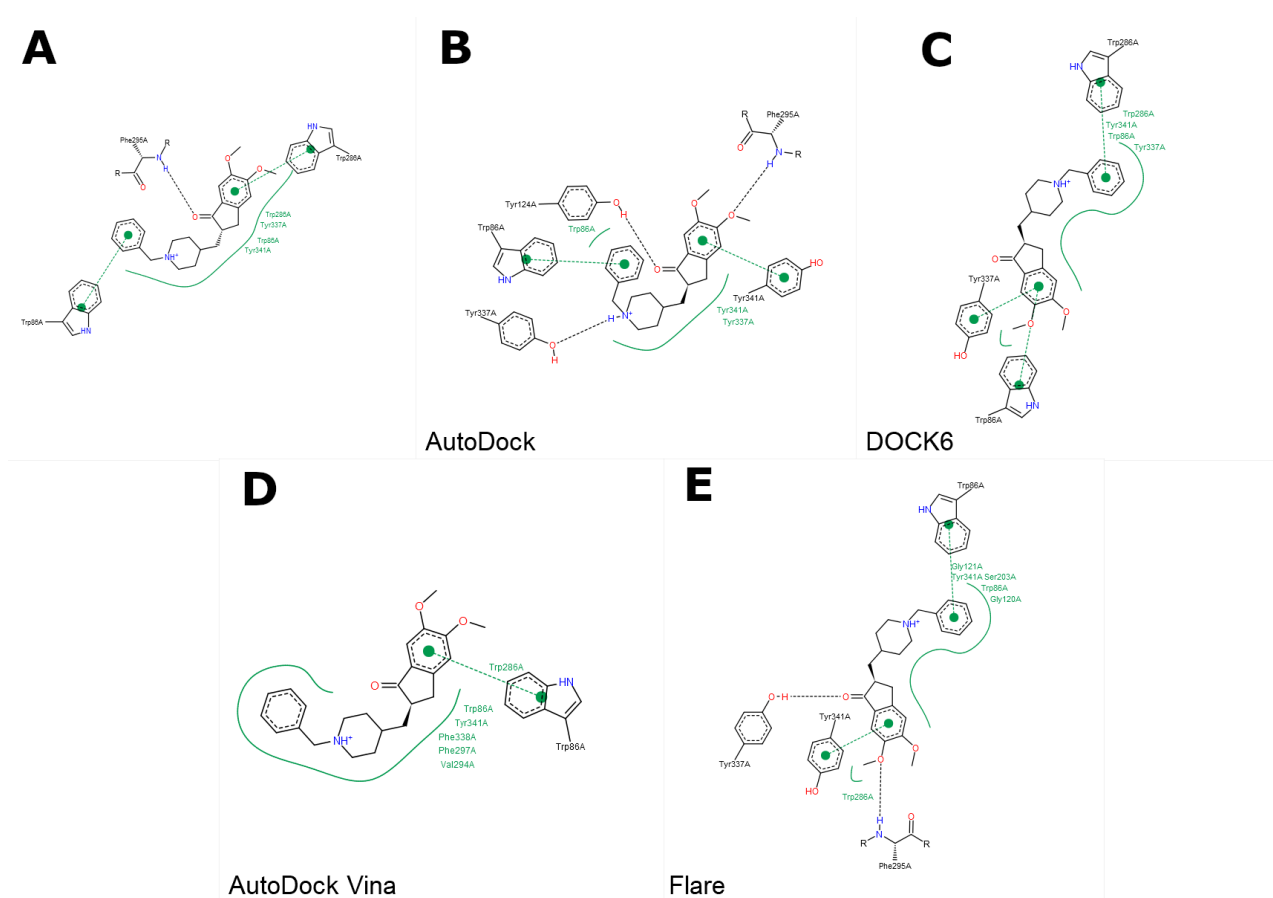
D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

ratones, utilizando modelos predictivos. Se compararon los valores obtenidos para estos parámetros con los del compuesto original y con el DNP. En caso de que los compuestos optimizados mostraran valores más altos en estos parámetros en comparación con el DNP o el compuesto original, se procedió a una nueva ronda de optimización para disminuir estos parámetros.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Modelo farmacofórico y búsqueda

Previo a la construcción del modelo farmacofórico se llevó a cabo un análisis de interacciones de la estructura 7E3H, cuyo ligando co-cristalizado es el DNP. El DNP, como ya se mencionó, tiene una mayor afinidad por AChE, lo que lo convierte en una estructura interesante para extraer características que servirán para la construcción del modelo farmacofórico. En la figura 10, se puede apreciar el diagrama de interacciones del complejo 7E3H original, en ella destacan tres interacciones principales: apilamientos  $\pi$  entre la porción indanónica y el fenilo del DNP con los aminoácidos Trp 286 y Trp 86, respectivamente, así como el puente de hidrogeno formado entre el carbonilo de la indanona y el Phe 295.



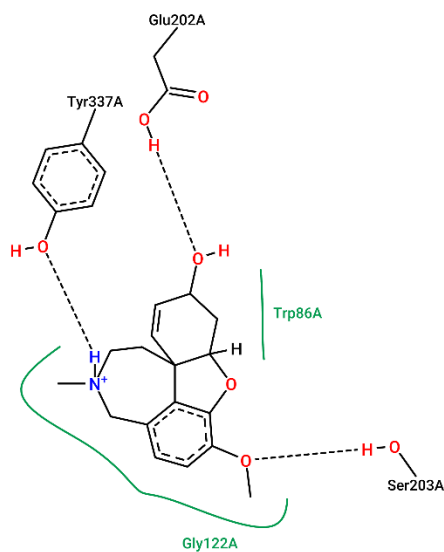
**Figura 10.** Diagramas de interacción 2D del re-docking del DNP.

**A:** ligando original co-cristalizado en 7E3H. **B:** Pose obtenida por Autodock. **C:** Pose obtenida por DOCK6. **D:** Pose obtenida por AutoDock Vina. **E:** Pose obtenida por Flare.

Se llevó a cabo un análisis de las interacciones presentes en las poses generadas después de realizar el re-docking en cada uno de los programas empleados. Se notó que las interacciones de apilamiento  $\pi$  se conservaron en todas las poses analizadas. En particular, al examinar la pose generada por Vina, se observó que el apilamiento  $\pi$  fue la única interacción destacada, esta se

localizó entre la porción indanónica del DNP y Trp 86. La porción indanónica tuvo una interacción variada con distintos aminoácidos aromáticos, entre los que se encontraron Tyr 341, Trp 86 (subsitio aniónico) y Tyr 337 (subsitio aniónico). El fenilo interactúa en la mayoría de las poses con el Trp 86, un aminoácido crucial en el posicionamiento del sustrato, lo que subraya la relevancia de esta interacción en la inhibición de la AChE. En el caso de DOCK6, esta interacción no se establece con Trp 86, sino que ocurre con Trp 286, otro aminoácido de gran importancia en la selectividad de la AChE.

Por otra parte, destacaron dos porciones estructurales del DNP que participaron en la formación de puentes de hidrogeno. El carbonilo de la porción indanónica mostró interacciones en dos de las cuatro poses predichas, solo se observó la formación de puentes de hidrogeno en AutoDock y Flare, los aminoácidos responsables de dicha interacción fueron Tyr 124 y Tyr 337, respectivamente. Además, el metoxilo, un sustituyente presente en el anillo de indanona, también contribuyó en la formación de puentes de hidrogeno en AutoDock y Flare, involucrando al aminoácido Phe 295 en ambos casos.



**Figura 11.** Diagrama de interacciones 2D de la AChE en complejo con GNT (4EY6).

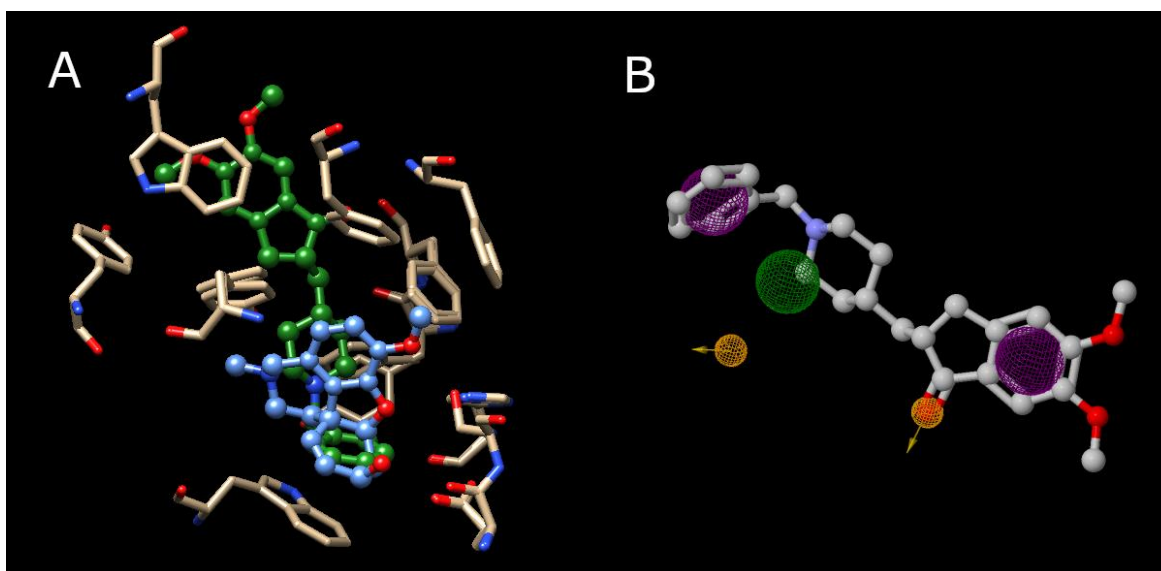
El análisis de interacciones permitió identificar las porciones estructurales del DNP que contribuyen a su afinidad por el receptor. Como se describió anteriormente, se observó que las interacciones de apilamiento  $\pi$  se repiten en todas las poses generadas y en la pose original, por lo que se consideraron los anillos aromáticos en los extremos de la molécula para ser incorporados en el modelo farmacofórico. Además, el aceptor de puentes de hidrógeno en la porción indanónica mostró interacciones favorables en la mayoría de las poses predichas, lo que condujo a su inclusión en el modelo. Sin embargo, el metoxilo que sustituye al fenilo interactuó solo en dos de las poses predichas, pero no en la pose co-cristalizada, por lo que no se consideró una característica

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

significativa para su inclusión en el modelo. Por último, en todas las poses se observó una amplia región hidrofóbica que conecta ambos anillos aromáticos, la cual también se consideró en la construcción del modelo.

Además de las características extraídas del DNP, se realizó un análisis de interacciones del complejo ligando-receptor 4EY6, cuyo ligando es la galantamina (GNT). Durante el análisis de las interacciones del complejo, se observó la formación de un puente de hidrógeno entre el metoxilo que sustituye al anillo aromático de la GNT y el aminoácido Ser 203 (Figura 11). Este aminoácido desempeña un papel crucial en el mecanismo catalítico de la enzima, ya que es el responsable de llevar a cabo el ataque nucleofílico al carbonilo de la ACh. Debido a la importancia de esta interacción, se consideró incorporar la característica de aceptor de puente de hidrógeno a las características extraídas del DNP, para la construcción del modelo farmacofórico.

Posterior a la identificación de las porciones estructurales que contribuirían a la construcción del farmacóforo, se procedió a la superposición de las estructuras 7E3H y 4EY6. Esto se llevó a cabo para comparar minuciosamente el espacio ocupado por cada uno de los ligandos en el bolsillo de la enzima, con el objetivo de extraer con precisión la ubicación de las características necesarias para la construcción del modelo farmacofórico en ZINCPharmer. En la figura 12A, se puede apreciar la superposición de ambos ligandos y los aminoácidos circundantes del bolsillo de la AChE. Aunque algunos aminoácidos no aparecen perfectamente superpuestos, esto se explica por la unión del ligando que induce el movimiento de aminoácidos cercanos (57). Estos pequeños cambios conformacionales son insignificantes y no afectan la tarea de superponer ambas estructuras.



**Figura 12.** Construcción del modelo farmacofórico.

**A:** Superposición de 7E3H y 4EY6. En verde resalta el DNP y en azul la GNT. **B:** Modelo farmacofórico construido en ZINCPharmer.

La superposición de estructuras proporcionó coordenadas consistentes para la construcción del modelo farmacofórico. En la figura 12B, se puede apreciar la disposición de cada una de las características extraídas. En la imagen se representa el DNP, y las esferas que se encuentran fuera de su estructura representan las características extraídas de la GNT. En la tabla 4, se detallan los farmacóforos, sus coordenadas y el radio del modelo construido.

**Tabla 4.** Características del modelo farmacofórico construido con ZINCPPharmer.

FARMACÓFORO	X	Y	Z	RADIO
Aceptor de hidrogeno	-48.26	34.51	-31.69	0.50
Hidrofóbico	-47.18	36.34	-29.84	1.00
Aromático	-39.08	36.42	-30.08	1.10
Aromático	-50.18	38.88	-29.698	1.10
Aceptor de hidrogeno	-41.65	35.55	-32.71	0.50

La búsqueda arrojó un total de 147 compuestos, de los cuales 110 eran únicos, y los 37 restantes correspondían a compuestos repetidos con distintas poses. Los compuestos repetidos fueron eliminados para reducir el tiempo de cómputo. Todos los compuestos cumplían con los criterios establecidos para el modelo farmacofórico y abarcaban un rango de peso molecular entre 338 g/mol y 721 g/mol.

## 6.2 Cribado virtual con herramientas de docking

El cribado virtual es una técnica utilizada en el descubrimiento de fármacos para identificar moléculas con potencial actividad frente a un objetivo dentro de un extenso grupo de candidatos. Se empleó el cribado virtual mediante docking molecular para identificar las moléculas con mayor probabilidad de ser activas contra la AChE. La tabla 5 presenta las energías de afinidad proporcionadas por los cuatro programas de docking utilizados para el conjunto de moléculas halladas en ZINC12, así como para el DNP y la GNT. En AutoDock, Vina y Flare, el estudio de acoplamiento puede generar diversas poses asociadas a distintas energías de afinidad; no obstante, los resultados presentados en este trabajo consideran únicamente la pose con la menor energía de afinidad, como se informa en la tabla 5.

Cada molécula recibió un número según su posición en el archivo sdf, y se excluyeron aquellas duplicadas.

**Tabla 5.** Energías de afinidad frente a AChE del set de moléculas encontradas mediante el modelo farmacofórico en los cuatro softwares de docking.

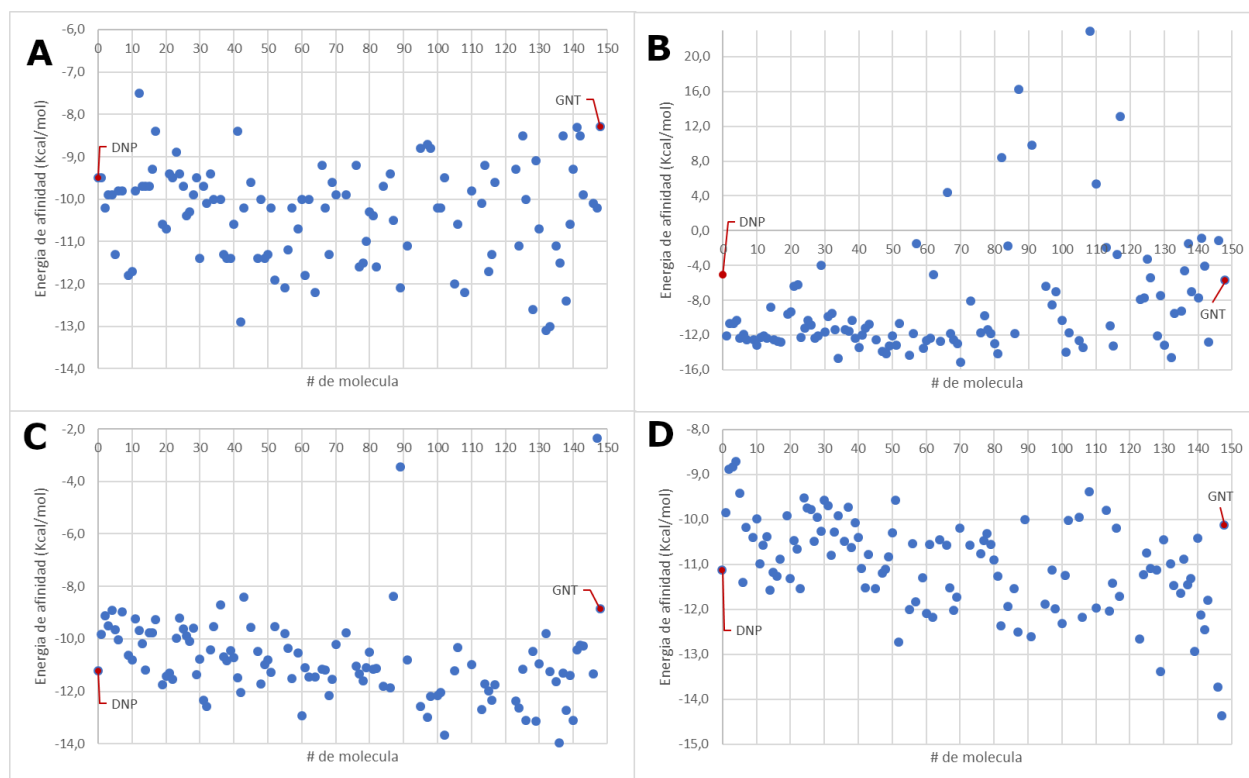
NO. MOLECULA	NOMBRE	VINA (KCAL/MOL)	DOCK6 (KCAL/MOL)	AUTODOCK (KCAL/MOL)	FLARE (KCAL/MOL)
-	DNP	-9.5	-5.1	-11.2	-11.1
-	GNT	-8.3	-5.8	-8.9	-10.1
1	ZINC05683355	-9.5	-12.1	-9.8	-9.8
2	ZINC09575686	-10.2	-10.7	-9.1	-8.9
3	ZINC13729484	-9.9	-10.7	-9.5	-8.8

4	ZINC13689566	-9.9	-10.3	-8.9	-8.7
5	ZINC08281891	-11.3	-12.4	-9.6	-9.4
6	ZINC15441960	-9.8	-12.0	-10.0	-11.4
7	ZINC42384658	-9.8	-12.6	-9.0	-10.2
9	ZINC47421993	-11.8	-12.5	-10.6	-10.4
10	ZINC61174126	-11.7	-13.2	-10.8	-10.0
11	ZINC16480834	-9.8	-12.3	-9.3	-11.0
12	ZINC05683351	-7.5	-12.1	-9.7	-10.6
13	ZINC01072993	-9.7	-12.4	-10.2	-10.4
14	ZINC80548316	-9.7	-8.8	-11.2	-11.6
15	ZINC02385040	-9.7	-12.6	-9.8	-11.2
16	ZINC02380087	-9.3	-12.8	-9.8	-11.3
17	ZINC42384582	-8.4	-12.8	-9.3	-10.9
19	ZINC72427832	-10.6	-9.6	-11.8	-10.0
20	ZINC91769333	-10.7	-9.3	-11.4	-11.3
21	ZINC72434303	-9.4	-6.4	-11.3	-10.5
22	ZINC72480597	-9.5	-6.2	-11.5	-10.7
23	ZINC05603530	-8.9	-12.3	-10.0	-11.5
24	ZINC13732703	-9.4	-11.2	-9.2	-9.5
25	ZINC20102151	-9.7	-10.3	-9.6	-9.8
26	ZINC12391703	-10.4	-10.8	-9.9	-9.8
27	ZINC49027705	-10.3	-12.4	-10.1	-10.5
28	ZINC01075466	-9.9	-12.1	-9.6	-10.0
29	ZINC19714648	-9.5	-4.0	-11.4	-10.3
30	ZINC40790093	-11.4	-11.6	-10.8	-9.6
31	ZINC08093814	-9.7	-9.9	-12.3	-9.7
32	ZINC08103259	-10.1	-9.6	-12.6	-10.8
33	ZINC73685951	-9.4	-11.4	-10.4	-10.3
34	ZINC04161452	-10.0	-14.7	-9.5	-9.9
36	ZINC72472058	-10.0	-11.4	-8.7	-10.5
37	ZINC40790286	-11.3	-11.5	-10.7	-9.7
38	ZINC40790479	-11.4	-10.3	-10.8	-10.6
39	ZINC40791058	-11.4	-12.3	-10.4	-10.1
40	ZINC04940096	-10.6	-13.5	-10.7	-10.4
41	ZINC73685923	-8.4	-12.0	-11.5	-11.1
42	ZINC12458335	-12.9	-11.2	-12.0	-11.5
43	ZINC72460826	-10.2	-10.7	-8.4	-10.8
45	ZINC16480830	-9.6	-12.6	-9.6	-11.5
47	ZINC04330180	-11.4	-13.9	-10.5	-11.2
48	ZINC05263990	-10.0	-14.2	-11.7	-11.1
49	ZINC05263993	-11.4	-13.3	-11.0	-10.8
50	ZINC40793744	-11.3	-12.1	-10.8	-10.3
51	ZINC32617499	-10.2	-13.1	-11.3	-9.6
52	ZINC41352284	-11.9	-10.7	-9.5	-12.7
55	ZINC41352288	-12.1	-14.3	-9.8	-12.0

56	ZINC40790672	-11.2	-11.8	-10.4	-10.5
57	ZINC38740516	-10.2	-1.5	-11.5	-11.8
59	ZINC04940037	-10.7	-13.5	-10.6	-11.3
60	ZINC67674468	-10.0	-12.6	-12.9	-12.1
61	ZINC09340268	-11.8	-12.4	-11.1	-10.6
62	ZINC38740440	-10.0	-5.1	-11.5	-12.2
64	ZINC22033795	-12.2	-12.7	-11.5	-10.4
66	ZINC72336985	-9.2	4.3	-11.2	-10.6
67	ZINC73685793	-10.2	-11.8	-11.2	-11.5
68	ZINC15882758	-11.3	-12.5	-12.2	-12.0
69	ZINC08601799	-9.6	-13.0	-11.6	-11.7
70	ZINC41352292	-9.9	-15.1	-10.2	-10.2
73	ZINC41352280	-9.9	-8.1	-9.8	-10.6
76	ZINC40790865	-9.2	-11.7	-11.0	-10.8
77	ZINC09305762	-11.6	-9.8	-11.3	-10.5
78	ZINC09344292	-11.5	-11.4	-11.6	-10.3
79	ZINC09422270	-11.0	-11.9	-11.1	-10.6
80	ZINC32617527	-10.3	-13.0	-10.5	-10.9
81	ZINC09336356	-10.4	-14.2	-11.2	-11.3
82	ZINC38740508	-11.6	8.4	-11.1	-12.4
84	ZINC38740666	-9.7	-1.7	-11.8	-11.9
86	ZINC73685773	-9.4	-11.8	-11.9	-11.5
87	ZINC41352296	-10.5	16.3	-8.4	-12.5
89	ZINC72472113	-12.1	-	-3.5	-10.0
91	ZINC38740431	-11.1	9.9	-10.8	-12.6
95	ZINC14141806	-8.8	-6.4	-12.6	-11.9
97	ZINC64728942	-8.7	-8.5	-13.0	-11.1
98	ZINC25023764	-8.8	-7.0	-12.2	-12.0
100	ZINC32690960	-10.2	-10.3	-12.2	-12.3
101	ZINC09642798	-10.2	-14.0	-12.1	-11.2
102	ZINC15946313	-9.5	-11.8	-13.7	-10.0
105	ZINC00855476	-12.0	-12.6	-11.2	-9.9
106	ZINC32617515	-10.6	-13.4	-10.3	-12.2
108	ZINC72460880	-12.2	22.9	2.9	-9.4
110	ZINC38740661	-9.8	5.3	-11.0	-12.0
113	ZINC27373739	-10.1	-2.0	-12.7	-9.8
114	ZINC41105099	-9.2	-10.9	-11.7	-12.0
115	ZINC59461959	-11.7	-13.3	-12.0	-11.4
116	ZINC10503907	-11.3	-2.8	-12.3	-10.2
117	ZINC71785595	-9.6	13.1	-11.7	-11.7
123	ZINC03252804	-9.3	-7.9	-12.4	-12.6
124	ZINC09463257	-11.1	-7.7	-12.6	-11.2
125	ZINC09218218	-8.5	-3.3	-11.2	-10.7
126	ZINC03359996	-10	-5.4	-13.1	-11.1
128	ZINC32983719	-12.6	-12.1	-10.5	-11.1

129	ZINC12628995	-9.1	-7.5	-13.1	-13.4
130	ZINC41352198	-10.7	-13.2	-10.9	-10.4
132	ZINC32983988	-13.1	-14.6	-9.8	-11.0
133	ZINC32983576	-13.0	-9.6	-11.2	-11.5
135	ZINC09537351	-11.1	-9.2	-11.6	-11.6
136	ZINC09816395	-11.5	-4.6	-14.0	-10.9
137	ZINC25154379	-8.5	-1.5	-11.3	-11.4
138	ZINC44928658	-12.4	-7.1	-12.7	-11.3
139	ZINC16448687	-10.6	-16.2	-11.4	-12.9
140	ZINC12569798	-9.3	-7.7	-13.1	-10.4
141	ZINC25159918	-8.3	-0.9	-10.4	-12.1
142	ZINC13030690	-8.5	-4.1	-10.2	-12.4
143	ZINC02973932	-9.9	-12.8	-10.3	-11.8
146	ZINC08433225	-10.1	-1.1	-11.3	-13.7
147	ZINC79228386	-10.2	-	-2.4	-14.4

Los resultados obtenidos en cada software exhibieron diferencias, cada uno de ellos presento características únicas en los diagramas de dispersión (Figura 13) que están estrechamente relacionadas con el algoritmo de búsqueda implementado en cada uno de ellos.



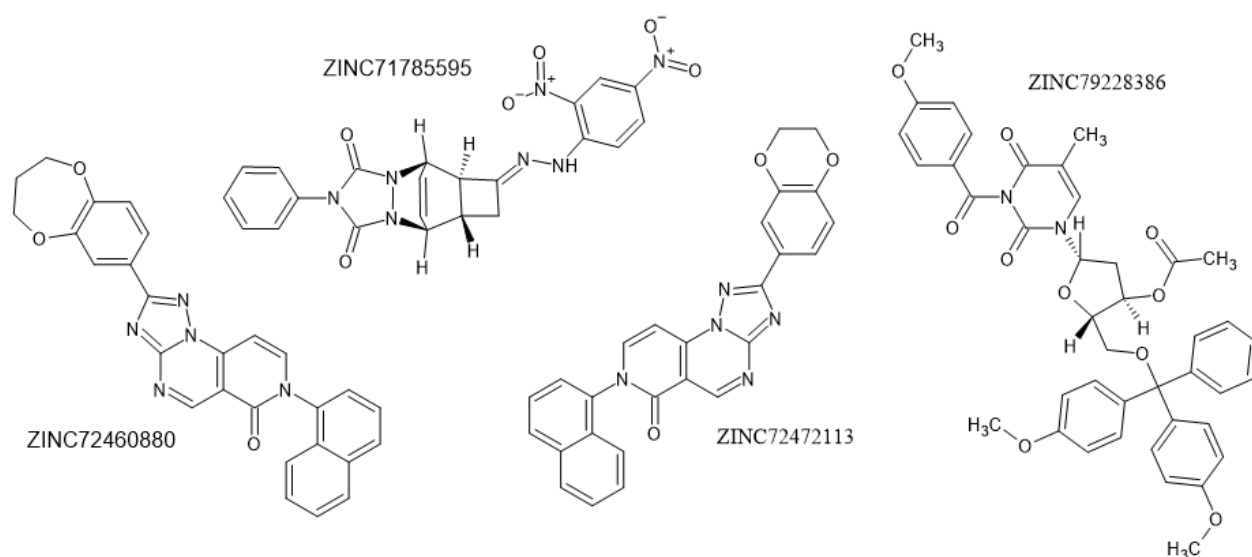
**Figura 13.** Diagramas de dispersión de la energía de afinidad de los compuestos obtenidos en ZINC12.

**A:** Resultados de Vina. **B:** Resultados de DOCK6. **C:** Resultados de AutoDock **D:** Resultados de Flare

La diferencia más significativa se observó en DOCK6, donde se identifican claramente dos grandes regiones en la gráfica de dispersión. La primera de ellas corresponde a todas las moléculas con una energía de afinidad menor que la de GNT y DNP, caracterizándose por contener la mayoría de las moléculas. La segunda zona comprende moléculas con una energía de afinidad mayor que las moléculas de referencia DNP y GNT, y resulta llamativa debido a que incluye moléculas con valores de energía positivos muy grandes, un fenómeno que solo ocurrió en este software.

La molécula con la peor energía de afinidad es ZINC72460880, cuya estructura es poco flexible y presenta grupos voluminosos con gran impedimento estérico. Muchas de las moléculas en la segunda zona comparten características con ZINC72460880. DOCK6 es esencialmente un software de docking rígido que ha implementado ciertas estrategias para conferir un grado de flexibilidad al ligando. Esto lo hace muy sensible a moléculas voluminosas en relación con el sitio de unión, penalizándolas severamente, como ha sucedido con algunos candidatos en este proyecto.

Otro factor que influye en las altas energías de afinidad de este segundo grupo de moléculas es la poca flexibilidad de las mismas. Esto limita aún más las poses que DOCK6 puede evaluar, resultando en energías de afinidad desfavorables. Estos razonamientos respaldan el hecho de que no se haya obtenido resultados de energía de afinidad en el caso de ZINC79228386 y ZINC72472113, ya que el sitio de unión no es lo suficientemente grande y la molécula es demasiado rígida y voluminosa, lo que hace imposible su acoplamiento para el software.



**Figura 14.** Estructuras de las moléculas con peores resultados en DOCK6.

Por otro lado, los resultados obtenidos en Vina presentan algunas diferencias con respecto a los obtenidos en AutoDock y Flare. Se observa cierta dispersión en los datos, y comprender las variaciones en el funcionamiento de estos programas es crucial para entender las diferencias en los resultados. Esta diferencia destaca la ventaja de combinar estos softwares, ya que permite

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

identificar moléculas con mayor probabilidad de ser activas al considerar diferentes enfoques y algoritmos de acoplamiento molecular.

Vina es un software de docking que destaca por su rapidez, superando a otros como AutoDock, esta característica lo hace especialmente útil en el cribado virtual, siendo capaz de encontrar poses cercanas a las reales. A diferencia de AutoDock, Vina no emplea algoritmos genéticos para muestrear el espacio de búsqueda, sino que utiliza un método metaheurístico de optimización conocido como optimizador global de búsqueda local (38). Esta estrategia permite hallar soluciones de calidad sin invertir demasiado tiempo de cómputo. Consiste en buscar una solución inicial que posteriormente se mejora para encontrar una solución local. Tras un número definido de iteraciones, la solución se modifica para hacer un salto en el espacio de búsqueda, explorando nuevas regiones y aumentando así la probabilidad de encontrar el mínimo global (58). Estos saltos en el espacio contribuyen a identificar las soluciones de menor energía y en consecuencia identificar los posibles compuestos activos.

Además, los resultados de AutoDock y Flare comparten una tendencia similar, posiblemente a la similitud de sus algoritmos de búsqueda. Ambos softwares usan algoritmos genéticos con modificaciones basadas en métodos de optimización local (35, 59), estos algoritmos genéticos, son conocidos como lamarckianos, se inspiran en el concepto tradicional de la herencia genética, incorporando la posibilidad de transmitir a las futuras generaciones los rasgos adquiridos durante la vida del individuo (60). Esto implica que el fenotipo (resultado de la búsqueda local) reemplaza al genotipo (resultado inicial), esto viola la genética mendeliana observada en la naturaleza, resulta útil para abordar problemas de optimización.

A pesar de las similitudes observadas entre AutoDock y Flare, existen diferencias significativas dentro de sus resultados que pueden ser explicados desde el análisis de sus funciones de puntuación. AutoDock utiliza una única función de puntuación basada en campos de fuerza semiempíricos para clasificar las poses generadas y estimar la afinidad del ligando por el receptor. En contraste, Lead Finder, el paquete responsable del docking en Flare, incorpora tres funciones de puntuación. Estas tienen como objetivo predecir con precisión la energía de unión, clasificar correctamente las poses generadas de un ligando y diferenciar entre compuestos activos e inactivos en ejercicios de cribado virtual. Aunque todas las funciones contienen el mismo conjunto de contribuciones de energía, están ponderadas con diferentes coeficientes (59).

Debido al objetivo de esta fase del proyecto, se decidió usar el valor de la función de puntuación VScore de Lead Finder. Dicha función está optimizada para identificar compuestos activos. Los datos de energía reportados en la tabla 5 corresponden al valor de mejor energía calculada con VScore entre las poses generadas de un mismo ligando. Esta elección implica que, en general, los valores de afinidad obtenidos en Flare son considerablemente menores que los de AutoDock.

La utilización de cuatro programas con enfoques de búsqueda y puntuación diversos, como se ha discutido en esta sección, posibilita realizar un cribado robusto. Este enfoque permite descartar aquellas moléculas que, a pesar de cumplir con el modelo farmacofórico propuesto, presentan características que sugieren una baja probabilidad de ser activas. Este enfoque integral contribuye a evitar la aceptación de falsos positivos en el proceso de selección de compuestos.

### 6.3 Consenso y análisis farmacocinético

Como se ha analizado previamente, la utilización de diferentes softwares de docking fortalece el proceso de cribado, incrementando la probabilidad de identificar moléculas activas. No obstante, la variabilidad en los programas utilizados implica que los valores absolutos de puntuación de las diversas funciones no sean directamente comparables entre sí (54).

Las funciones de puntuación suelen variar, y emplear estos valores sin procesar podría sesgar el consenso, comprometiendo la solidez obtenida mediante la combinación de los programas. El método de consenso, conocido como promedio de puntuación de auto escalado, garantiza que se puedan consensuar los valores de puntuación independientemente de sus diferencias. El PPAE posibilita la conversión de los valores de puntuación a un rango entre 0 y 1. En este escenario, 0 representa afinidades bajas, mientras que 1 indica afinidades elevadas, considerando los valores máximos y mínimos de energía obtenidos en cada software (54). La tabla 6 muestra los valores máximos y mínimos de energía en cada software, los cuales se utilizaron para el cálculo del PPAE.

**Tabla 6.** Valores de  $X_{max}$  y  $X_{min}$  de energía obtenidos en cada software.

	VINA (KCAL/MOL)	DOCK6 (KCAL/MOL)	AUTODOCK (KCAL/MOL)	FLARE (KCAL/MOL)
$X_{min}$	-7.5	22.9	2.9	-8.7
$X_{max}$	-13.1	-12.2	-14.0	-14.4

Los resultados del método de consenso se presentan en la tabla 7, con los valores correspondientes al DNP y la GNT resaltados en azul para facilitar la comparación. Los resultados de PPAE oscilan entre 0.829 y 0.240. Aunque el auto escalado busca normalizar los valores entre 0 y 1, esto solo ocurre cuando el valor absoluto de  $X_{min}$  es menor que el valor absoluto de  $X_{max}$ , una condición que no se satisface en DOCK6. Como se analizó anteriormente, DOCK6 penaliza fuertemente a las moléculas voluminosas y poco flexibles, asignándoles valores de energía muy altos. Debido a esto, algunos valores de escalado para DOCK6 superan 1, beneficiando a aquellas moléculas con una energía de afinidad baja.

**Tabla 7.** Resultados del método de consenso para el set de moléculas sometidas al cribado virtual con docking.

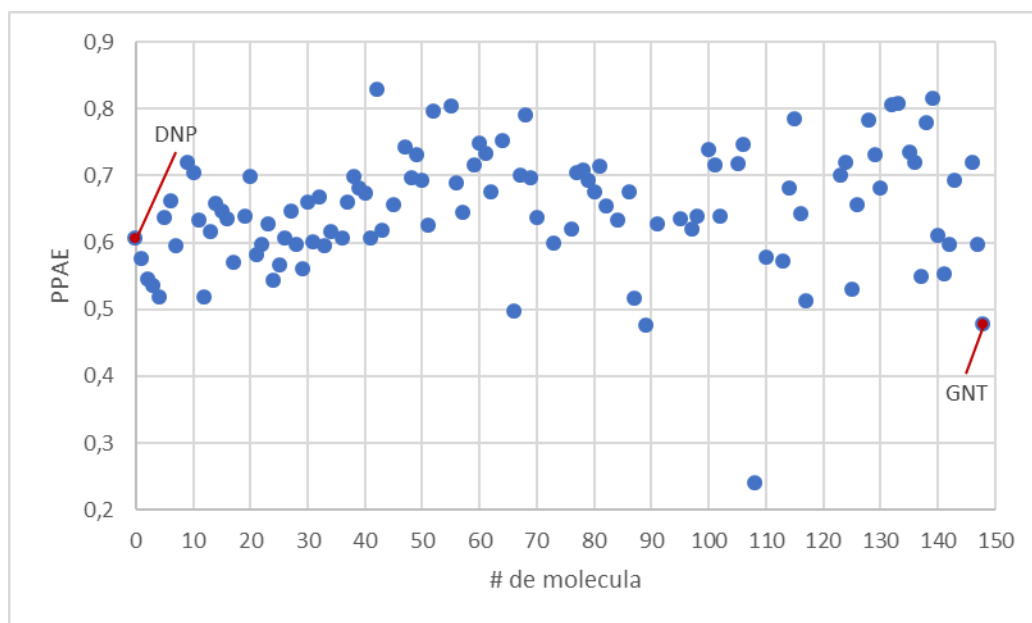
NO. MOLECULA	NOMBRE	$X_{VINA}$	$X_{DOCK6}$	$X_{AUTODOCK}$	$X_{FLARE}$	PPAE
-	DNP	0.357	0.798	0.836	0.429	0.605
-	GNT	0.143	0.817	0.697	0.253	0.477
1	ZINC05683355	0.357	0.996	0.753	0.201	0.577
2	ZINC09575686	0.482	0.957	0.711	0.033	0.546

3	ZINC13729484	0.429	0.957	0.733	0.024	0.536
4	ZINC13689566	0.429	0.947	0.699	0.000	0.519
5	ZINC08281891	0.679	1.004	0.742	0.128	0.638
6	ZINC15441960	0.411	0.993	0.766	0.478	0.662
7	ZINC42384658	0.411	1.011	0.702	0.259	0.596
9	ZINC47421993	0.768	1.010	0.801	0.300	0.720
10	ZINC61174126	0.750	1.028	0.811	0.227	0.704
11	ZINC16480834	0.411	1.003	0.719	0.404	0.634
12	ZINC05683351	0.000	0.998	0.744	0.329	0.518
13	ZINC01072993	0.393	1.004	0.774	0.297	0.617
14	ZINC80548316	0.393	0.904	0.833	0.507	0.659
15	ZINC02385040	0.393	1.011	0.749	0.438	0.648
16	ZINC02380087	0.321	1.016	0.750	0.453	0.635
17	ZINC42384582	0.161	1.018	0.721	0.385	0.571
19	ZINC72427832	0.554	0.925	0.867	0.214	0.640
20	ZINC91769333	0.571	0.919	0.848	0.461	0.700
21	ZINC72434303	0.339	0.836	0.840	0.311	0.582
22	ZINC72480597	0.357	0.829	0.854	0.346	0.597
23	ZINC05603530	0.250	1.002	0.763	0.500	0.629
24	ZINC13732703	0.339	0.972	0.716	0.145	0.543
25	ZINC20102151	0.393	0.947	0.741	0.186	0.567
26	ZINC12391703	0.518	0.961	0.756	0.189	0.606
27	ZINC49027705	0.500	1.005	0.769	0.314	0.647
28	ZINC01075466	0.429	0.997	0.740	0.221	0.597
29	ZINC19714648	0.357	0.765	0.844	0.277	0.561
30	ZINC40790093	0.696	0.983	0.809	0.154	0.661
31	ZINC08093814	0.393	0.935	0.902	0.176	0.601
32	ZINC08103259	0.464	0.925	0.916	0.369	0.668
33	ZINC73685951	0.339	0.978	0.788	0.278	0.596
34	ZINC04161452	0.446	1.072	0.736	0.214	0.617
36	ZINC72472058	0.446	0.977	0.687	0.316	0.607
37	ZINC40790286	0.679	0.981	0.804	0.183	0.662
38	ZINC40790479	0.696	0.946	0.812	0.340	0.699
39	ZINC40791058	0.696	1.004	0.789	0.241	0.683
40	ZINC04940096	0.554	1.036	0.805	0.301	0.674
41	ZINC73685923	0.161	0.994	0.851	0.421	0.607
42	ZINC12458335	0.964	0.971	0.883	0.499	0.829
43	ZINC72460826	0.482	0.958	0.669	0.367	0.619
45	ZINC16480830	0.375	1.011	0.737	0.501	0.656
47	ZINC04330180	0.696	1.048	0.791	0.439	0.744
48	ZINC05263990	0.446	1.056	0.865	0.424	0.698
49	ZINC05263993	0.696	1.031	0.822	0.375	0.731
50	ZINC40793744	0.679	0.996	0.811	0.283	0.692
51	ZINC32617499	0.482	1.027	0.839	0.153	0.625
52	ZINC41352284	0.786	0.956	0.735	0.713	0.797

55	ZINC41352288	0.821	1.060	0.752	0.582	0.804
56	ZINC40790672	0.661	0.989	0.785	0.324	0.690
57	ZINC38740516	0.482	0.694	0.853	0.554	0.646
59	ZINC04940037	0.571	1.038	0.796	0.458	0.716
60	ZINC67674468	0.446	1.012	0.937	0.599	0.749
61	ZINC09340268	0.768	1.006	0.829	0.328	0.733
62	ZINC38740440	0.446	0.797	0.849	0.613	0.677
64	ZINC22033795	0.839	1.015	0.850	0.308	0.753
66	ZINC72336985	0.304	0.528	0.831	0.330	0.498
67	ZINC73685793	0.482	0.989	0.834	0.498	0.701
68	ZINC15882758	0.679	1.010	0.892	0.588	0.792
69	ZINC08601799	0.375	1.024	0.855	0.534	0.697
70	ZINC41352292	0.429	1.083	0.776	0.262	0.637
73	ZINC41352280	0.429	0.884	0.750	0.332	0.599
76	ZINC40790865	0.304	0.987	0.824	0.365	0.620
77	ZINC09305762	0.732	0.931	0.841	0.313	0.704
78	ZINC09344292	0.714	0.977	0.858	0.285	0.709
79	ZINC09422270	0.625	0.990	0.828	0.328	0.693
80	ZINC32617527	0.500	1.024	0.793	0.389	0.676
81	ZINC09336356	0.518	1.056	0.833	0.452	0.715
82	ZINC38740508	0.732	0.412	0.830	0.647	0.655
84	ZINC38740666	0.393	0.702	0.870	0.570	0.634
86	ZINC73685773	0.339	0.989	0.873	0.500	0.676
87	ZINC41352296	0.536	0.189	0.668	0.671	0.516
89	ZINC72472113	0.821	-	0.376	0.230	0.476
91	ZINC38740431	0.643	0.371	0.811	0.690	0.629
95	ZINC14141806	0.232	0.835	0.915	0.563	0.636
97	ZINC64728942	0.214	0.896	0.940	0.429	0.620
98	ZINC25023764	0.232	0.852	0.892	0.579	0.639
100	ZINC32690960	0.482	0.947	0.892	0.638	0.740
101	ZINC09642798	0.482	1.050	0.885	0.450	0.717
102	ZINC15946313	0.357	0.987	0.980	0.234	0.640
105	ZINC00855476	0.804	1.013	0.836	0.219	0.718
106	ZINC32617515	0.554	1.035	0.783	0.614	0.746
108	ZINC72460880	0.839	-0.001	0.001	0.120	0.240
110	ZINC38740661	0.411	0.501	0.821	0.578	0.577
113	ZINC27373739	0.464	0.709	0.922	0.194	0.572
114	ZINC41105099	0.304	0.964	0.866	0.591	0.681
115	ZINC59461959	0.750	1.031	0.880	0.479	0.785
116	ZINC10503907	0.679	0.731	0.901	0.263	0.644
117	ZINC71785595	0.375	0.278	0.866	0.531	0.512
123	ZINC03252804	0.321	0.877	0.904	0.698	0.700
124	ZINC09463257	0.643	0.872	0.919	0.446	0.720
125	ZINC09218218	0.179	0.745	0.833	0.361	0.529
126	ZINC03359996	0.446	0.808	0.948	0.423	0.656

128	ZINC32983719	0.911	0.998	0.792	0.429	0.782
129	ZINC12628995	0.286	0.866	0.949	0.827	0.732
130	ZINC41352198	0.571	1.028	0.819	0.309	0.682
132	ZINC32983988	1.000	1.069	0.751	0.404	0.806
133	ZINC32983576	0.982	0.925	0.837	0.489	0.808
135	ZINC09537351	0.643	0.915	0.860	0.521	0.735
136	ZINC09816395	0.714	0.783	0.999	0.385	0.720
137	ZINC25154379	0.179	0.694	0.840	0.487	0.550
138	ZINC44928658	0.875	0.853	0.924	0.463	0.779
139	ZINC16448687	0.554	1.113	0.846	0.748	0.815
140	ZINC12569798	0,321	0.872	0.947	0.305	0.611
141	ZINC25159918	0.143	0.677	0.788	0.605	0.553
142	ZINC13030690	0.179	0.769	0.777	0.661	0.596
143	ZINC02973932	0.429	1.017	0.780	0.547	0.693
146	ZINC08433225	0.464	0.684	0.843	0.889	0.720
147	ZINC79228386	0.482	-	0.311	1.000	0.598

Se elaboró un gráfico de dispersión para examinar el comportamiento del conjunto de moléculas en comparación con las moléculas de referencia DNP y GNT (Figura 15). Como se anticipaba según la literatura (23), el DNP mostró un PPAE superior al de la GNT, con valores de 0.605 y 0.477, respectivamente. Esto indica que, según los softwares utilizados, el DNP es más afín por la AChE, lo que concuerda con la práctica. Por este motivo, el DNP se tomará como la molécula de referencia para las fases subsiguientes de este estudio.



**Figura 15.** Diagrama de dispersión del promedio de puntuación de auto escalado para el set de moléculas sometidas al cribado virtual.

Inicialmente, se proyectó que tras la etapa de cribado virtual solo unas pocas moléculas exhibirían una afinidad superior al DNP. Sin embargo, los resultados revelaron que el 72.7% de las moléculas superaron al DNP, con 80 de las 110 moléculas candidatas destacando después de aplicar el método

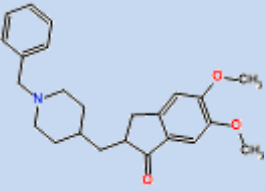
de consenso seleccionado. Debido a la considerable cantidad de moléculas promisorias luego de los estudios de docking, se optó por reducir la selección a tan solo 10 moléculas, eligiendo aquellas con el mayor valor de PPAE. En la tabla 7, se resaltan en color naranja las moléculas seleccionadas, las cuales presentaron un PPAE entre 0.829 y 0.779. A pesar de esta selección, se sugiere no descartar por completo las restantes 70 moléculas con resultados promisorios y se recomienda considerar su estudio en proyectos futuros.

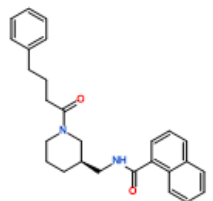
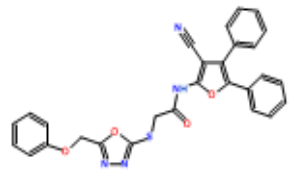
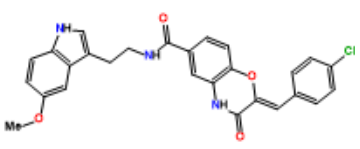
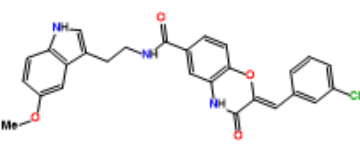
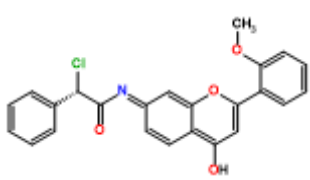
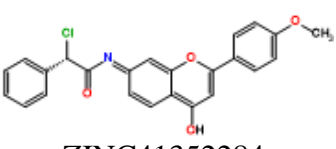
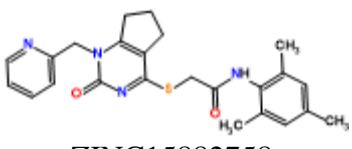
En el desarrollo de fármacos, es preferible que la molécula candidata sea biodisponible por vía oral, esto quiere decir que la molécula candidata va a ser absorbida a una velocidad adecuada por el tracto gastrointestinal hacia la sangre y alcanzará concentraciones terapéuticas en el sitio de acción. La regla de cinco de Lipinski actúa como guía para predecir la probabilidad de que una molécula sea biodisponible por vía oral. Conforme a esta regla, los compuestos que tengan más de 5 donantes de enlaces de hidrógeno, más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno, un peso molecular superior a 500 g/mol y un logP calculado (cLogP) superior a 5 o un logP de Moriguchi (mLogP) superior a 4,15 tiene una baja probabilidad de ser biodisponibles por vía oral (55).

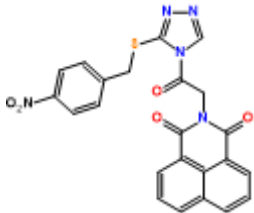
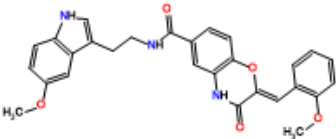
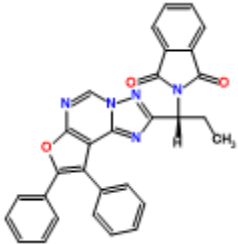
En este proyecto, la biodisponibilidad por vía oral se convierte en un parámetro crucial. Dada la naturaleza de la enfermedad que se pretende abordar y el rango etario de la población objetivo, la capacidad de administrar el fármaco por vía oral sería una ventaja significativa en comparación con otras vías de administración. La aplicación de la regla de Lipinski se justifica al permitir la priorización de compuestos que exhiban propiedades fisicoquímicas favorables para su posterior optimización. Por esta razón, se optó por aplicar la regla de Lipinski a los diez candidatos seleccionados mediante el cribado virtual. En la tabla 8 se muestran la regla de Lipinski aplicada a los diez compuestos seleccionados por cribado virtual.

Se dio preferencia al logP de Moriguchi sobre otros métodos de cálculo de logP. Esta elección se basa en la amplia variedad de propuestas disponibles para calcular el logP, lo que puede generar resultados divergentes. Por ejemplo, SwissADME ofrece el cálculo del logP mediante cinco métodos diferentes. Tomando la molécula ZINC16448687 como ejemplo, se obtienen valores de iLogP (4.00), xLopP3 (5.96), wLogP (5.84), mLogP (2.70) y SILICOS-IT (5.38). Esta diversidad de resultados podría llevar a la molécula a violar la regla de Lipinski en tres de los cinco métodos de cálculo. Además de esa variabilidad, el método de Moriguchi fue elegido por Lipinski para implementar su regla (55), ya que es un sistema basado en reglas que siempre produce una respuesta (61) y es útil para calcular propiedades de moléculas en una biblioteca.

**Tabla 8.** Parámetros de la regla de Lipinski aplicados a las moléculas elegidas por cribado virtual

MOLECULA	MLOGP*	MW* (g/mol)	#ACEPT.*	#DONOR.*	ROF*
 DNP	3.06	379.5	4	0	0

 ZINC12458335	3.95	414.5	3	1	0
 ZINC16448687	2.70	508.5	7	1	1
 ZINC32983576	3.04	487.9	4	3	0
 ZINC32983988	3.04	487.9	4	3	0
 ZINC41352288	2.40	420.9	4	2	0
 ZINC41352284	2.40	420.9	4	2	0
 ZINC15882758	2.74	434.5	5	1	0

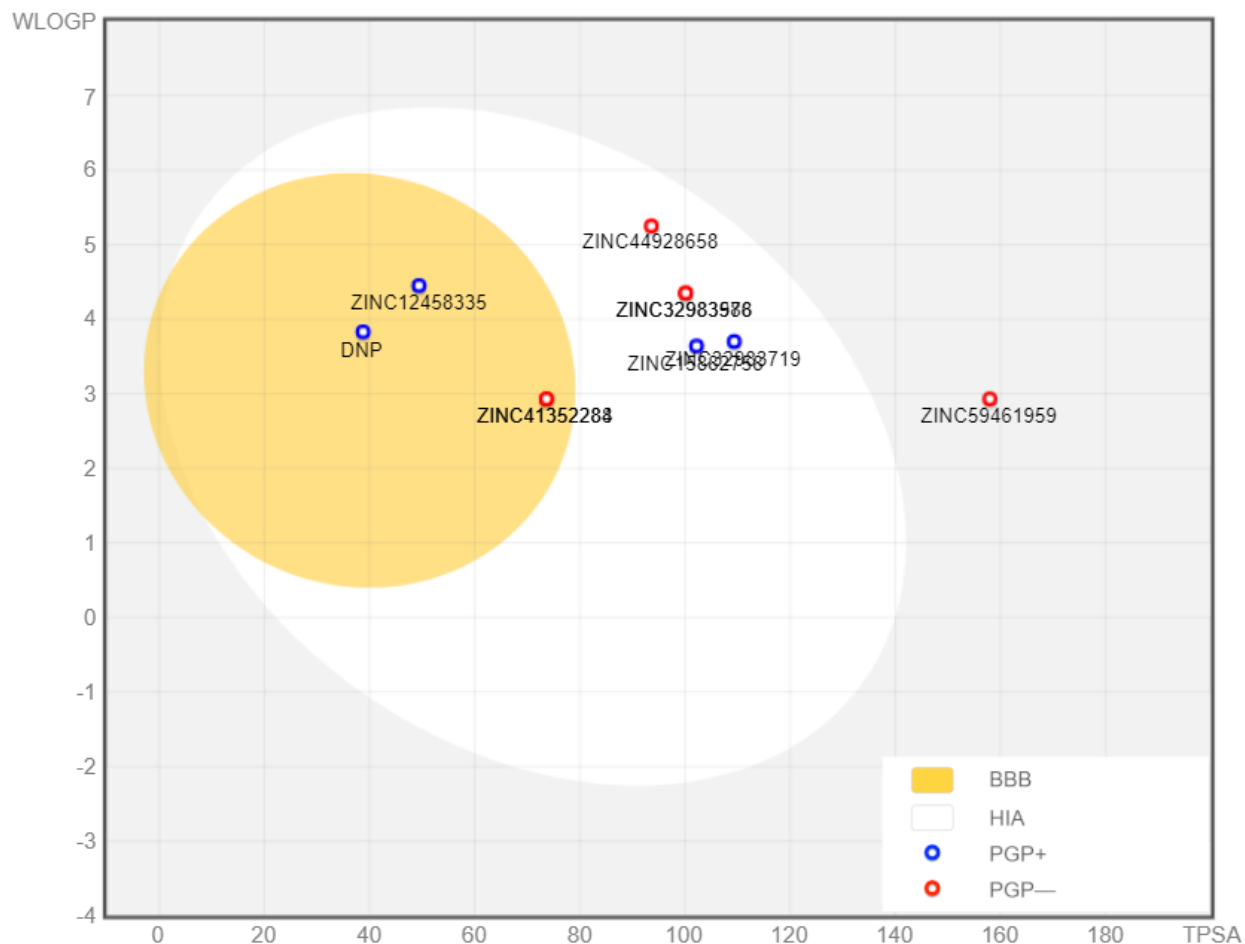
 <p>ZINC59461959</p>	2.84	473.5	7	0	0
 <p>ZINC32983719</p>	2.25	483.5	5	3	0
 <p>ZINC44928658</p>	3.63	499.5	8	0	0

\* $mLogP \leq 4.15$ ;  $MW$  (peso molecular)  $\leq 500$  g/mol; #Acept. (Número de aceptores de puente de hidrogeno)  $\leq 10$ ; #Donor. (Número de donantes de puentes de hidrogeno)  $\leq 5$ ; ROF (Número de violaciones a la regla de cinco de Lipinski)

El análisis de las reglas de Lipinski, arrojó como resultado que 9 moléculas cumplían los cuatro criterios de la regla y solo una violaba uno de los parámetros, debido a la necesidad de que las moléculas aquí propuestas sean biodisponibles por vía oral, se decidió eliminar a ZINC16448687.

Otro parámetro farmacocinético de importancia que debe cumplir un candidato a AChEi es su capacidad para atravesar la BHE y llevar a cabo su acción de manera central. La BHE se puede considerar como un escudo protector del cerebro, conformado por células estrechamente unidas que evitan el transporte paracelular, además de una serie de bombas de eflujo que impiden el paso hacia el cerebro. El principal método de transporte de moléculas hacia el cerebro es la difusión pasiva, y esta solo ocurre si las moléculas cumplen con características fisicoquímicas especiales. (56).

En 2016 se publicó el método del "diagrama del huevo hervido", el cual es un método fácil de calcular y estadísticamente robusto para predecir absorción pasiva en el tracto gastrointestinal y la permeabilidad pasiva de la BHE. El método se basa en calcular dos parámetros, el  $wLogP$  y el TPSA. Luego de graficar ambas propiedades, existen zonas demarcadas en la gráfica que permiten determinar si el compuesto tiene probabilidad de ser absorbido en el tracto gastrointestinal y/o de atravesar la BHE (56).



**Figura 16.** Diagrama del huevo hervido para las moléculas que no violaron la regla de Lipinski. La zona amarilla representa las moléculas que permean pasivamente la BHE. La zona blanca representa las moléculas que presentan absorción pasiva en el tracto gastrointestinal. Los puntos azules son aquellas que son sustrato de la glicoproteína-P y los rojos son aquellas que no lo son.

En la figura 16 se presenta el diagrama del huevo hervido para las nueve moléculas que no violaron la regla de Lipinski. Según el modelo de huevo hervido, se predice que ZINC59461959 no presentará absorción pasiva en el tracto gastrointestinal, por lo que se descarta como candidato a seguir en el proceso de optimización. De las nueve moléculas, solo a cinco se les predijo absorción pasiva por el tracto gastrointestinal. Se observa una similitud estructural entre ZINC32983988 y ZINC32983576, siendo la única diferencia la posición del cloro en el anillo fenilo; por esta razón, estos dos compuestos aparecen superpuestos en la figura 16.

Se observa una similitud estructural entre ZINC32983988 y ZINC32983576, siendo la única diferencia la posición del cloro en el anillo fenilo; por esta razón, estos dos compuestos aparecen superpuestos en la figura 16. De igual forma, ocurre con ZINC41352288 y ZINC41352284, cuya diferencia es la posición del metoxilo. Entre las nueve moléculas sometidas al método del huevo

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

hervido, tan solo tres fueron predichas como permeadoras de la BHE. Por esta razón, se descartaron los ocho candidatos restantes.

Como se mencionó anteriormente, dos de los candidatos seleccionados por su capacidad para permear la BHE poseen una similitud estructural, por esta razón, se decidió continuar la fase de optimización solo con la molécula que tuvo mayor PPAE. Las moléculas seleccionadas para optimizar fueron ZINC12458335 y ZINC41352288. Por facilidad, se les nombrará de ahora en adelante como NAPH y CHRO, respectivamente.

#### 6.4 Optimización bioisostérica 3D-QSAR y propiedades tóxicas

La utilización de cuatro softwares de docking permitió obtener cuatro poses distintas para cada una de las moléculas. Posteriormente, se empleó cada pose para ser optimizada con SeeSAR con el objetivo de obtener nuevos candidatos con propiedades mejoradas. El proceso de optimización se basó en tres pilares fundamentales. En primer lugar, se buscó mejorar la afinidad de la molécula en cada pose por el receptor, procurando, cuando fuera posible, superar o igualar la afinidad del DNP. En segundo lugar, se verificó que se mantuviera la permeación de la BHE. Finalmente, en tercer lugar, se evaluaron las propiedades toxicas, procurando que fueran mejores que las de la molécula original y, si fuera posible, mejores o al menos similares a las del DNP.

En la tabla 9 se presentan los parámetros seleccionados para evaluar la toxicidad, los cuales fueron aplicados a DNP, NAPH y CHRO. Ninguna de las moléculas demostró ser un inhibidor de hERG I, por lo que se busca que ninguno de los análogos generados presente esta propiedad. El LD<sub>50</sub> de los tres compuestos es superior a las 2 mol/kg. Es importante tener en cuenta que la tabla 9 se usara como comparador de los datos obtenidos luego de la optimización.

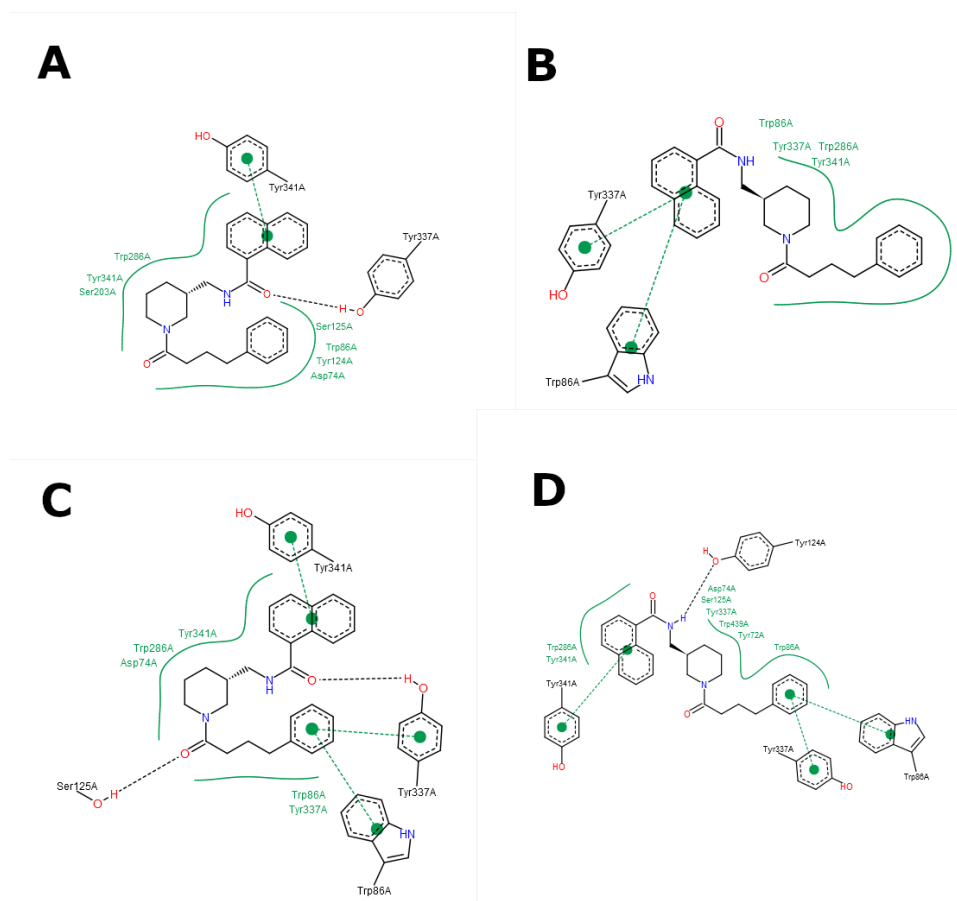
*Tabla 9. Propiedades toxicas de los candidatos elegidos para optimización*

<b>NOMBRE</b>	<b>TOXICIDAD ORAL AGUDA EN RATA - LD<sub>50</sub> (mol/kg)</b>	<b>INHIBIDOR DE hERG I</b>
DNP	2.753	No
NAPH	2.257	No
CHRO	3.016	No

Como se ha mencionado, la optimización de cada candidato se llevó a cabo por cuadruplicado, utilizando cada una de las poses propuestas por los programas de docking. Para facilitar la identificación de la procedencia de cada pose, se añadirá al nombre de la molécula una o dos letras que indiquen el programa de docking correspondiente. En específico, se agregará "AD" para AutoDock, "D" para DOCK6, "V" para Vina, y "F" para Flare.

##### 6.4.1 Optimización de NAPH

En la figura 17 se observa el diagrama de interacciones para NAPH en cada uno de los softwares de docking utilizados. Este análisis se empleó como insumo para el proceso de optimización y será discutido en detalle en cada uno de los apartados correspondientes.

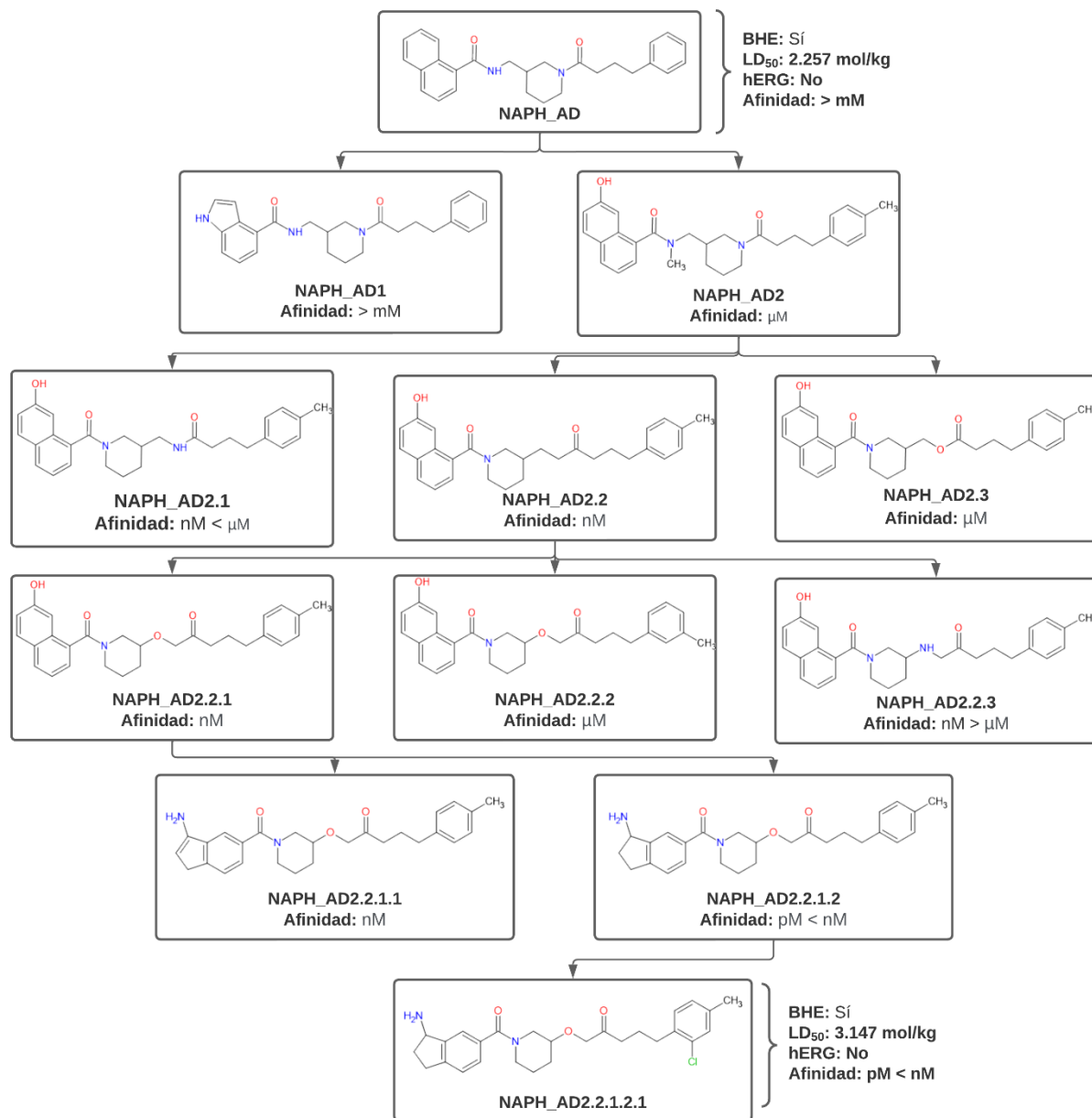


**Figura 17.** Diagrama de interacciones 2D para los complejos NAPH – AChE.

**A:** Pose obtenida por AutoDock. **B:** Pose obtenida por DOCK6. **C:** Pose obtenida por AutoDock Vina. **D:** Pose obtenida por Flare.

#### 6.4.1.1 AutoDock

Aprovechando la función HYDE de SeeSAR, se identificaron los átomos que contribuían de manera negativa a la unión del ligando con el receptor, y se buscó modificarlos para obtener una mejor afinidad. En la figura 18 se muestra la ruta de optimización que se siguió. Se identificó, a partir de la posición original, que el anillo de naftaleno, ubicado hacia la boca del bolsillo catalítico, tenía la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con aminoácidos cercanos. Por lo cual, se modificó uno de los anillos aromáticos por uno de pirrol (NAPH\_AD1), buscando que el nitrógeno pudiera formar dicha interacción. Al observar que, por la geometría, no era posible formar la interacción y, en consecuencia, no había mejora en la afinidad, se optó por proponer otra estructura que tuviera un hidroxilo en la posición 7 con respecto al carbonilo que sustituye al naftaleno. Además, se añadieron dos metilos para ocupar espacios vacíos y buscar interacciones hidrofóbicas con aminoácidos circundantes (NAPH\_AD2). Se observó una mejoría en la afinidad por lo que se continuó a partir de esta estructura.

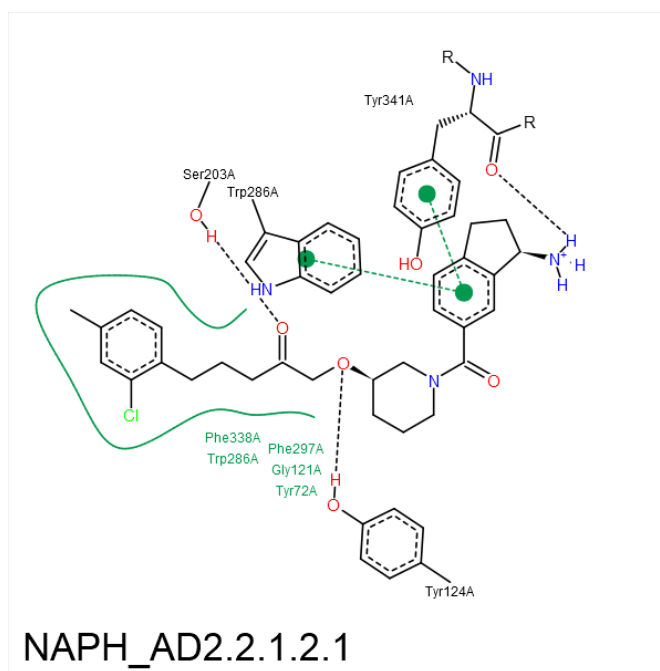


**Figura 18.** Ruta de optimización para NAPH\_AD.

A partir de la estructura NAPH\_AD2, se observó que la rigidificación de la estructura con un anillo de piperidina era más beneficiosa si se realizaba en el nitrógeno amídico cercano al anillo de naftaleno. Esto se debía a que permitía un mejor posicionamiento del anillo aromático para el apilamiento  $\pi$  y la formación de puente de hidrógeno con el hidroxilo. Al realizar esto, la cadena de seis miembros podía acomodarse de mejor forma en el fondo del bolsillo, aumentando la interacción hidrofóbica del metilo que sustituye al anillo de fenilo. Se realizaron cambios en el átomo vecino al carbonilo de esta cadena y se observó que la mejor energía de afinidad resultaba al cambiar el nitrógeno por un átomo de carbono (NAPH\_AD2.2).

El cambio que se muestra en la serie NAPH\_AD2.2.1 y NAPH\_AD2.2.2 se debe a que existía la posibilidad de formar un puente de hidrógeno añadiendo un átomo aceptor. Se evaluó el nitrógeno como el oxígeno, resultando ser el oxígeno mejor para esta tarea. Por último, el cambio de uno de los anillos aromáticos de seis miembros del naftaleno por uno de cinco no aromático sustituido con una amina responde a la necesidad de disminuir choques estéricos intramoleculares que se estaban presentando entre este anillo y el de piperidina. Este cambio conservó la formación de puentes de hidrógeno con aminoácidos del SAP.

En NAPH\_AD2.2.1.2.1 se le añadió un cloro en el anillo de fenilo para aumentar la interacción hidrofóbica en el fondo del sitio activo. Este compuesto mostró una afinidad estimada en el rango de pM a nM, permeación de la BHE y un LD<sub>50</sub> mayor que el de NAPH y DNP. En la figura 19 se observa el diagrama de interacciones para NAPH\_AD2.2.1.2.1. En general, las interacciones se conservaron y solo hubo pérdida de un puente de hidrógeno. Se formaron tres nuevos puentes de hidrógeno, se ocupó mejor el espacio disponible para formar interacciones hidrofóbicas en el fondo del sitio activo, y se potenciaron las interacciones de apilamiento  $\pi$  con aminoácidos del SAP..

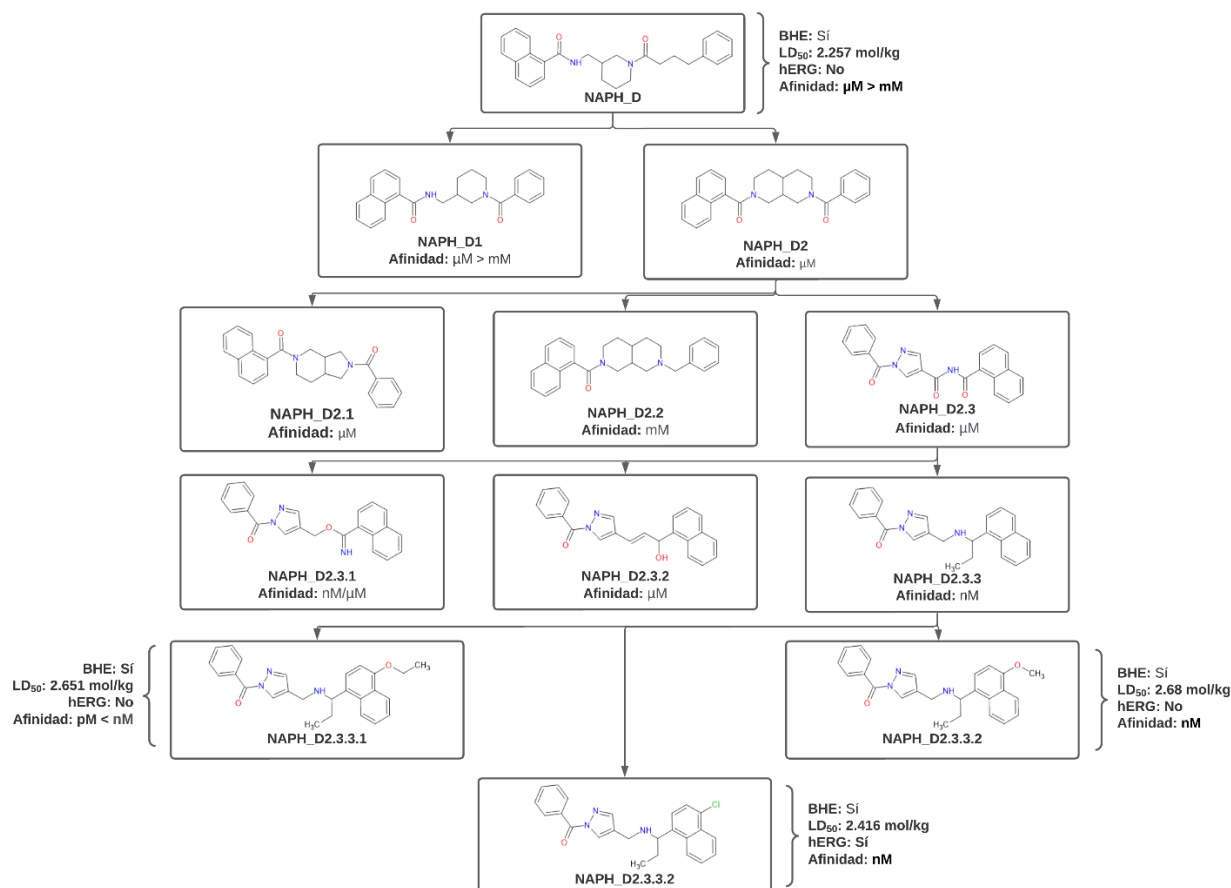


*Figura 19. Diagrama de interacciones 2D para NAPH\_AD optimizado.*

#### 6.4.1.2 DOCK6

A diferencia de AutoDock, DOCK6 ubica a NAPH de forma contraria, es decir, el anillo de naftaleno apuntando hacia el fondo del bolsillo y el de fenilo hacia la entrada. Esta pose no ubica la totalidad de la molécula dentro del bolsillo, dejando un espacio libre de gran tamaño en el fondo del bolsillo y el fenilo fuera de la proteína, haciendo interacciones hidrofóbicas débiles con los aminoácidos ubicados fuera del bolsillo. La optimización se abordó desde la necesidad de que el

anillo de fenilo se encontrara dentro del bolsillo, en la figura 20 se muestra la ruta de optimización para NAPH\_D que se siguió para conseguirlo.

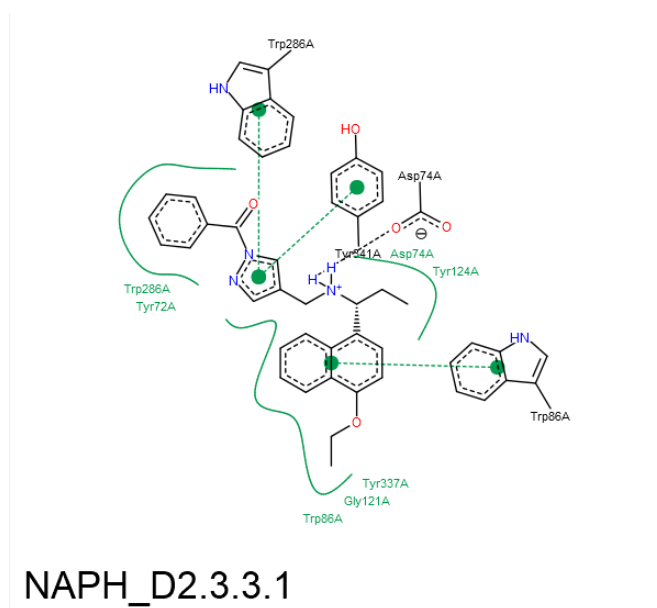


**Figura 20.** Ruta de optimización para NAPH\_D.

En las series NAPH\_D1 y NAPH\_D2, se eliminaron tres carbonos para permitir que el fenilo quedara dentro del bolsillo catalítico. Además, se buscó aumentar la cantidad de átomos capaces de interactuar dentro del bolsillo catalítico con interacciones hidrofóbicas, proponiendo rigidificar la estructura formando una decahidro[2,7]naftiridina como *scaffold* de la molécula. Este cambio mejoró la afinidad, y a partir de aquí se propusieron análogos. NAPH\_D2.3 fue sugerido por SeeSAR como un cambio de *scaffold* con mejor afinidad que las demás estructuras propuestas.

NAPH2.3.3 permitió observar que el cambio del carbonilo por un grupo etilo permitía una mejor ocupación del espacio vacío y la formación de interacciones hidrofóbicas, por lo que se mantuvo este cambio. A partir de este, se propusieron tres análogos con un sustituyente distinto en la posición 4 del naftaleno para evaluar cuál de ellos ocupaba mejor este espacio vacío. Se observó una mejor afinidad con el etoxilo en comparación con el metoxilo, y la sustitución con cloro resultó en una molécula con propiedades inhibitorias sobre hERG I.

En la figura 21, se observa el diagrama de interacciones para NAPH\_D2.3.3.1. La reducción de la cadena carbonada permitió que el fenilo se ubicara dentro del bolsillo catalítico, pero no se lograron interacciones de apilamiento  $\pi$  con aminoácidos aromáticos. Por el contrario, estas interacciones se observaron con el pirazol. Además, se permitió la formación de un nuevo puente de hidrógeno y la mejor ocupación de espacios con interacciones hidrofóbicas. NAPH2.3.3.1 mostró una afinidad en el rango pM a nM, penetración de la BHE, no inhibición de hERG I y un LD<sub>50</sub> mayor al de NAPH, aunque inferior pero cercano al de DNP.



**Figura 21.** Diagrama de interacciones 2D para NAPH\_D optimizado.

### 6.4.1.3 Vina

En la pose original de Vina, similar a AutoDock, el fenilo se encuentra en el fondo del bolsillo. La cadena carbonada larga permite que el fenilo interactúe con aminoácidos aromáticos ubicados en el fondo del bolsillo. En NAPH\_V1, se acortó la cadena carbonada con el fin de explorar otras zonas del sitio activo, fusionando el fenilo con un ciclo pentano sustituido con una metilamina. Esto permitió formar puentes de hidrógeno con la amina.

Debido a la contribución negativa de afinidad del carbonilo que une al fenilo con la piperidina, en la serie NAPH\_V1.1, NAPH\_V1.2 y NAPH\_1.3 se decidió sustituirlo o eliminarlo. Resultó que la mejor opción era reemplazarlo por un metilo, lo que aumentó la afinidad hasta el rango de  $\mu$ M. Luego, se eliminó la piperidina, permitiendo la flexibilidad de la cadena carbonada y una mejor acomodación dentro del bolsillo, disminuyendo los choques estéricos intra e intermoleculares. La adición de un metilo en NAPH\_V1.1.1.1 mejoró la afinidad mediante interacciones hidrofóbicas.

La adición de enlaces dobles se realizó con el objetivo de mejorar la torsión de la molécula, logrando el estado óptimo y una mayor afinidad con NAPH\_V1.1.1.1.3. Finalmente, la

introducción de un átomo de cloro permitió mejorar la afinidad mediante la ocupación de espacio vacío en la entrada del bolsillo catalítico.

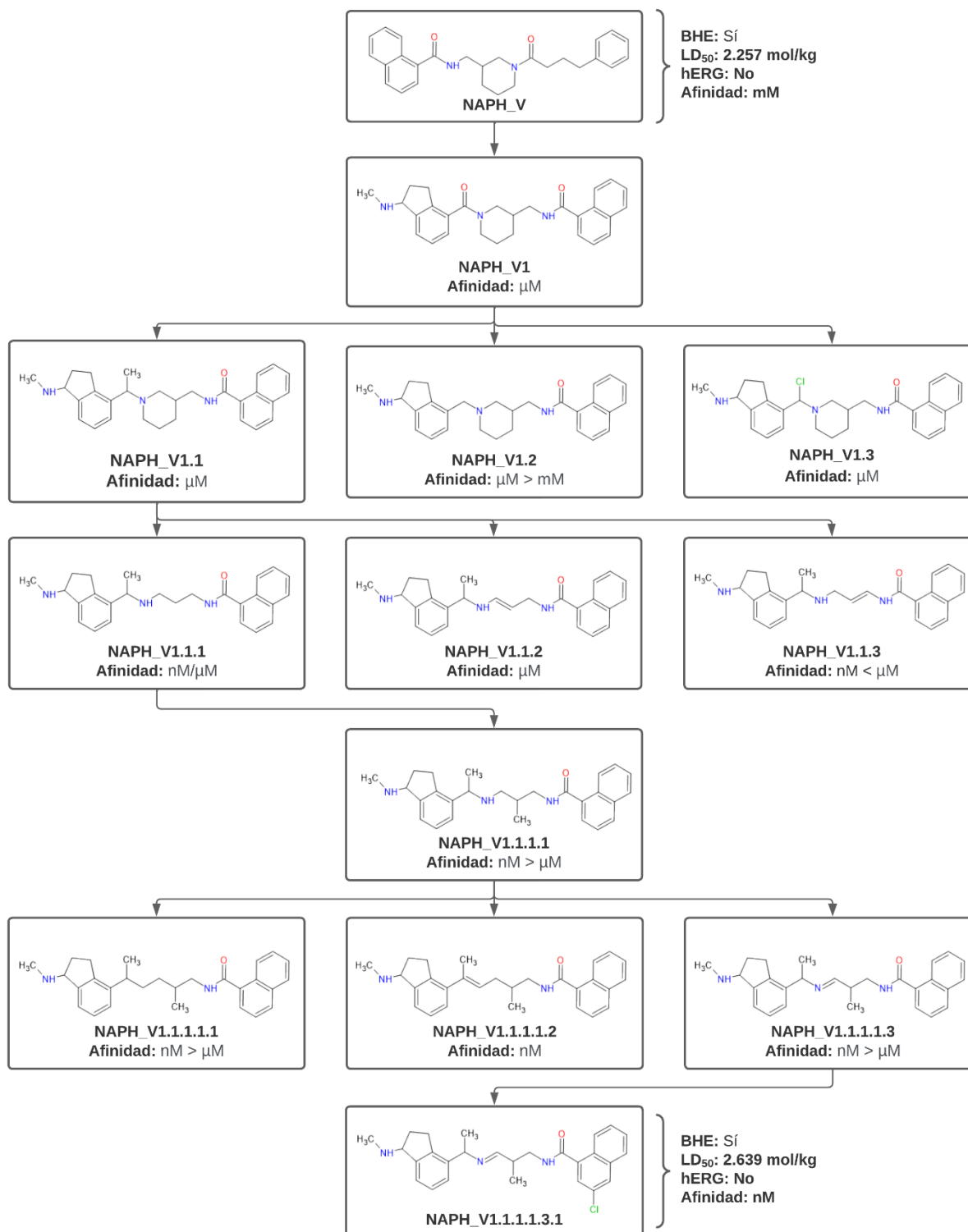


Figura 22. Ruta de optimización para NAPH\_V.

Como se observa en la figura 23, NAPH\_V1.1.1.1.3.1 presentó un puente de hidrógeno adicional en comparación con NAPH\_V, aunque perdió las interacciones de apilamiento  $\pi$  en el extremo del fenilo. A pesar de ello, exhibió una afinidad del orden de nM, permeación de la BHE, no inhibición de hERG I y un LD<sub>50</sub> superior al de NAPH, siendo similar al del DNP sin superarlo.

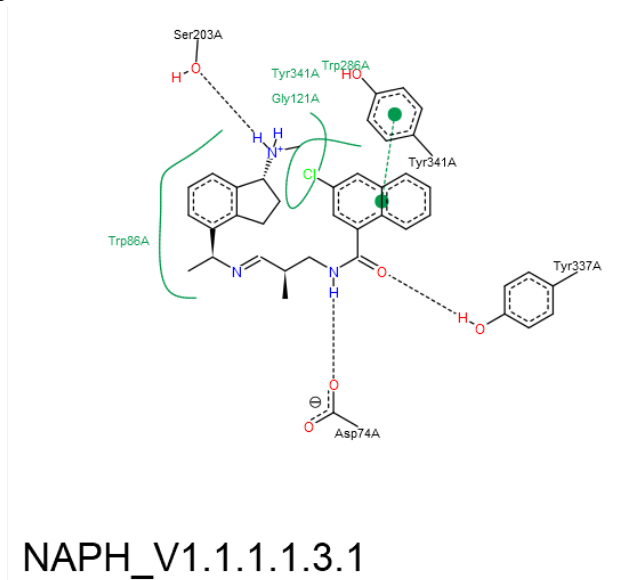


Figura 23. Diagrama de interacciones 2D para NAPH\_V optimizado.

#### 6.4.1.4 Flare

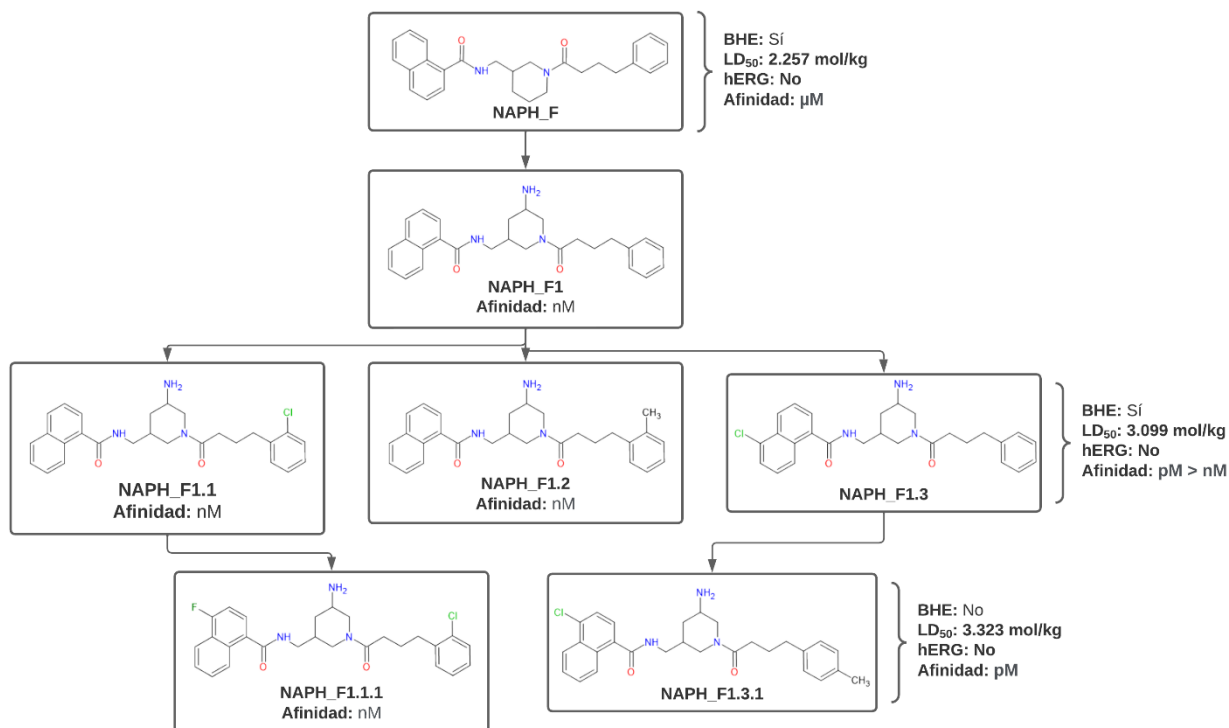
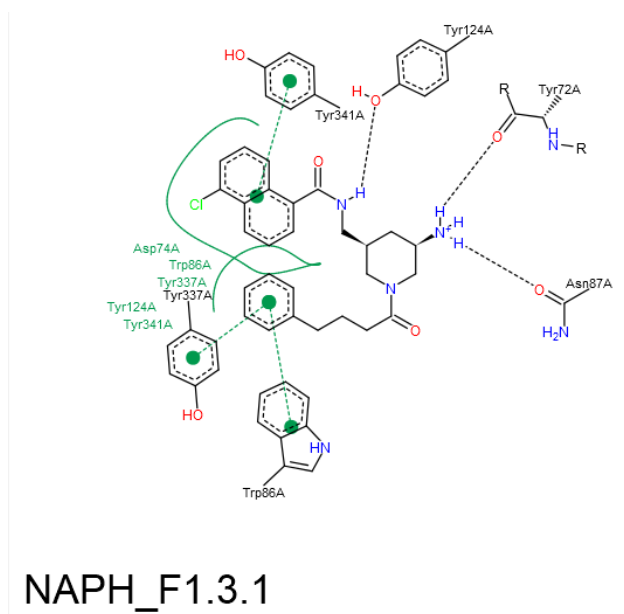


Figura 24. Ruta de optimización para NAPH\_F.

De todas las poses optimizadas, NAPH\_F fue la que guardó mayor similitud con la estructura de partida. En la primera etapa de la optimización, se buscaron análogos con SeeSAR que mejoraran la actividad, y el más destacado fue agregar una amina al anillo de piperidina, mejorando la afinidad de  $\mu\text{M}$  a  $\text{nM}$  (NAPH\_F1). Luego, se evaluaron diversas sustituciones en los anillos aromáticos de ambos extremos, y el que presentó la mejor afinidad fue NAPH\_F1.3. A pesar de ello, también se exploraron análogos de NAPH\_F1.1.

A partir de NAPH\_F1.3, se añadió un metilo en posición para con respecto a la cadena alifática del fenilo, obteniendo un compuesto con afinidad en el rango de  $\text{pM}$ . Sin embargo, este compuesto no cruzó la BHE, aunque mostró un excelente valor de  $\text{LD}_{50}$ . Debido a los valores de  $w\text{LogP}$ , la única manera de que atravesara la BHE era eliminando carbonos. Por lo tanto, se decidió suprimir el metilo añadido y evaluar las propiedades farmacocinéticas y tóxicas de NAPH\_F1.3, obteniendo un compuesto con una afinidad ligeramente menor, en el rango de  $\text{pM}$  a  $\text{nM}$ , y un  $\text{LD}_{50}$  inferior al de NAPH\_F1.3.1, pero capaz de atravesar la BHE.



**Figura 25.** Diagrama de interacciones 2D para NAPH\_F optimizado.

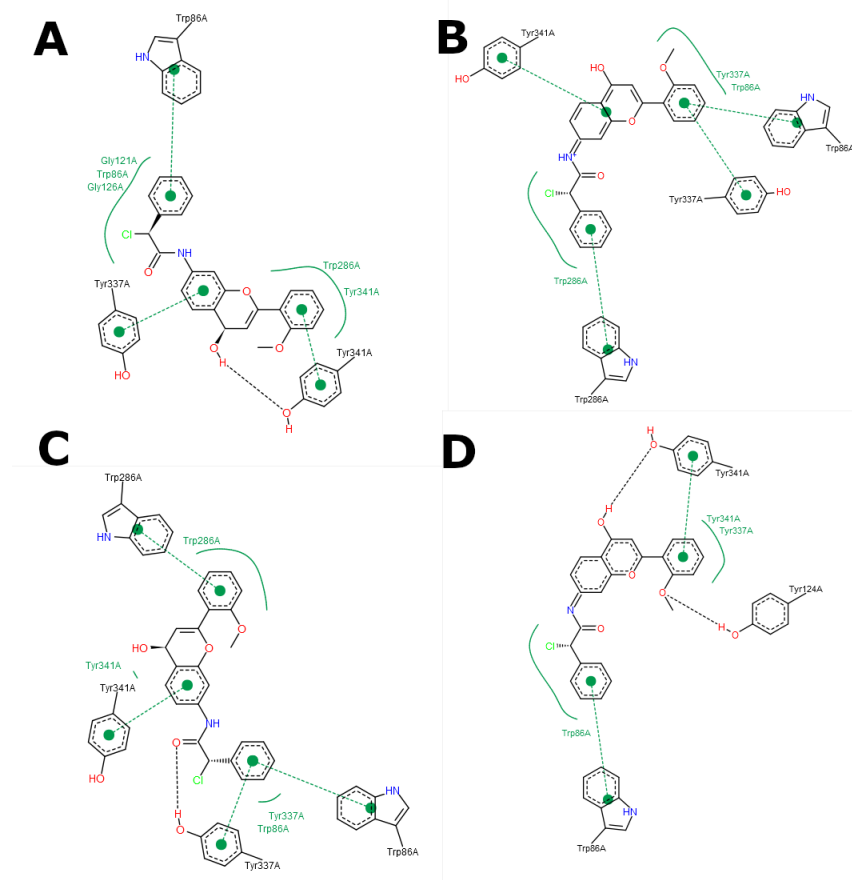
En la figura 25 se presentan las interacciones de NAPH\_F1.3 con AChE. Es relevante destacar que conserva todas las interacciones originales y añade un nuevo puente de hidrógeno con Tyr 72. A pesar de lo mencionado anteriormente, este análogo presenta un  $\text{LD}_{50}$  mayor que el DNP, lo que lo convierte en uno de los candidatos más prometedores de la ronda de optimización de NAPH.

Como resumen de la optimización de NAPH, se presenta la tabla 10, donde se muestran las propiedades farmacocinéticas y tóxicas evaluadas para los nuevos candidatos, así como la afinidad calculada por SeeSAR.

**Tabla 10.** Propiedades farmacocinéticas y tóxicas de las moléculas resultado de la optimización de NAPH.

NOMBRE	TOXICIDAD ORAL AGUDA EN RATA - LD <sub>50</sub> (mol/kg)	INHIBIDOR DE hERG I	AFINIDAD ESTIMADA POR HYDE			
			pM	nM	μM	mM
DNP	2.753	No				
NAPH_AD	2.257	No				
NAPH_AD 2.2.1.2.1	3.147	No				
NAPH_D	2.257	No				
NAPH_D 2.3.3.1	2.651	No				
NAPH_V	2.257	No				
NAPH_V 1.1.1.1.3.1	2.639	No				
NAPH_F	2.257	No				
NAPH_F1.3.1	3.099	No				

#### 6.4.2 Optimización de CHRO



**Figura 26.** Diagrama de interacciones 2D para los complejos CHRO – AChE. **A:** Pose obtenida por AutoDock. **B:** Pose obtenida por DOCK6. **C:** Pose obtenida por AutoDock Vina. **D:** Pose obtenida por Flare.

Al igual que en la optimización de NAPH, en la figura 26 se presentan los diagramas de interacciones de las poses propuestas en cada uno de los softwares para CHRO con el fin de hacer una comparación en cada apartado de las interacciones que se conservan y se pierden luego de la optimización.

### 6.4.2.1 AutoDock

Mediante las herramientas de SeeSAR, se realizó una búsqueda de fragmentos que permitieran el reemplazo de la porción fenilacetamida de CHRO (Figura 27). SeeSAR propuso la estructura CHRO\_AD1, que permitió un aumento de la afinidad y disminuyó los choques estéricos inter e intramoleculares. Se eliminó el cloro, se reemplazó el carbonilo por un metilo, ya que el carbonilo no aportaba interacciones importantes, y se sustituyó el anillo aromático de fenilo por uno de furano.

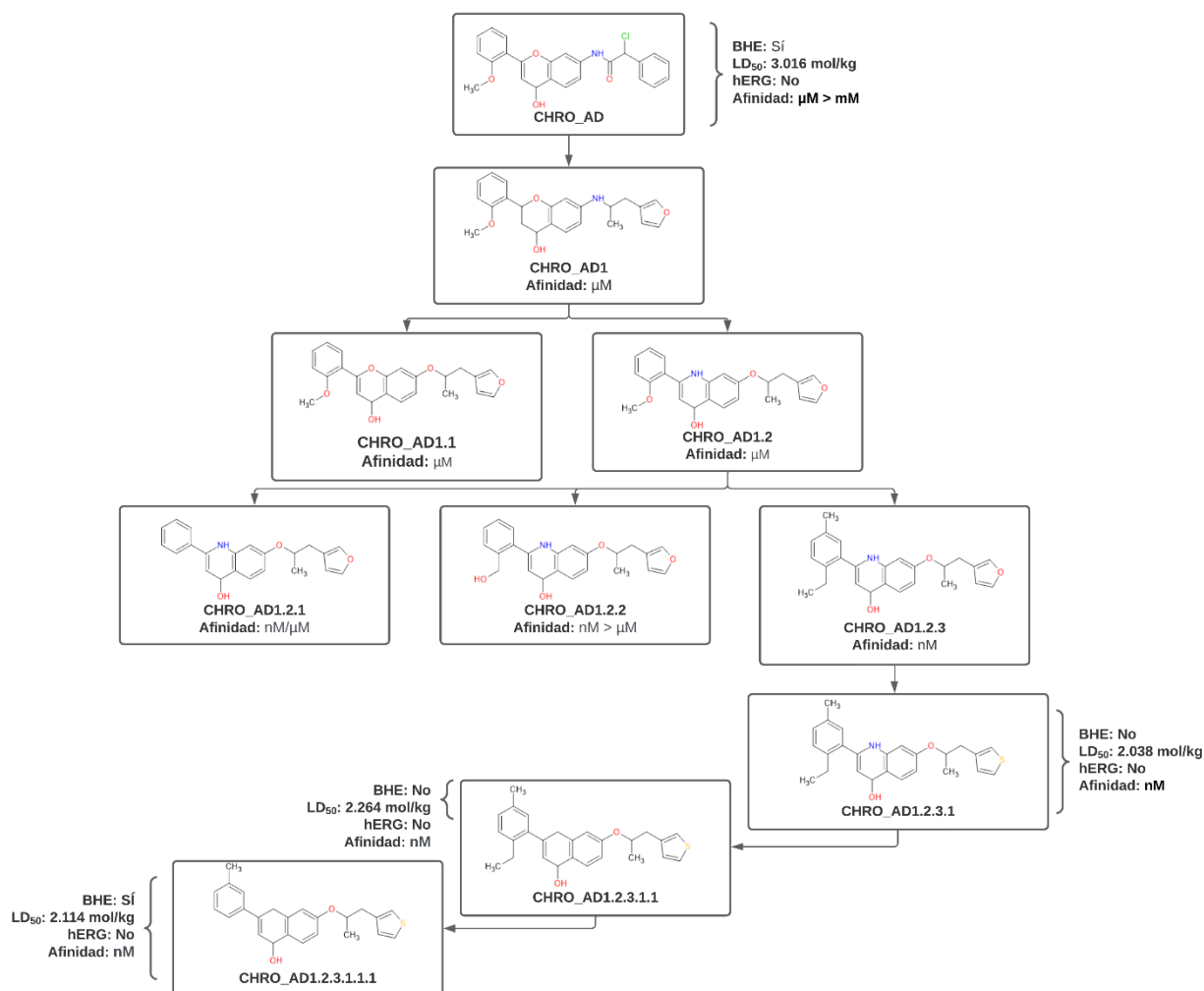
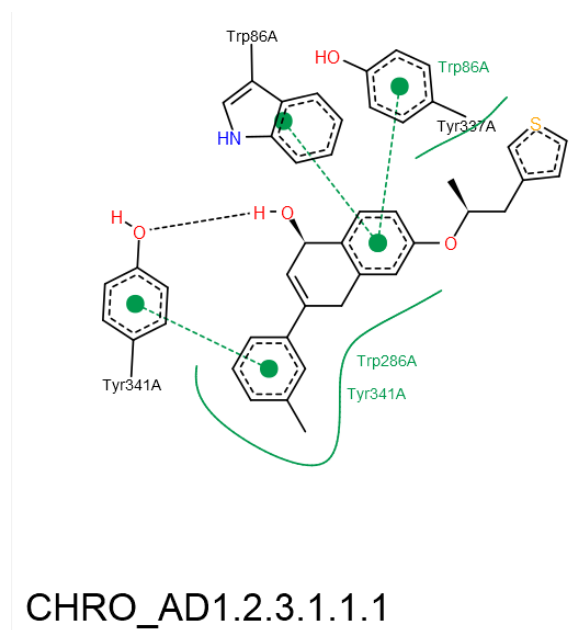


Figura 27. Ruta de optimización de para CHRO\_AD.

La sustitución del anillo fenilo restante resultó importante para la mejora en la afinidad. El patrón que muestra CHRO\_AD1.2.3 demostró la mayor afinidad al ocupar espacios vacíos e interactuar con porciones hidrofóbicas. A pesar de esto, se tuvo que restringir la adición de cadenas carbonadas a la molécula debido a la incapacidad para atravesar la BHE. Por esta razón, también se disminuyó la cantidad de átomos polares para reducir el TPSA, por lo que el nitrógeno añadido en CHRO\_AD1.2 tuvo que ser eliminado.

El cambio de furano a tiofeno responde a que el ángulo de enlace del azufre permite que los carbonos enlazados a él se separen aún más, logrando aumentar la afinidad y ocupar espacios vacíos.

CHRO\_AD1.2.3.1.1.1 no mostró propiedades tóxicas interesantes, ya que su LD<sub>50</sub> fue bastante bajo en comparación con el compuesto original y el DNP. A pesar de ello, resultó tener una afinidad equiparable a la del DNP y no ser un inhibidor de hERG I. En el diagrama de interacciones, se observa que no hay formación de interacciones relevantes nuevas, e incluso se pierde el apilamiento  $\pi$  del fenilo reemplazado por tiofeno. Debido a esto, se concluye que CHRO\_AD1.2.3.1.1.1 no representa una optimización exitosa y se prefiere CHRO por encima de este.

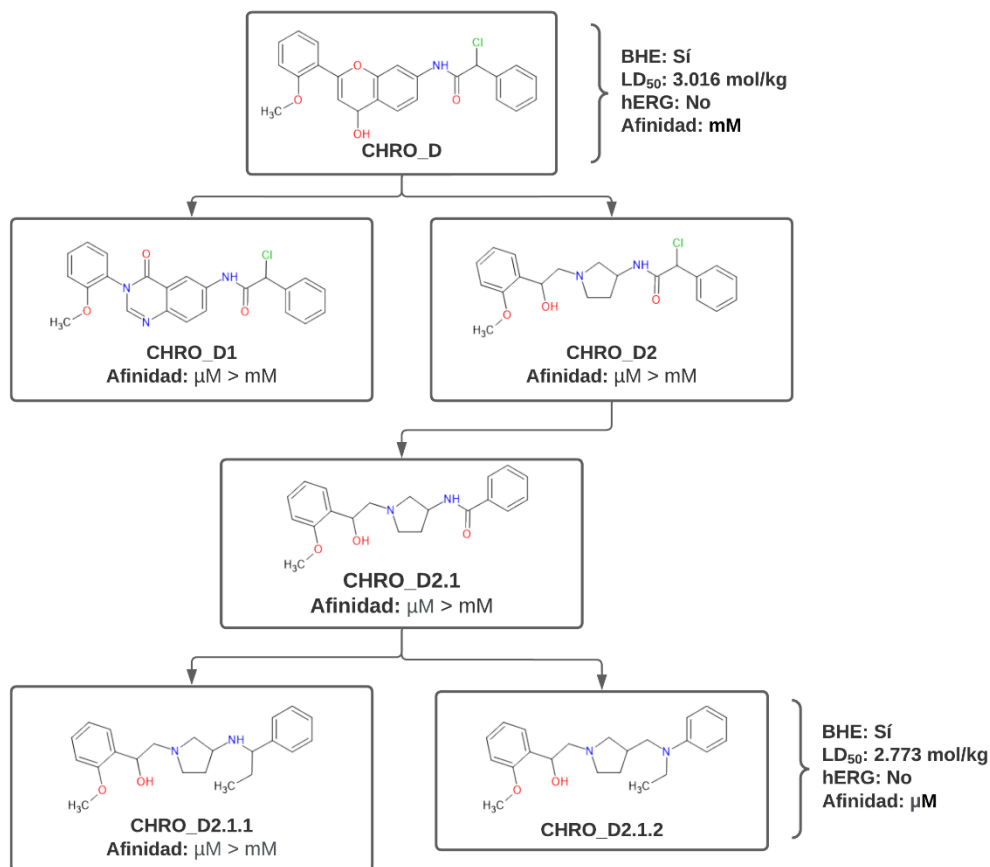


**Figura 28.** Diagrama de interacciones 2D para CHRO\_AD luego de la optimización.

#### 6.4.2.2 DOCK6

Debido a la pose rígida que propuso DOCK6, se buscó un cambio de scaffold con el fin de darle mayor movilidad a la molécula y mejorar las interacciones presentes. SeeSAR propuso CHRO\_D1 y CHRO\_D2, siendo esta última la que mayor flexibilidad aportó y, en consecuencia, una mayor afinidad. Al igual que lo ocurrido con NAPH\_D, el fenilo fue ubicado fuera del bolsillo, por lo que

se buscó acortar la cadena carbonada para tratar de que este se ubicara dentro del bolsillo, por eso se eliminó el carbono enlazado al halógeno (CHRO\_D2.1).



**Figura 29.** Ruta de optimización para CHRO\_D.

Por último, se añadió un etilo para ocupar espacios vacíos, y se evaluó en qué posición se comportaba mejor la amina, obteniendo CHRO\_D2.1.2. Esta estructura presentó penetración a la BHE, una afinidad menor a la del DNP, no inhibición de hERG I y un LD<sub>50</sub> menor a CHRO, pero superior, aunque similar al DNP.

En la figura 30 se presenta el diagrama de interacciones para CHRO\_D2.1.2. En comparación con CHRO\_D, hay pérdida de tres interacciones de apilamiento  $\pi$ , por lo que la actividad de la molécula podría verse comprometida si el modelo farmacofórico propuesto en este trabajo es correcto. Aun así, vale la pena observar si se pierde actividad al desaparecer las interacciones entre anillos aromáticos. A pesar de la pérdida de estas interacciones, aparecieron tres nuevos puntos de hidrógeno con Tyr 124, y nuevas interacciones hidrofóbicas.

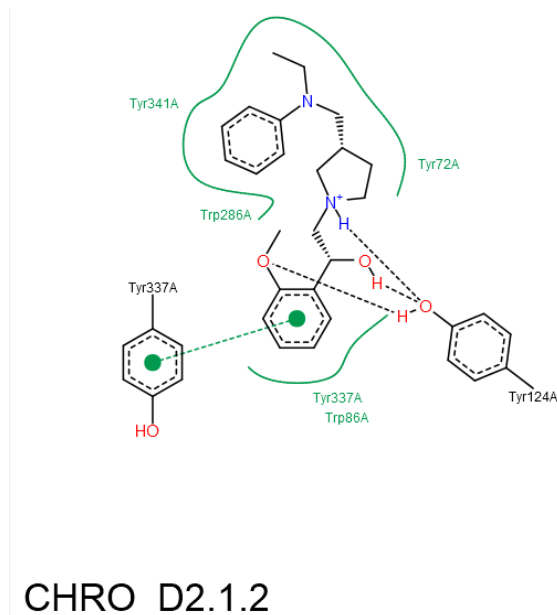


Figura 30. Diagrama de interacciones 2D para CHRO\_D optimizado.

### 6.4.2.3 Vina

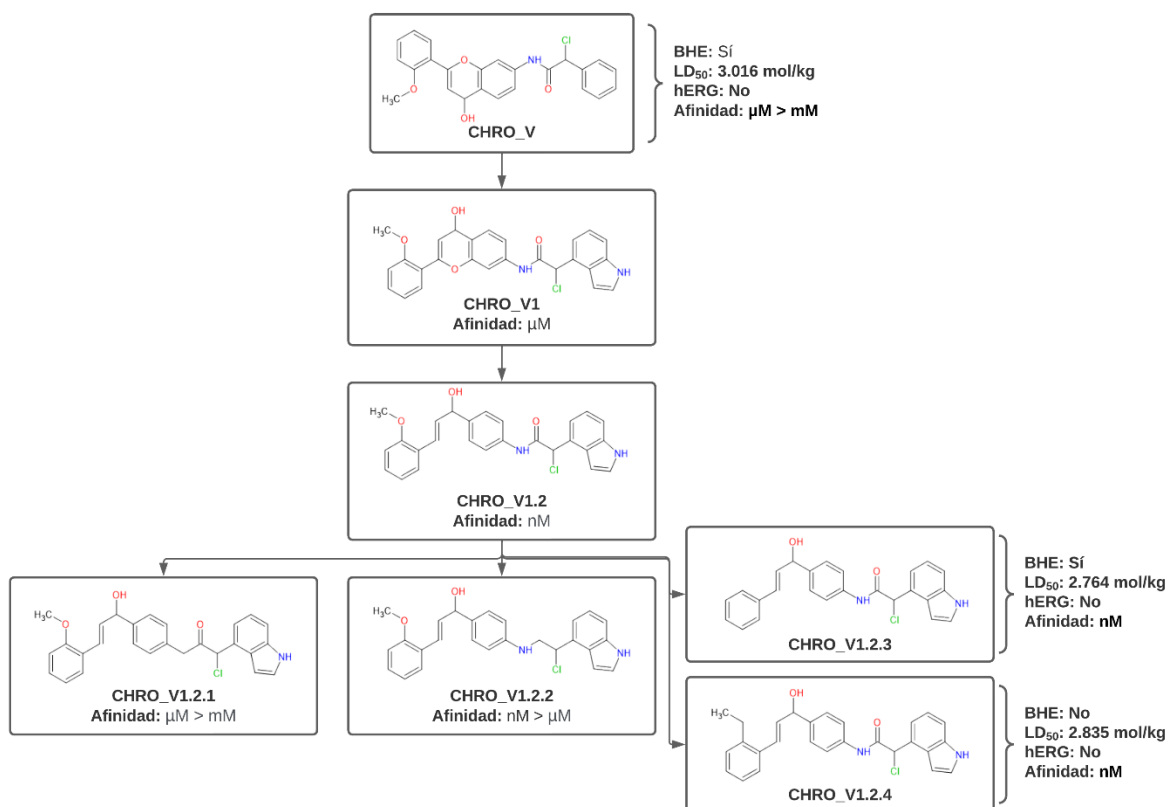


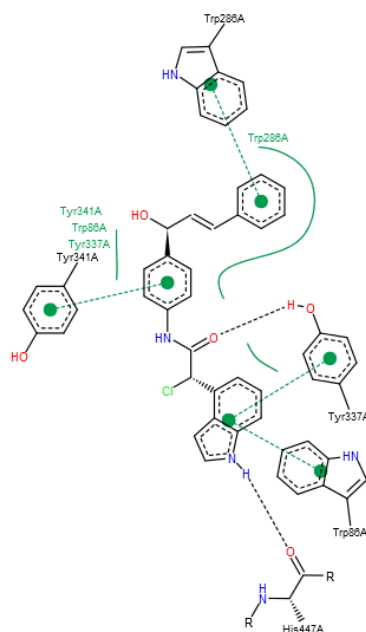
Figura 31. Ruta de optimización para CHRO\_V.

La optimización de CHRO\_V comenzó con el cambio del fenilo por indol. Debido a la posición del fenilo en el fondo del bolsillo catalítico, la adición de un anillo heteroaromático permitió tener

D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica

más interacciones de apilamiento  $\pi$  y la formación de un puente de hidrógeno, aumentando la afinidad al rango de  $\mu\text{M}$  (CHRO\_V1). A continuación, se hizo una apertura del anillo de oxano, eliminando el éter. Esto permitió aumentar la flexibilidad de la molécula, mejorando la afinidad a nM (CHRO\_V1.2).

En la serie CHRO\_V1.2.1 y CHRO\_V1.2.2, se eliminó tanto el nitrógeno como el carbonilo de la amida y se observó que la afinidad estimada disminuyó de forma importante, lo que indicó que este grupo funcional es importante para la actividad. Además, en la serie CHRO\_V1.2.3 y CHRO\_V1.2.4 se evaluó la importancia de la sustitución en el anillo fenilo. En CHRO\_V1.2.4, se reemplazó el metoxilo por un etilo en la posición orto; este cambio aumentó la afinidad a un rango nM, siendo esta la mayor afinidad encontrada. Al evaluar las propiedades farmacocinéticas, se observó que esta molécula no atraviesa la BHE, por lo que se tuvo que eliminar el etilo y sacrificar un poco la afinidad por la capacidad de atravesar la BHE (CHRO\_V1.2.3).



### CHRO\_V1.2.3

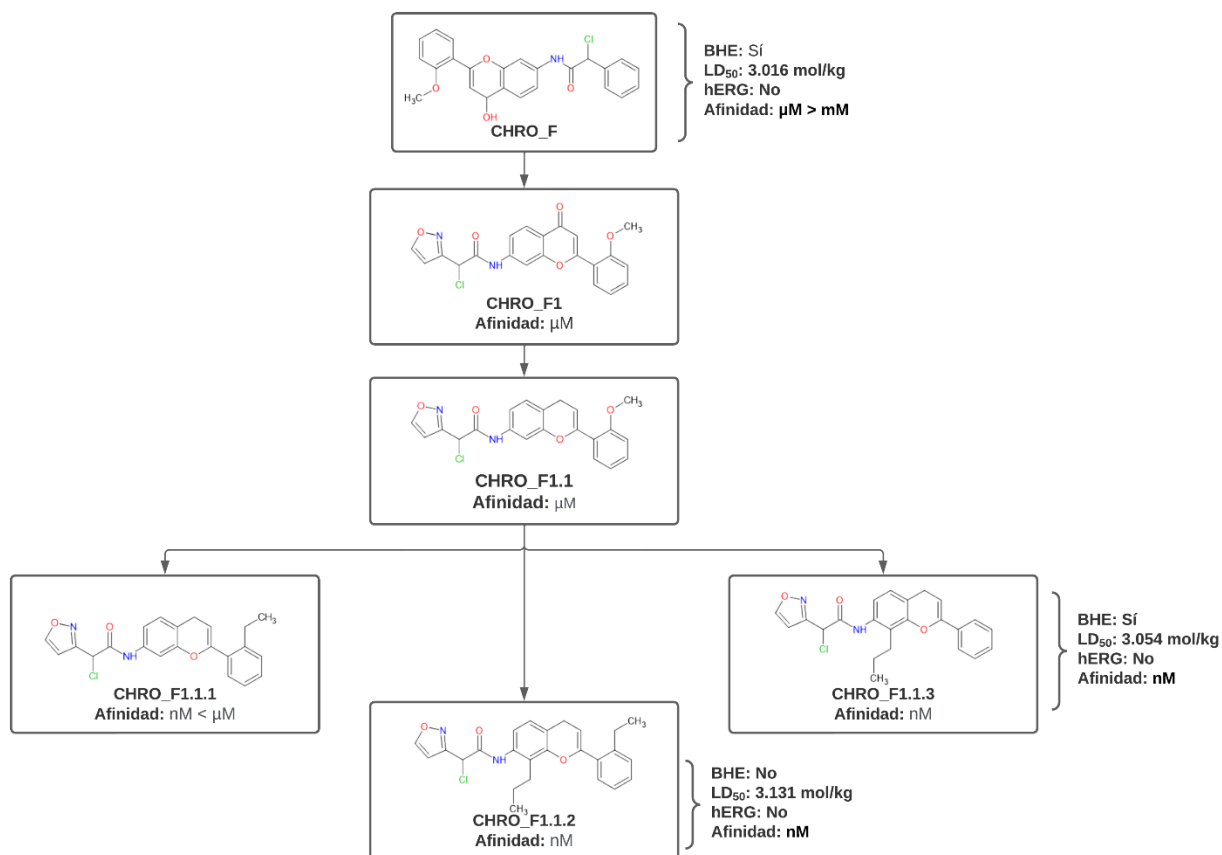
**Figura 32.** Diagrama de interacciones 2D para CHRO\_V optimizado.

En la figura 32 se observa el diagrama de interacciones para CHRO\_V1.2.3. Destaca que se conservan todas las interacciones presentes en CHRO\_V. Después de la optimización, se creó un nuevo puente de hidrógeno con His 447 y se obtuvo un mayor contacto hidrofóbico resultante de la apertura del anillo de oxano. CHRO\_V1.2.3 exhibió una afinidad en el rango nM y un  $\text{LD}_{50}$  menor que el de CHRO, pero mayor que el de DNP. Se perfila como un candidato interesante debido a la conservación de las interacciones presentes en CHRO\_V.

#### 6.4.2.4 Flare

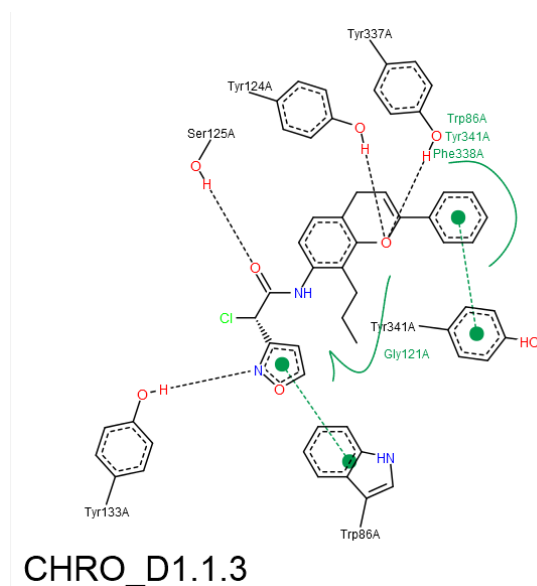
La optimización de CHRO\_F se llevó a cabo utilizando fragmentos que pudieran reemplazar el anillo de fenilo ubicado en el fondo del bolsillo catalítico. SeeSAR propuso un anillo de isoxazol

como reemplazo bioisostérico. Este cambio mejoró la afinidad debido a que conservó las interacciones ya presentes y, además, se formó un nuevo puente de hidrógeno entre el nitrógeno del anillo heterocíclico y la Tyr 133 (CHRO\_F1).



**Figura 33.** Ruta de optimización para CHRO\_F.

La eliminación del carbonilo en CHRO\_F1.1 mejoró la afinidad por el receptor debido a que la energía de desolvatación calculada para este átomo era positiva. A partir de este compuesto, se estudió el efecto de la sustitución de los anillos aromáticos con cadenas carbonadas. CHRO\_F1.1.1 permitió observar que reemplazar el metoxilo por un etilo mejoraba un poco la afinidad por interacciones hidrofóbicas. CHRO\_F1.1.3 hizo lo propio añadiendo una cadena de propilo al anillo aromático del núcleo de cromano; este cambio tuvo una mayor respuesta en la afinidad que CHRO\_F1.1.1. En CHRO\_F1.1.2 se probaron ambas sustituciones, encontrando un compuesto con mayor afinidad. Sin embargo, al evaluar las propiedades farmacocinéticas, se observó que había pérdida de la penetración a la BHE. Por lo tanto, se escogió a CHRO\_F1.1.3 como candidato optimizado.



**Figura 34.** Diagrama de interacciones 2D para CHRO\_F optimizado.

CHRO\_F1.1.3 mostró un LD<sub>50</sub> superior al de CHRO y, en consecuencia, mayor que el DNP. Además, demostró la capacidad de atravesar la BHE y no resultó ser un inhibidor de hERG I. En la figura 34 se observa el diagrama de interacciones. Las interacciones de apilamiento  $\pi$  se conservan, pero los puentes de hidrógeno resultaron modificados debido a la eliminación de dos aceptores, el carbonilo y el oxígeno del metoxilo. A pesar de la pérdida de estos dos puentes de hidrógeno, la nueva estructura promovió la formación de cuatro nuevos puentes de hidrógeno, tres de los cuales son con átomos también presentes en CHRO\_F. Además, se promovieron interacciones hidrofóbicas con la adición de cadenas carbonadas.

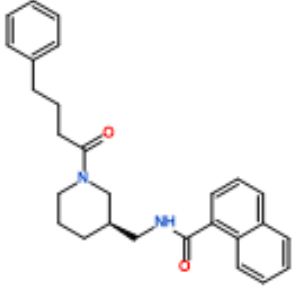
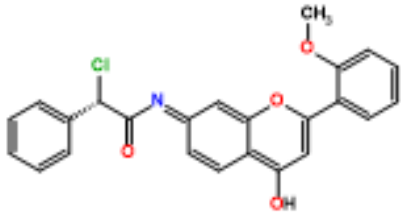
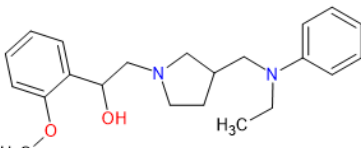
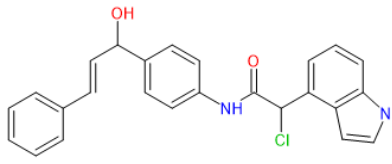
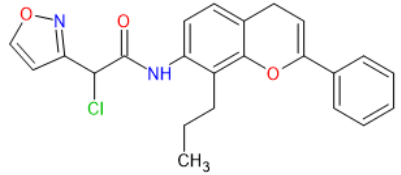
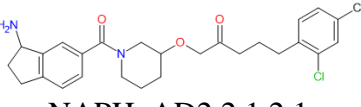
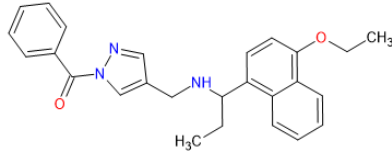
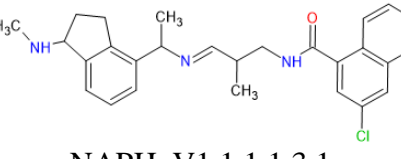
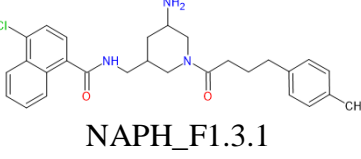
**Tabla 11.** Propiedades farmacocinéticas y tóxicas de las moléculas resultado de la optimización de CHRO.

NOMBRE	TOXICIDAD ORAL AGUDA EN RATA - LD <sub>50</sub> (mol/kg)	INHIBIDOR DE hERG I	AFINIDAD ESTIMADA POR HYDE			
			pM	nM	$\mu$ M	mM
DNP	2.753	No				
CHRO_AD	3.016	No				
CHRO_AD 1.2.3.1.1.1	2.131	No				
CHRO_D	3.016	No				
CHRO_D 2.1.2	2.773	No				
CHRO_V	3.016	No				
CHRO_V 1.2.3	2.764	No				
CHRO_F	3.016	No				
CHRO_F 1.1.3	3.054	No				

En la tabla 11 se resumen las propiedades toxicas y farmacocinéticas de las moléculas optimizadas a partir de las poses obtenidas para CHRO. A diferencia de NAPH las moléculas obtenidas no exhibieron un gran aumento en la afinidad en comparación con el DNP, pero presentaron propiedades toxicas bastante similares a este, a excepción de CHRO\_AD1.2.3.1.1.1 que tuvo un LD<sub>50</sub> inferior.

En resumen, la optimización de NAPH y CHRO dio como resultado siete moléculas que cumplen con la penetración de la BHE, la no inhibición de hERG I y una LD<sub>50</sub> en rata similar o mejor a la del DNP. Adicionalmente a estas siete moléculas, se deben añadir las dos moléculas usadas como molécula base para la optimización para sumar un total de nueve moléculas prometedoras para la inhibición de AChE. En la tabla 12 se muestran las estructuras de las moléculas escogidas como inhibidores prometedores de AChE con potencial aplicación en terapéutica.

**Tabla 12.** Estructuras de las moléculas propuestas como inhibidores de AChE con aplicación en terapéutica.

 <p style="text-align: center;">NAPH</p>	 <p style="text-align: center;">CHRO</p>	 <p style="text-align: center;">CHRO_D2.1.2</p>
 <p style="text-align: center;">CHRO_V1.2.3</p>	 <p style="text-align: center;">CHRO_F1.1.3</p>	 <p style="text-align: center;">NAPH_AD2.2.1.2.1</p>
 <p style="text-align: center;">NAPH_D2.3.3.1</p>	 <p style="text-align: center;">NAPH_V1.1.1.1.3.1</p>	 <p style="text-align: center;">NAPH_F1.3.1</p>

## **7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Se evaluaron las características en la literatura de los actuales medicamentos inhibidores de la acetilcolinesterasa para el tratamiento del Alzheimer. Se identificaron cuatro moléculas, de las cuales actualmente solo tres son utilizadas para este fin: donepezilo, galantamina y rivastigmina. Adicionalmente, la información encontrada sobre estos medicamentos en la literatura hace palpable la necesidad de desarrollar nuevas moléculas inhibidoras de acetilcolinesterasa con propiedades farmacocinéticas y tóxicas favorables para los usuarios de estos fármacos, facilitando la posología y evitando efectos secundarios.

A través de herramientas computacionales se llevó a cabo el análisis y la construcción de un modelo farmacofórico para inhibidores de acetilcolinesterasa, arrojando, al usarlo como filtro de búsqueda 110 moléculas. Mediante los estudios de docking se evidenció que el 72.7% de las moléculas presentaron una mejor energía de afinidad que el donepezilo.

A través de evaluaciones farmacocinéticas se eligieron dos moléculas con una alta energía de unión para ser optimizadas por medio de SeeSAR. La optimización posibilitó la obtención de siete moléculas con propiedades farmacocinéticas favorables, una afinidad elevada por el receptor y características toxicológicas ventajosas, es decir, ausencia de inhibición de hERG I y LD<sub>50</sub> en ratas mayor o similar al donepezilo. Adicionalmente, la evaluación de propiedades tóxicas de NAPH y CHRO permitieron ser postuladas como candidatos prometedores en la inhibición de acetilcolinesterasa.

### **7.1 Recomendaciones**

Se recomienda que para futuros estudios se aborde el análisis de las moléculas restantes que mostraron una mayor afinidad que el donepezilo y que no fueron consideradas en la etapa de optimización del presente proyecto. Así mismo, se sugiere dar continuidad al estudio con la síntesis y realización de pruebas biológicas de los nueve compuestos obtenidos como candidatos en el presente trabajo.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. D. S. Knopman, H. Amieva, R. C. Petersen, G. Chételat, D. M. Holtzman, B. T. Hyman, R. A. Nixon, D. T. Jones, Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* **7**, 33 (2021).
2. R. Poduri, “Historical Perspective of Drug Discovery and Development” in *Drug Discovery and Development: From Targets and Molecules to Medicines*, R. Poduri, Ed. (Springer Singapore, Singapore, 2021; [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5534-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5534-3_1)), pp. 1–10.
3. A. Vargas, M. López, C. Lillo, M. J. Vargas, El papiro de Edwin Smith y su trascendencia médica y odontológica. *Rev Med Chil* **140**, 1357–1362 (2012).
4. K. Danao, D. Nandurkar, V. Rokde, R. Shivhare, U. Mahajan, “Molecular Docking: Metamorphosis in Drug Discovery” in *Molecular Docking*, E. S. Istifli, Ed. (IntechOpen, Rijeka, 2022; <https://doi.org/10.5772/intechopen.105972>), p. Ch. 3.
5. H. Zheng, J. Hou, M. D. Zimmerman, A. Wlodawer, W. Minor, The future of crystallography in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **9**, 125–137 (2014).
6. I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge, T. E. Ferrin, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* **161**, 269–288 (1982).
7. F. Stanzione, I. Giangreco, J. C. Cole, “Chapter Four - Use of molecular docking computational tools in drug discovery” in *Progress in Medicinal Chemistry*, D. R. Witty, B. Cox, Eds. (Elsevier, 2021; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079646821000047>)vol. 60, pp. 273–343.
8. V. Salmaso, S. Moro, Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front Pharmacol* **9** (2018).
9. X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, “Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery” (2011).
10. R. L. DesJarlais, R. P. Sheridan, J. S. Dixon, I. D. Kuntz, R. Venkataraghavan, Docking flexible ligands to macromolecular receptors by molecular shape. *J Med Chem* **29**, 2149–2153 (1986).
11. C. G. Wermuth, C. R. Ganellin, P. Lindberg, L. A. Mitscher, Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **70**, 1129–1143 (1998).
12. J. H. Van Drie, History of 3D pharmacophore searching: commercial, academic and open-source tools. *Drug Discov Today Technol* **7**, e255–e262 (2010).
13. T. Seidel, D. A. Schuetz, A. Garon, T. Langer, “The Pharmacophore Concept and Its Applications in Computer-Aided Drug Design” in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 110: Cheminformatics in Natural Product Research*, A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi, Y. Asakawa, J.-K. Liu, Eds. (Springer International Publishing, Cham, 2019; [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14632-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14632-0_4)), pp. 99–141.
14. H. D. Yang, D. H. Kim, S. B. Lee, L. D. Young, History of Alzheimer’s Disease. *Dement Neurocogn Disord* **15**, 115–121 (2016).
15. Z. Arvanitakis, R. C. Shah, D. A. Bennett, Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA* **322**, 1589–1599 (2019).

- D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica
16. Z. Breijyeh, R. Karaman, Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **25** (2020).
  17. D. Röhr, B. D. C. Boon, M. Schuler, K. Kremer, J. J. M. Hoozemans, F. H. Bouwman, S. F. El-Mashtoly, A. Nabers, F. Großerueschkamp, A. J. M. Rozemuller, K. Gerwert, Label-free vibrational imaging of different A $\beta$  plaque types in Alzheimer's disease reveals sequential events in plaque development. *Acta Neuropathol Commun* **8**, 222 (2020).
  18. A. Trang, P. B. Khandhar, "Physiology, Acetylcholinesterase" in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969557>).
  19. S. Brimijoin, Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: Nature, localization and dynamics. *Prog Neurobiol* **21**, 291–322 (1983).
  20. K. V Dileep, K. Ihara, C. Mishima-Tsumagari, M. Kukimoto-Niino, M. Yonemochi, K. Hanada, M. Shirouzu, K. Y. J. Zhang, Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with tacrine: Implications for drug discovery. *Int J Biol Macromol* **210**, 172–181 (2022).
  21. D. De Boer, N. Nguyen, J. Mao, J. Moore, E. J. Sorin, A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules* **11** (2021).
  22. O. Jbilo, C. F. Bartels, A. Chatonnet, J.-P. Toutant, O. Lockridge, Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. *Toxicon* **32**, 1445–1457 (1994).
  23. G. Marucci, M. Buccioni, D. D. Ben, C. Lambertucci, R. Volpini, F. Amenta, Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **190**, 108352 (2021).
  24. N. Gul, S. Ahmad, H. Ahmad, A. Aziz, M. Almehmadi, A. Amer Alsaiari, M. Allahyani, Zainab, S. Adnan Ali Shah, N. Ur Rahman, M. Ahmad, New acetylcholinesterase inhibitors isolated from *Delphinium uncinatum*. *Arabian Journal of Chemistry* **16**, 104408 (2023).
  25. A. C. Gade, M. Murahari, P. Pavadai, M. S. Kumar, Virtual Screening of a Marine Natural Product Database for In Silico Identification of a Potential Acetylcholinesterase Inhibitor. *Life* **13** (2023).
  26. M. Atanasova, I. Dimitrov, S. Ivanov, B. Georgiev, S. Berkov, D. Zheleva-Dimitrova, I. Doytchinova, Virtual Screening and Hit Selection of Natural Compounds as Acetylcholinesterase Inhibitors. *Molecules* **27** (2022).
  27. K. El Khatabi, R. El-Mernissi, I. Aanouz, M. A. Ajana, T. Lakhlifi, A. Khan, D.-Q. Wei, M. Bouachrine, Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors through 3D-QSAR, molecular docking, and molecular dynamics simulation targeting Alzheimer's disease. *J Mol Model* **27**, 302 (2021).
  28. K. M. Targowska-Duda, M. Maj, P. Drączkowski, B. Budzyńska, A. Boguszevska-Czubara, T. M. Wróbel, T. Laitinen, P. Kaczmar, A. Poso, A. A. Kaczor, WaterMap-Guided Structure-Based Virtual Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors. *ChemMedChem* **17**, e202100721 (2022).

- D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica
29. B. David, P. Schneider, P. Schäfer, J. Pietruszka, H. Gohlke, Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: virtual screening and in vitro characterisation. *J Enzyme Inhib Med Chem* **36**, 491–496 (2021).
  30. M. I. Khan, P. Taehwan, Y. Cho, M. Scotti, R. Priscila Barros de Menezes, F. M. Husain, S. Y. Alomar, M. H. Baig, J.-J. Dong, Discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors through integration of machine learning with genetic algorithm based in silico screening approaches. *Front Neurosci* **16** (2023).
  31. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
  32. BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio 2021. Dassault Systèmes 21.1.0.20298 [Preprint] (2020).
  33. N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, G. R. Hutchison, Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform* **3**, 33 (2011).
  34. M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* **4**, 17 (2012).
  35. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785–2791 (2009).
  36. M. F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development. *Journal of molecular graphics & modelling* **17**, 57–61 (1999).
  37. J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, S. Forli, AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model* **61**, 3891–3898 (2021).
  38. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **31**, 455–461 (2010).
  39. W. J. Allen, B. C. Fochtman, T. E. Balius, R. C. Rizzo, Customizable de novo design strategies for DOCK: Application to HIVgp41 and other therapeutic targets. *J Comput Chem* **38**, 2641–2663 (2017).
  40. W. J. Allen, T. E. Balius, S. Mukherjee, S. R. Brozell, D. T. Moustakas, P. T. Lang, D. A. Case, I. D. Kuntz, R. C. Rizzo, DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *J Comput Chem* **36**, 1132–1156 (2015).
  41. S. Forli, R. Huey, M. E. Pique, M. F. Sanner, D. S. Goodsell, A. J. Olson, Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc* **11**, 905–919 (2016).
  42. D. R. Koes, C. J. Camacho, ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res* **40**, W409–W414 (2012).
  43. Cheeseright T., Mackey M., Rose S., Vinter A., Flare™. Cresset® 7.2.0 [Preprint].

- D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica
44. T. Cheeseright, M. Mackey, S. Rose, A. Vinter, Molecular Field Extrema as Descriptors of Biological Activity: Definition and Validation. *J Chem Inf Model* **46**, 665–676 (2006).
  45. M. R. Bauer, M. D. Mackey, Electrostatic Complementarity as a Fast and Effective Tool to Optimize Binding and Selectivity of Protein–Ligand Complexes. *J Med Chem* **62**, 3036–3050 (2019).
  46. M. Kuhn, S. Firth-Clark, P. Tosco, A. S. J. S. Mey, M. Mackey, J. Michel, Assessment of Binding Affinity via Alchemical Free-Energy Calculations. *J Chem Inf Model* **60**, 3120–3130 (2020).
  47. A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* **7**, 42717 (2017).
  48. BioSolveIT GmbH, SeeSAR. BioSolveIT GmbH 13.0.4 [Preprint] (2023).
  49. D. E. V Pires, T. L. Blundell, D. B. Ascher, pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem* **58**, 4066–4072 (2015).
  50. K. Stierand, M. Rarey, From Modeling to Medicinal Chemistry: Automatic Generation of Two-Dimensional Complex Diagrams. *ChemMedChem* **2**, 853–860 (2007).
  51. K. Stierand, M. Rarey, Drawing the PDB: Protein–Ligand Complexes in Two Dimensions. *ACS Med Chem Lett* **1**, 540–545 (2010).
  52. Advanced Chemistry Development, ChemSketch. Inc. (ACD/Labs) 2021.2.0 [Preprint] (2021).
  53. J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin, J. J. Height, Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J Med Chem* **55**, 10282–10286 (2012).
  54. A. Oda, K. Tsuchida, T. Takakura, N. Yamaotsu, S. Hirono, Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein–Ligand Complexes. *J Chem Inf Model* **46**, 380–391 (2006).
  55. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* **23** (1997) 3–25.1. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 3–26 (2001).
  56. A. Daina, V. Zoete, A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* **11**, 1117–1121 (2016).
  57. T. Holyoak, “Molecular Recognition: Lock-and-Key, Induced Fit, and Conformational Selection” in *Encyclopedia of Biophysics*, G. C. K. Roberts, Ed. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013; [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6\\_468](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_468)), pp. 1584–1588.
  58. J. Baxter, Local Optima Avoidance in Depot Location. *Journal of the Operational Research Society* **32**, 815–819 (1981).

- D.A. Silva-Valero. 2023. Diseño basado en el receptor, cribado virtual y estudios de docking molecular de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa humana con potencial aplicación terapéutica
59. O. V Stroganov, F. N. Novikov, V. S. Stroylov, V. Kulkov, G. G. Chilov, Lead Finder: An Approach To Improve Accuracy of Protein–Ligand Docking, Binding Energy Estimation, and Virtual Screening. *J Chem Inf Model* **48**, 2371–2385 (2008).
  60. G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* **19**, 1639–1662 (1998).
  61. I. Moriguchi, S. Hirono, Q. Liu, I. Nakagome, Y. Matsishita, Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **40**, 127–130 (1992).