

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



“Evaluación *in silico* de actividad antiviral y propiedades farmacocinéticas de nuevos inhibidores alostéricos de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika”

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Ana María Juárez Marckwordt
para optar al grado académico de Licenciada en Química

Guatemala,
2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

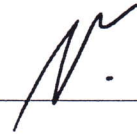


“Evaluación *in silico* de actividad antiviral y propiedades farmacocinéticas de nuevos inhibidores alostéricos de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika”

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Ana María Juárez Marckwordt
para optar al grado académico de Licenciada en Química


Guatemala,
2021

Vo.Bo.:

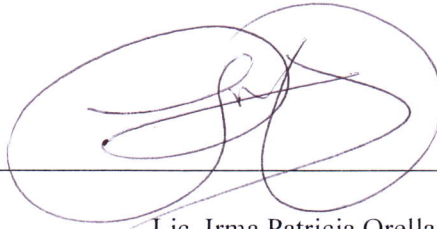


Lic. Allan Ronaldo Vásquez Bolaños

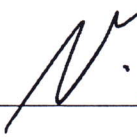
Tribunal Examinador:



Lic. Angel César Ramírez Sandoval



Lic. Irma Patricia Orellana Catalán



Lic. Allan Ronaldo Vásquez Bolaños

Fecha de aprobación:

Guatemala, 8 de diciembre de 2021

PREFACIO

Este trabajo me enseñó muchísimas cosas, tanto sobre el tema que aquí se expone, como de el esfuerzo, la disciplina y la vida en general. Requirió un esfuerzo personal muy grande, pero me enseñó que se puede alcanzar cualquier meta si se tienen las ganas y la confianza en uno mismo.

Dentro del área universitaria quiero agradecer al Lic. Allan Vásquez, por haberme acompañado y asesorado en este proceso con paciencia y entusiasmo. También quiero agradecerle a la Lic. Irma Orellana, por estar dispuesta en ayudarme y apoyarme en mi investigación. Finalmente quiero agradecerle a Vilma Álvarez y al Lic. Ángel Ramírez, por darme ánimos y empujarme a terminar mi trabajo cuando yo tuve dudas acerca de mis capacidades.

Quiero agradecerle a mis amigos y amigas por haberme escuchado y animado cuando tuve problemas.

Por último, y no menos importante, quiero agradecerle a mi papá, mi mamá y a Lalo, por haberme aconsejado y animado durante todo el proceso de mi investigación. Sin sus consejos, regaños y palabras de aliento, el final de esta historia sería diferente. Me siento muy satisfecha de que no fue así.

ÍNDICE

	Página
Prefacio	i
Lista de cuadros	iv
Lista de figuras	v
Resumen	vi
I. Introducción	1
II. Objetivos	2
A. General	2
B. Específicos	2
III. Justificación	3
IV. Marco teórico	4
A. Virus del Zika	4
1. Taxonomía del virus	4
2. Mecanismos de transmisión	4
3. Sintomatología	5
4. Estructura y replicación	6
B. Virus y fármacos antivirales	6
1. Clasificación y mecanismos de acción	7
C. Características farmacocinéticas y farmacodinámicas	8
D. Desarrollo <i>in silico</i> de fármacos	9
1. Clasificación de los métodos CADD	9
a. Métodos <i>structure-based</i>	9
b. Métodos <i>ligand-based</i>	9
c. Métodos híbridos	9
2. Modelo farmacóforo	10
E. Inhibición enzimática	10
1. Inhibición competitiva	11
2. Inhibición no competitiva	11
a. Inhibición alostérica	11
F. Inhibición alostérica de la proteasa NS2B/NS3 del Zika	11

V.	Metodología.....	13
	A. Muestra.....	13
	B. Recursos materiales.....	13
	C. Métodos.....	13
VI.	Resultados.....	17
VII.	Discusión.....	31
VIII.	Conclusiones.....	36
IX.	Recomendaciones.....	37
X.	Bibliografía.....	38
XI.	Anexos.....	44

LISTA DE CUADROS

1. Taxonomía de ZIKV.....	4
2. Moléculas de referencia utilizadas para la creación del modelo farmacóforo	13
3. Moléculas base para el diseño de derivados	15
4. Grupos funcionales para la obtención de nuevos derivados y su justificación	15
5. Interacción molecular de las moléculas reportadas en la literatura y las obtenidas mediante el modelo farmacóforo en el sitio alostérico de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika	17
6. Interacción molecular de las moléculas modificadas en el sitio alostérico de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika.....	21
7. Descriptores de absorción, distribución, excreción y toxicidad de las moléculas evaluadas	26
8. Moléculas que exhibieron el mejor potencial para su futuro desarrollo como fármacos antivirales contra el virus Zika.....	30
9. Moléculas evaluadas en el estudio.....	46
10. Descriptores de absorción, distribución, excreción y toxicidad de las moléculas con energía de unión más negativa que -7.5 kcal/mol (binaria)	51

LISTA DE FIGURAS

1. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	5
2. Microcefalia en recién nacidos provocado por el virus del Zika.....	6
3. Organización genómica de los flavivirus y procesamiento de la poliproteína	6
4. Efecto de varias propiedades fisicoquímicas en la farmacocinética y disposición de fármacos.....	8
5. Modelo farmacóforo compuesto de diferentes características que representan las características esenciales para ejercer la actividad biológica	10
6. Unión a proteínas plasmáticas de las moléculas evaluadas	27
7. Depuración de las moléculas evaluadas	28
8. Toxicidad aguda oral en ratas de las moléculas evaluadas.....	29
9. Proteasa NS2B/NS3 del virus Zika A) con el inhibidor cn-716 en el sitio activo y B) sin inhibidor	44
10. Proteasa NS2B/NS3 del virus Zika con el cubo de interacción molecular (verde) en las coordenadas $x = 90.46$, $y = 49.76$ y $z = 143.94$ y tamaño 40, 54 y 60, respectivamente	44
11. Script realizado en Rstudio para tratar los resultados obtenidos de ZINCPharmer	45

RESUMEN

El Zika (ZIKV) es un flavivirus que produce la enfermedad del Zika, la cual ha sido asociada a patologías neurológicas severas como el síndrome de Guillain-Barré y la microcefalia neonatal. Desafortunadamente, hasta el día de hoy no existe vacuna o algún medicamento antiviral para prevenir o tratar la enfermedad del Zika. Para la replicación de ZIKV se necesita de la serina proteasa NS2B/NS3, lo que la vuelve un *target* atractivo para el desarrollo de compuestos antivirales. Con el fin de identificar y proponer nuevas moléculas con capacidad antiviral contra el Zika se realizó un modelo farmacóforo a partir de inhibidores alostéricos de la proteasa NS2B/NS3 reportados en la literatura y se propusieron nuevos derivados con el fin de mejorar la afinidad al sistema biológico de interés y el perfil farmacocinético. Los candidatos que exhibieron un mejor potencial para su futuro desarrollo fueron las moléculas R-12, 6-ZINC-MOD1 y 6-ZINC-MOD3, pues presentaron energías de unión favorables y al menos 3 de 4 descriptores evaluados en niveles adecuados. Se recomienda dar seguimiento a esta investigación realizando un análisis de acoplamiento molecular dinámico para eliminar las limitantes asociadas al tratamiento estático o semiflexible de los estudios de acoplamiento molecular comunes y comparar los resultados con los obtenidos en este estudio. También se recomienda sintetizar los candidatos propuestos para determinar su potencial farmacoterapéutico, eficacia y seguridad mediante estudios *in vitro* e *in vivo*.

I. INTRODUCCIÓN

El virus del Zika (ZIKV) es un flavivirus de ARN que provoca la enfermedad del Zika. Hasta el día de hoy, no existen vacunas o drogas antivirales para prevenir o tratar la infección por ZIKV (Tripp & Ross, 2016). Los métodos *in silico* para el descubrimiento de nuevos fármacos antivirales en contra de los flavivirus han ganado popularidad en los últimos años. En específico, se ha utilizado la proteasa viral NS2B/NS3 como *target* para el descubrimiento de inhibidores pues esta proteasa juega un rol importante en el procesamiento adecuado de la poliproteína que se traduce del genoma de los flavivirus, lo cual es esencial para la replicación de estos (Cox, Stanton & Schinazi, 2015). Previamente se han estudiado varios inhibidores de la proteasa viral NS2B/NS3, entre los cuales se encuentran la bromocriptina (Chan *et al*, 2017), el boronato cn-716 (Lei *et al*, 2016) y varias moléculas pequeñas (Lee *et al*, 2017). Sin embargo, el diseño de inhibidores para este tipo de proteasas es un reto, pues el sitio activo es flexible, poco profundo y se encuentra expuesto al solvente (Lee *et al*, 2017).

Más adelante, Roy *et al* encontraron que 5 flavonoides y un fenol poseen la capacidad de inhibir la NS2B/NS3 de manera no competitiva, identificando por primera vez la susceptibilidad de esta proteasa a ser inhibida alostéricamente como se ha encontrado previamente en otros complejos NS2B/NS3 flavivirales (de Sousa *et al*, 2015) (Othman *et al*, 2008) (Yildiz, Ghosh, Bell, Sherman & Hardy, 2013) (Mahawaththa *et al*, 2017). El descubrimiento de este sitio alostérico, que además es altamente probable que se conserve en todos los complejos NS2B/NS3 flavivirales (Lim *et al*, 2020), abre las puertas al desarrollo de nuevas moléculas pequeñas con capacidad antiviral en contra del Zika y probablemente en contra de los flavivirus en general.

Para poder encontrar nuevos inhibidores se creó un modelo farmacóforo a partir de 5 inhibidores alostéricos propuestos en la literatura, para así obtener más moléculas con la capacidad de inhibir la proteasa NS2B/NS3 del Zika (Roy *et al*, 2017), (Millies *et al*, 2019). A partir de estos nuevos inhibidores, se escogieron las moléculas con mejores energías de unión para realizarles modificaciones estructurales semi-empíricas que pretendían mejorar la afinidad al sitio activo y algunas características farmacocinéticas. Finalmente, se seleccionaron los mejores candidatos para su posterior investigación según su afinidad al sistema biológico de interés, su perfil farmacocinético y su seguridad.

Al finalizar la experimentación, se identificaron los mejores candidatos a ser fármacos antivirales contra el Zika, los cuales fueron R-12, 6-ZINC-MOD1 y 6-ZINC-MOD2. Se recomienda dar seguimiento a esta investigación realizando un análisis de acoplamiento molecular dinámico para eliminar las limitantes asociadas al tratamiento estático o semiflexible de los estudios de acoplamiento molecular comunes y comparar los resultados con los obtenidos en este estudio. Asimismo, se recomienda realizar la síntesis de los candidatos para realizar estudios *in vitro* e *in vivo* que ayuden a determinar su potencial farmacoterapéutico y para demostrar la eficacia y seguridad de estos.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general:

Proponer una lista corta de posibles fármacos antivirales dirigidos al virus del Zika mediante el uso de un modelo farmacóforo basado en inhibidores alostéricos de la proteasa NS2B/NS3 reportados en la literatura y la obtención de derivados mediante modificaciones estructurales semi-empíricas que mejoren la afinidad al sitio alostérico y las características de absorción, distribución, excreción y toxicidad.

B. Objetivos específicos:

- Obtener un modelo farmacóforo con base en inhibidores alostéricos de la proteasa NS2B/NS3 del Zika reportados en la literatura y evaluar una base de datos para obtener al menos 10 moléculas que se ajusten a dicho modelo.
- Proponer modificaciones estructurales semi-empíricas para las moléculas afines al sitio alostérico de la proteasa NS2B/NS3 para mejorar su afinidad al sistema biológico de interés y sus características farmacocinéticas.
- Evaluar las propiedades de absorción, distribución, excreción y toxicidad de todas las moléculas y seleccionar los compuestos que serían los mejores candidatos para ser fármacos antivirales en contra del Zika.

III. JUSTIFICACIÓN

El Zika es una enfermedad transmitida por vectores que constituye a uno de los principales desafíos de salud pública en las Américas (OPS Guatemala, 2018). A pesar de que la enfermedad provocada por el virus del Zika no se considera peligrosa en la mayoría de los casos, la infección durante el embarazo es causa de microcefalia y otras malformaciones congénitas. Asimismo, se asocia a complicaciones del embarazo, como el parto prematuro, el aborto espontáneo y la muerte intrauterina. La infección también es un desencadenante del síndrome de Guillain-Barré, neuropatía y mielitis, sobre todo en adultos y niños mayores (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018). Hasta el día de hoy, no existen vacunas o drogas antivirales para prevenir o tratar la infección por ZIKV (Tripp & Ross, 2016).

Previamente se han estudiado varios inhibidores de la proteasa viral NS2B/NS3, entre los cuales se encuentran la bromocriptina (Chan *et al*, 2017), el boronato cn-716 (Lei *et al*, 2016) y varias moléculas pequeñas (Lee *et al*, 2017). Sin embargo, el diseño de inhibidores para este tipo de proteasas sigue siendo un reto, pues el sitio activo es flexible, poco profundo y se encuentra expuesto al solvente (Lee *et al*, 2017). Recientemente se ha descubierto que estos complejos son susceptibles a inhibición alostérica (Roy *et al*, 2017), lo que abre un nuevo campo de estudio para el descubrimiento y diseño de moléculas pequeñas que actúen como inhibidores no competitivos.

Así, el presente trabajo busca sacar provecho de los métodos computacionales para el desarrollo de fármacos, para proponer, modificar y predecir la efectividad de moléculas que puedan inhibir la proteasa NS2B/NS3 del Zika alostéricamente, lo que resulta en la pérdida de su conformación activa (Lim *et al*, 2020).

El estudio pretende proveer una base sobre la cual continuar el desarrollo de nuevos inhibidores como futuras drogas en contra del Zika.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Virus del Zika

El virus del Zika (ZIKV) es un flavivirus de ARN que fue aislado por primera vez en 1947 en Uganda, África. No se consideraba una enfermedad relevante hasta que en 2016 la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró como una emergencia de salud pública de importancia global (Masmejan *et al*, 2020). El virus se transmite por mosquitos del género *Aedes* y la enfermedad desencadena síntomas usualmente leves en una de cuatro personas infectadas. La infección durante el embarazo causa malformaciones congénitas en el recién nacido, como la microcefalia. Además, se asocia a varias complicaciones en el embarazo. En adultos y en niños mayores puede desencadenar el síndrome de Guillain-Barré, neuropatía y mielitis (OMS, 2018).

1. **Taxonomía del virus:** El ZIKV es un virus del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, grupo IV del orden sin clasificar, al cual también pertenecen varios otros virus transmitidos por vectores relevantes para la salud humana como el virus del dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo Occidental (VNO) y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Hasan *et al*, 2018). A continuación se presenta la clasificación taxonómica completa del ZIKV:

Cuadro 1: Taxonomía de ZIKV

Dominio:	Riboviria
Grupo:	IV
Reino:	Orthornavirae
Filo:	Kitrinoviricota
Familia:	Flaviviridae
Género:	Flavivirus
Especie:	Virus Zika

(Chambers & Monath, 2003)

2. **Mecanismos de transmisión:** El ZIKV se transmite a las personas principalmente por la picadura de un mosquito *Aedes aegypti* (Figura 1) y *Aedes albopictus* que se encuentre infectado. Estos mosquitos también transmiten los virus del dengue y del chikungunya (CDC, 2019). *Ae. aegypti* se encuentra presente en todas las regiones tropicales, lo que coloca a estas áreas en mayor riesgo de nuevos brotes. *Ae. albopictus* parece jugar un rol menor. También se ha encontrado el virus en las especies *Culex*, entre otras, pero su habilidad para transmitir el virus a humanos es inexistente (Mesemjan *et al*, 2020).

Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*



(Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2021)

La transmisión también se puede dar verticalmente, es decir, de madre a hijo, resultando en malformaciones congénitas severas como el aborto espontáneo, el parto prematuro y la muerte intrauterina (OMS, 2018). La infección en el primer trimestre tiene la mayor probabilidad de desencadenar el Síndrome Congénito por Zika (CZS, por sus siglas en inglés) (Hoen *et al*, 2018).

El Zika parece ser el único arbovirus que se puede transmitir por contacto sexual y se han descrito transmisiones mujer-a-hombre, hombre-a-mujer y hombre-a-hombre. En los hombres el ZIKV podría causar infertilidad, sin embargo, se necesitan realizar más estudios para confirmar esta declaración (Ma *et al*, 2017).

También se han identificado posibles casos de transmisión por medio de transfusiones de sangre y se cree, pero aún no se ha demostrado, que podría ser transmitido por el contacto con fluidos corporales infectados (Mesmejan *et al*, 2020).

3. **Sintomatología:** La infección en fetos resulta en malformaciones severas. El CZS es una combinación de anomalías neurológicas severas que incluyen malformaciones estructurales del cerebro, hidropesía fetal, hipertonia, trastornos de la deglución, microcefalia (Figura 2), entre otros. Se han reportado complicaciones aún en niños que no tienen anomalías físicas (Mesmejan *et al*, 2020). Los síntomas de la enfermedad del Zika generalmente son leves y de 2 a 7 días de duración, entre estos se encuentran fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar y cefaleas (OMS, 2018). En niños los síntomas parecen ser más leves en comparación con los adultos y, en adultos el 75 al 80% de las infecciones son asintomáticas. Se pueden llegar a desencadenar complicaciones neurológicas como el síndrome de Guillain-Barré, mielitis o meningoencefalitis sobre todo en adultos y niños mayores (Mesmejan *et al*, 2020).

Figura 2. Microcefalia en recién nacidos provocado por el virus del Zika.

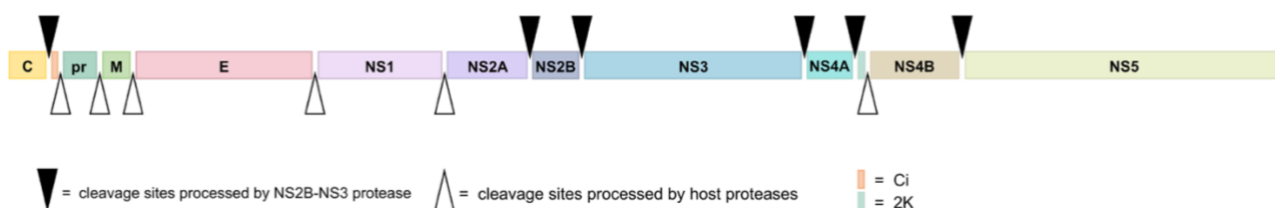


(CDC, 2020)

4. Estructura y replicación: Al igual que otros flavivirus, el ZIKV es un virus con envoltura cuyo genoma es un ARN de cadena sencilla de orientación positiva, con un tamaño de aproximadamente 11.000 (11 kb) nucleótidos. El genoma codifica tres proteínas estructurales, las cuales son proteínas de cápside (C), de membrana (prM) y de envoltura (E) que forma la partícula del virus con siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Cabezas & García, 2017)

El procesamiento co y post-traducciona por las proteasas de la célula huésped y la proteasa NS2B/NS3 del ZIKV en sitios de escisión específicos genera las proteínas estructurales y no estructurales (NS) necesarias para la replicación viral (Figura 3) (Barrows *et al*, 2018)

Figura 3. Organización genómica de los flavivirus y procesamiento de la poliproteína



(Voss & Nitsche, 2020)

Por lo general, los virus con envoltura se unen y entran a sus células huéspedes mediante la fusión con la membrana celular, utilizando un mecanismo de endocitosis y transporte por endosomas que depende en parte de la exposición a un pH bajo y se lleva a cabo a través de las proteínas virales de fusión de membrana, las cuales son las principales implicadas en la unión al receptor, en la fusión y en la entrada a las células del huésped (White & Whittaker, 2016).

B. Virus y fármacos antivirales

Los virus son los mayores agentes patógenos que causan una variedad de enfermedades graves en humanos, otros animales y plantas. Las infecciones virales más comunes son las

respiratorias, gastrointestinales, hepáticas y de la piel. En general, los virus son un paquete de material genético, que puede ser ADN o ARN, que se encuentra rodeado por una capa de proteínas. Algunos virus poseen una capa adicional llamada envoltura, la cual está hecha de lípidos, de esta manera estos pueden ser divididos en dos categorías principales: con envoltura y sin envoltura. Una partícula viral que consiste de una capa externa llamada cápside y un núcleo de ácidos nucleicos se denomina virion. Cuando el virion entra en contacto con células huésped, este se fusiona e inserta su material genético en esa célula, lo que le permite tomar el control de su maquinaria para replicarse. Como consecuencia, existe debate en la comunidad científica sobre si los virus realmente deben considerarse organismos vivos (Vardanyan & Hruby, 2016).

Para que el virus pueda iniciar su actividad, primero debe adherirse a un receptor en la superficie celular. Cada virus tiene su receptor específico, el cual es un componente vital de la superficie celular. En el primer paso el virus se internaliza mediante endocitosis mediada por receptores y luego se transporta a lo largo de la vía endocítica hacia los endosomas. Después de la fusión entre las membranas viral y endosomal catalizada por la proteína HA y la hemaglutinina, se da la liberación de ribonucleoproteínas virales que se importan al núcleo para la expresión y replicación de genes virales (Vardanyan & Hruby, 2016).

1. **Clasificación y mecanismos de acción:** Las moléculas capaces de combatir las infecciones causadas por un virus se llaman fármacos antivirales. Para entender como estos funcionan, es necesario entender el ciclo de vida general de los virus. Los ciclos de vida virales varían dependiendo de la especie de virus, pero todos comparten un patrón general:

- a. Unión y penetración del virus a la célula huésped.
- b. Descubrimiento del genoma viral dentro de la célula huésped.
- c. Síntesis de componentes virales dentro de la célula huésped.
- d. Ensamblado de componentes virales en partículas virales completas.
- e. Liberación de partículas virales para infectar otras células huésped.

(Stringer, 2011).

Entonces, los fármacos antivirales pueden ser clasificados según su *target* (objetivo) de la siguiente manera:

- a. bloqueadores de entrada, que interfieren con la unión y penetración del virus en la célula huésped;
- b. análogos de nucleótidos/nucleósidos y análogos de no nucleósidos, que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos mediante el bloqueo de la ADN polimerasa viral o la retrotranscriptasa en el caso de virus de ARN. Se denominan como inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleótidos/nucleósidos (ITIAN(T)) e inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN), respectivamente;
- c. interferones (IFNs), que inhiben la síntesis de proteínas necesarias para la replicación viral; e

- d. inhibidores de proteasa, que interfieren con la maduración del virus y su infectividad (Caracciolo & Giordano, 2010).

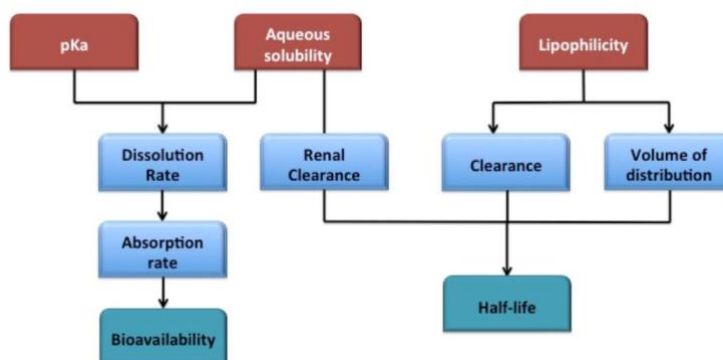
C. Características farmacocinéticas y farmacodinámicas

La farmacocinética describe el curso temporal de la concentración de un fármaco en un fluido corporal, preferiblemente plasma o sangre, que resulta de la administración de un cierto régimen de dosificación, e incluye los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). La farmacodinámica describe la intensidad del efecto de un fármaco en relación con su concentración en un líquido corporal, normalmente en el lugar de acción del fármaco. En palabras simples, la farmacocinética es “lo que el cuerpo le hace al fármaco” y la farmacodinámica es “lo que el fármaco le hace al cuerpo”. En la farmacodinámica se incluye la toxicidad del medicamento (Holford & Sheiner, 1982).

Un fármaco exitoso debe lograr una combinación finamente ajustada de comportamiento bioquímico, farmacocinético y seguridad. Además de una alta potencia y selectividad, un perfil deseable de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) es igualmente crítico para el éxito de un fármaco candidato (Xiong *et al*, 2021). Específicamente, un fármaco ideal debe ingresar apropiadamente al cuerpo, distribuirse razonablemente a varios tejidos y órganos, metabolizarse de una manera que no elimine inmediatamente su actividad, eliminarse de manera adecuada y confirmarse la no toxicidad. Estos temas están estrechamente relacionados entre sí, y abarcan todo el proceso desde la administración hasta la eliminación (Hodgson, 2001).

Las propiedades fisicoquímicas de un fármaco tienen un efecto significativo sobre su comportamiento farmacocinético, disposición en el organismo y toxicidad. Por lo tanto, una compresión sólida y una predicción precisa de estas propiedades son cruciales para el descubrimiento exitoso de fármacos. La Figura 4 muestra el impacto de varias propiedades fisicoquímicas en la farmacocinética de los medicamentos. Estas propiedades incluyen solubilidad acuosa, pKa y permeabilidad (Alqahtani, 2017).

Figura 4: Efecto de varias propiedades fisicoquímicas en la farmacocinética y disposición de fármacos.



(Alqahtani, 2017)

D. Desarrollo *in silico* de fármacos

El diseño de fármacos asistido por computadoras (Computer-aided drug design, CADD) es una disciplina que integra múltiples estrategias moleculares y cuánticas con el propósito de descubrir, diseñar y desarrollar nuevos agentes químicos terapéuticos. Muchos acercamientos CADD se basan en las relaciones entre estructura y actividad (Structure-Activity Relationships, SAR). Los objetivos principales del CADD forman parte de un trabajo multidisciplinario para el mejoramiento de moléculas bioactivas, el desarrollo de alternativas terapéuticas y el entendimiento de eventos biológicos a nivel molecular. En general, el proceso de descubrimiento de fármacos consta de tres etapas clave: La primera es la fase de descubrimiento, en la cual se busca identificar *targets* (objetivos) moleculares relevantes y moléculas activas o *hits*. Luego, en la fase de desarrollo los compuestos se evalúan usando modelos *in vitro* e *in vivo* y se subdivide en varias etapas: preclínica, clínica I, II y III. Por último, la fase de registro que permitiría la distribución al mercado y el uso clínico de estos fármacos. El CADD ha demostrado ser una herramienta importante en la fase de descubrimiento, pues el objetivo es el de filtrar y seleccionar solo las moléculas más prometedoras para que pasen a la fase de desarrollo (Roy, 2019).

1. Clasificación de los métodos de CADD: Los métodos del CADD se pueden clasificar en tres grupos principales: *structure-based* (basados en la estructura), *ligand-based* (basados en el ligando) y métodos híbridos.

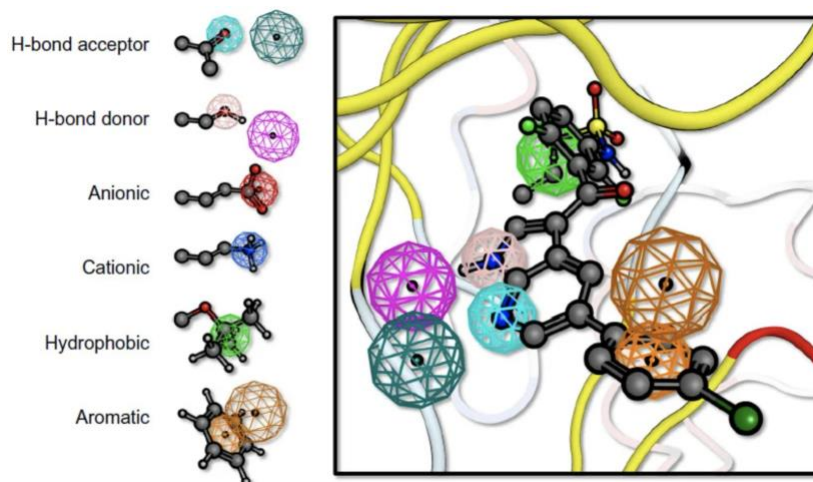
a. Métodos *Structure-Based*: Estos métodos dependen de la información tridimensional de la molécula objetivo. Algunos ejemplos de estos incluyen *docking* (acoplamiento molecular) y dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés). Con estos métodos se puede lograr la caracterización de los sitios de unión, elucidación del mecanismo de acción de moléculas activas a nivel molecular y evaluar la cinética y termodinámica involucrada en el reconocimiento entre el ligando y el receptor (Sledz & Caflisch, 2018).

b. Métodos *Ligand-Based*: Se basan en la información de las estructuras químicas de un set de ligandos con actividad biológica conocida. Estos métodos buscan identificar compuestos bioactivos o mejorar la actividad de moléculas activas. Algunos ejemplos son los métodos de búsqueda de similitudes (*similarity searching*) y los modelos de relación cuantitativa entre estructura y actividad (QSAR por sus siglas en inglés) (Siju *et al*, 2017).

c. Métodos híbridos: Se utilizan cuando tanto la estructura del receptor como la estructura de moléculas activas se conocen. Entre estos métodos se encuentran el modelo del farmacóforo, estrategias *in silico* para predecir la bioactividad de una molécula basado en el perfil biológico de los compuestos evaluados contra uno o múltiples receptores, entre otros (Yongye & Medina-Franco, 2012).

2. **Modelo de farmacóforo:** Un farmacóforo es una descripción abstracta de las características moleculares que son necesarias para que una macromolécula biológica reconozca molecularmente a un ligando. Según la IUPAC, un farmacóforo es “un ensamblado de características estéricas y electrónicas que son necesarias para garantizar una interacción supramolecular óptima con un target biológico específico y para detonar o bloquear su respuesta biológica”. El modelo del farmacóforo explica como ligandos estructuralmente diferentes pueden unirse a un mismo receptor, por lo que se utiliza para identificar ligandos nuevos mediante el diseño *de novo* o mediante un *virtual screening* (cribado virtual). En la química computacional se utilizan farmacóforos para definir las características esenciales de una o varias moléculas que comparten la misma actividad biológica. Luego, una base de datos de diversos compuestos químicos puede ser examinada para buscar más moléculas que compartan las mismas características en la misma orientación relativa. A este proceso se le conoce como *virtual screening* (cribado virtual) (John, 2018). Los farmacóforos también se utilizan como punto de partida para el desarrollo de modelos QSAR en 3D. Estas herramientas en combinación con el concepto de “estructuras privilegiadas”, que son marcos de referencia moleculares capaces de proporcionar ligandos para más de un tipo de receptor o *target* enzimático mediante cuidadosas modificaciones estructurales, son útiles para el descubrimiento de nuevos fármacos (Li *et al*, 2017).

Figura 5. Modelo farmacóforo compuesto de diferentes características que representan las propiedades esenciales para ejercer la actividad biológica. Entre estas se encuentran aceptores y donadores de hidrógenos, grupos aniónicos, catiónicos, hidrofóbicos y aromáticos.



(Qing *et al*, 2014)

E. Inhibición enzimática

Varios agentes químicos pueden afectar la actividad de las enzimas. A estos compuestos se les denomina efectores y juegan un papel fisiológico muy importante, además que su estudio permite analizar los procesos enzimáticos. Los efectores se pueden clasificar como inhibidores, cuando se disminuye la actividad de la enzima, y como activadores, cuando se activa o se aumenta su actividad. La modificación de la actividad enzimática provocada por los efectores puede ser

reversible, cuando el efecto se manifiesta desde que el compuesto se añade a la solución enzimática y desaparece cuando se elimina, e irreversible, cuando el efecto persiste después de la eliminación del efector. En la disminución en actividad se habla de inhibición si es reversible o de inactivación si es irreversible. Si las asociaciones entre el inhibidor y el sustrato con la enzima son mutuamente excluyentes, la inhibición se denomina competitiva y si no lo son, incompetitiva (si el inhibidor tiene afinidad solamente por el complejo binario enzima-sustrato) o no competitiva (si el inhibidor puede unirse indistintamente con la enzima libre o con el complejo enzima-sustrato (Carbonero, 1975)

1. **Inhibición competitiva:** En este caso, la enzima se asocia reversiblemente al sustrato o al inhibidor, pero no hay complejo ternario. El inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima y forma un complejo que no se convierte en producto. El efecto inhibitorio depende de las concentraciones relativas del sustrato y el inhibidor y de las afinidades relativas de ambos por la enzima. Este tipo de inhibición suele implicar una analogía estructural entre inhibidores y sustratos. Los productos de la reacción también se comportan como inhibidores competitivos. Por ejemplo, los tiogalactósidos son inhibidores específicos competitivos de la β -galactosidasa, el malonato es inhibidor de la succínico deshidrogenasa, etc (Carbonero, 1975).

2. **Inhibición no competitiva:** En este tipo de inhibición el inhibidor se combina con la enzima independientemente del sustrato, sin modificar la afinidad de la enzima por el sustrato, pero generando un complejo ternario inactivo. El inhibidor se une a la enzima en un sitio distinto al sitio activo (Carbonero, 1975).

a. **Inhibición alostérica:** Algunas enzimas pueden sufrir cambios en sus conformaciones activas e inactivas por la acción de la unión de un inhibidor a un sitio que no es el sitio activo. Cuando el modulador y el sustrato son idénticos se denominan homotrópicos y si son distintos, heterotrópicos. La unión del ligando, o del sustrato en el caso de las enzimas, origina cambios de conformación que afectan la actividad de esta. Los ligandos alostéricos se unen de manera reversible y no covalente, y estos suelen ser metabolitos pequeños o cofactores (Nelson & Cox, 2009)

F. Inhibición alostérica de la proteasa NS2B/NS3 del Zika

El genoma del ZIKV es traducido a una poliproteína de aproximadamente 3500 residuos, las cuales se segmentan en 3 proteínas estructurales y 7 no-estructurales, entre las cuales se encuentra el complejo NS2B/NS3 (Cox, Stanton & Shinazi, 2015) que consiste de la proteasa/helicasa NS3 y su cofactor, NS2B (Barnard *et al*, 2020). Los estudios de rayos X y de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) han demostrado que la proteasa puede adoptar una conformación “cerrada”, que es la conformación catalíticamente activa, y una “abierta” que no permite la actividad catalítica de la enzima (Yao *et al*, 2019).

La replicación de los flavivirus se da gracias al correcto procesamiento de la poliproteína, la cual requiere tanto de la célula huésped como de la proteasa NS2B/NS3 del virus, por lo que este complejo de los flavivirus ha sido utilizado como *target* para el desarrollo de fármacos antivirales en diversos estudios (Roy *et al*, 2017).

Roy *et al* descubrieron que la NS2B/NS3pro es altamente susceptible a inhibición alostérica, así como se ha visto en los complejos NS2B/NS3pro de otros flavivirus previamente. Roy y su equipo observaron que cinco flavonoides y la curcumina inhiben de manera no competitiva a esta enzima, identificando por primera vez la susceptibilidad de esta proteasa a ser inhibida alostéricamente, como se ha encontrado previamente en otros complejos NS2B/NS3 flavivirales (de Sousa *et al*, 2015) (Othman *et al*, 2008) (Yildiz, Ghosh, Bell, Sherman & Hardy, 2013) (Mahawaththa *et al*, 2017). Es altamente probable que este sitio alostérico se conserve en todos los complejos NS2B/NS3 flavivirales (Lim *et al*, 2020).

Se cree que la mayoría de moléculas pequeñas que han sido reportadas como inhibidores alostéricos se unen a un sitio adyacente al sitio activo, estabilizando una conformación de la NS3 que previene la formación de la conformación “cerrada” con el C-terminal de la NS2B y, por lo tanto, no permite a la proteasa existir en su conformación “cerrada” o activa (Voss & Nitsche, 2020).

V. METODOLOGÍA

A. Muestra

Cuadro 2. Moléculas de referencia utilizadas para la creación del modelo farmacóforo

No.	Nombre	Referencia
1	Miricetina	(Roy <i>et al</i> , 2017)
2	Luteolina	(Roy <i>et al</i> , 2017)
3	Quercetina	(Roy <i>et al</i> , 2017)
4	Curcumina	(Roy <i>et al</i> , 2017)
5	R-12	(Millies <i>et al</i> , 2019)

(Roy *et al*, 2017), (Millies *et al*, 2019)

B. Recursos materiales

1. **Hardware:** Computador TOSHIBA Satellite P55t con procesador Intel Core i7, 12.0 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows 10.

2. **Software:** Avogadro 1.2.0, Openbabel 2.3.1, Marvin JS 21.15.0, PharmaGist, ZINCPharmer, RStudio 1.4.1717, AutoDock 4.2.6, MGLTools 1.5.6, PyMol 2.5.0, SwissADME, ADMETlab 2.0, PLIP 2021 y UCSF Chimera (Hanwell *et al*, 2012), (O'Boyle *et al*, 2011), (ChemAxon, 2021), (Schneidman-Duhovny *et al*, 2008), (Koes & Camacho, 2012), (Rstudio Team, 2021), (Morris *et al*, 2009), (Schrödinger & DeLano, 2020), (Daina, Michielin & Zoete, 2017), (Xiong *et al*, 2021), (Adasme *et al*, 2021) y (Pettersen *et al*, 2004).

C. Métodos

1. **Obtención de moléculas:** Se buscó cada ligando de referencia por nombre en PubChem y se obtuvieron los respectivos códigos SMILES (Kim *et al*, 2019). Se descargó en formato PDB la proteasa NS2B/NS3 del Zika en complejo con un inhibidor en el sitio activo (cn-716) (código PDB 5LC0) (Lei *et al*, 2016).

2. **Preparación de moléculas para modelo farmacóforo:** Los códigos SMILES de las moléculas se introdujeron en Avogadro, se agregaron los hidrógenos faltantes, se optimizaron geoméricamente las estructuras para obtener la configuración más energéticamente estable utilizando el campo de fuerza MMFF94 y se guardaron los archivos en formato CML (Hanwell *et al*, 2012). Se transformaron los archivos de formato CML a formato MOL2 utilizando OpenBabel (O'Boyle *et al*, 2011).

3. **Modelo farmacóforo:** Los cinco ligandos de referencia (Cuadro 2) se ingresaron a PharmaGist y se descargó el modelo farmacóforo generado (Schneidman-Duhovny *et al*, 2008). El modelo se ingresó en ZINCPharmer y se obtuvieron +102,000 moléculas que coincidían con las características mínimas propuestas (Koes & Camacho, 2012). Los resultados fueron descargados en formato SDF y se utilizó RStudio para analizar y seleccionar las primeras 10 moléculas que cumplieran con: (1) tener 0 fallas a la 'Regla de 5' de Lipinski (Lipinski, Lombardo,

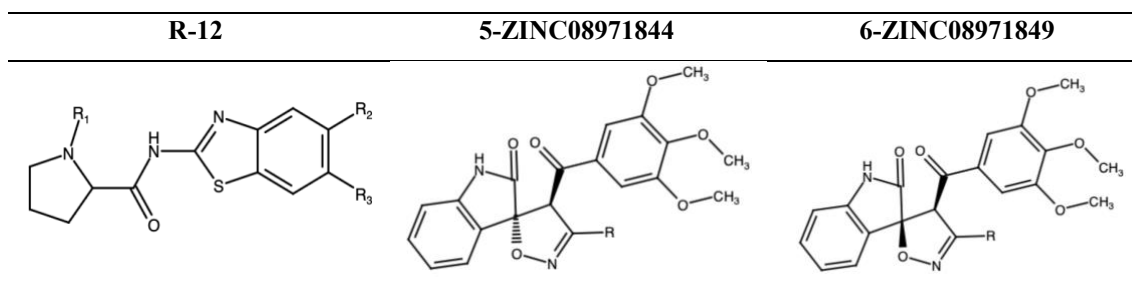
Dominy & Feeney, 1997) y (2) tener el menor valor RMSD posible, lo cual indica que la molécula se ajusta bien al modelo farmacóforo propuesto (Ver Figura 8 en ANEXOS) (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2008).

4. **Preparación de moléculas para acoplamiento molecular:** Se obtuvieron los códigos SMILES para las 10 moléculas seleccionadas de la base de datos y se ingresaron en Avogadro, se agregaron los hidrógenos que faltaban y se optimizaron geométricamente (Hanwell *et al.*, 2012). Se utilizó OpenBabel para transformar los archivos de formato CML a PDB (O'Boyle *et al.*, 2011). Se preparó la proteasa con AutoDockTools, removiendo el inhibidor cn-716 y las moléculas de agua, se agregaron los hidrógenos a la proteasa acorde a la naturaleza química de cada aminoácido, basándose en la forma ionizada esperada a pH fisiológico (7.4) y se agregaron las cargas de Kollman. Finalmente, se fusionaron los hidrógenos apolares y se guardó el archivo en formato PDBQT (Huey, Morris & Forli, 2012).

5. **Primer acoplamiento molecular (Docking):** Se realizó acoplamiento molecular a las 5 moléculas utilizadas para el modelo farmacóforo y las 10 moléculas seleccionadas de ZINCPharmer, colocando la caja en el sitio alostérico propuesto anteriormente (Chen *et al.*, 2016) y (Roy *et al.*, 2017). Debido a que esta proteasa es un dímero, únicamente es necesario tomar en cuenta uno de estos, por lo que se utilizó la cadena "A" de la proteasa como el sitio de estudio (Lei *et al.*, 2016). Las coordenadas de la caja utilizadas fueron 90.46, 49.76, 143.94 en *x*, *y* y *z*, respectivamente, y el tamaño de la caja se estableció en (40, 54, 50). El acoplamiento molecular se llevó a cabo como indicado por Huey y colaboradores utilizando AutoDock 4 (Huey, Morris & Forli, 2012). Finalmente, se identificaron las interacciones en el sitio alostérico utilizando PLIP (Adasme *et al.*, 2021) y se utilizó PyMol para visualizarlas (Schrödinger & DeLano, 2020).

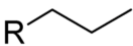

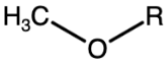
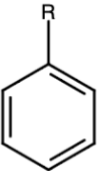
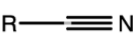
6. **Diseño de nuevos derivados:** A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las tres moléculas con mejor afinidad al sitio alostérico (energía de unión más negativa) y se realizaron modificaciones tomando en cuenta los siguientes criterios: (1) Se mantuvieron los grupos que mostraron ser importantes para la afinidad al sitio alostérico, observando las interacciones intermoleculares, (2) se retiraron los grupos funcionales que podrían ser problemáticos, ingresando la molécula a SwissADME y observando si se daban alertas PAINS o Brenk (Daina, Michielin & Zoete, 2017), (Brenk, 2008), (Bael & Holloway, 2010) y (3) se agregaron distintos grupos seleccionados para mejorar las propiedades farmacocinéticas, dependiendo de cada una de las moléculas. Las moléculas base para el diseño de derivados se muestran en el Cuadro 3. Los sustituyentes seleccionados y su justificación se muestran en el Cuadro 4.

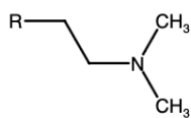
Cuadro 3. Moléculas base para el diseño de derivados



(ChemAxon, 2021)

Cuadro 4. Grupos funcionales para la obtención de nuevos derivados y su justificación

Nombre del grupo	Estructura	Justificación
Propilo		<ul style="list-style-type: none"> Donador de electrones (disminuye acidez de fenoles o ácidos carboxílicos, mejora la densidad electrónica de arenos y heteroarenos) Mayor aumento en liposolubilidad que con alcanos ramificados (mayor área lipofílica)
Isopropilo		<ul style="list-style-type: none"> Donador de electrones Menor aumento en liposolubilidad que alcanos lineales
Flúor	F	<ul style="list-style-type: none"> Bioisómero del hidrógeno Grupo atractor de electrones suave La fluorización de un grupo areno bloquea la hidroxilación metabólica, lo que podría aumentar la vida media del fármaco y su disponibilidad oral
Metil éter		<ul style="list-style-type: none"> Aumentan la solubilidad (más que los alquilos, menos que los alcoholes) Aceptor de hidrógenos (para formar puentes de hidrógeno)
Fenilo		<ul style="list-style-type: none"> Buena accesibilidad sintética Aumenta liposolubilidad Un grupo atractor de electrones ayuda a que se metabolice más lento
Cianuro		<ul style="list-style-type: none"> Aumenta hidrosolubilidad Grupo atractor de electrones fuerte

Dimetilamino

- Aumentan hidrosolubilidad
 - Aceptor de hidrógenos (para formar puentes de hidrógeno)
-

(Dörwald, 2013), (ChemAxon, 2021).

7. Preparación y acoplamiento molecular de las nuevas moléculas: Se prepararon los ligandos y se llevó a cabo el acoplamiento molecular como descrito anteriormente en los pasos 4 y 5, respectivamente.

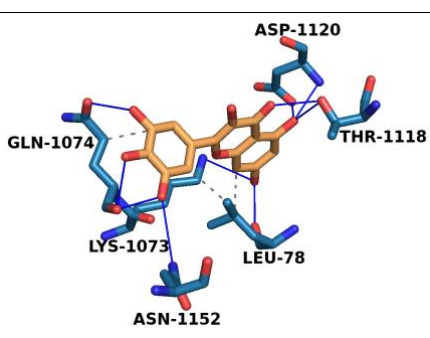
8. Características ADMET: Se evaluó la absorción, distribución, excreción y toxicidad de todas las moléculas utilizando la página ADMETlab 2.0 (Xiong *et al*, 2021).

VI. RESULTADOS

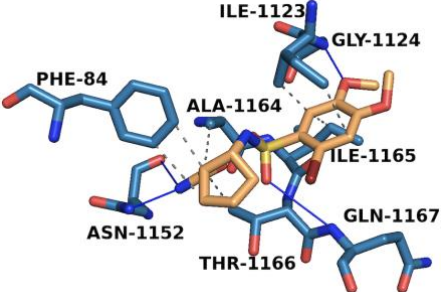
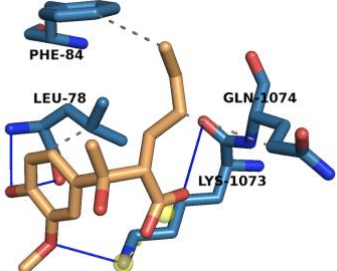
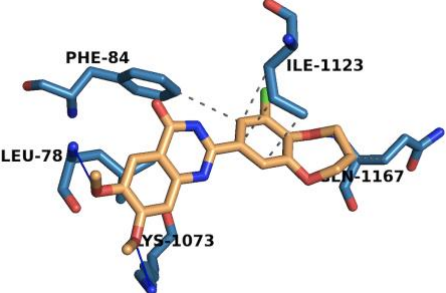
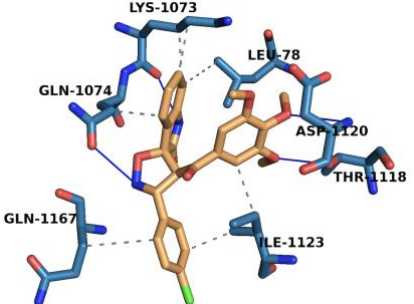
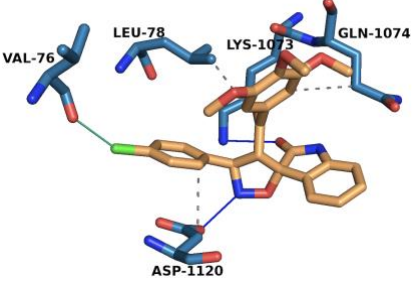
Se evaluaron las energías de unión al sitio alostérico de las 5 moléculas utilizadas para la creación del modelo farmacóforo y las 10 moléculas seleccionadas de la base de datos ZINC (Sterling & Irwin, 2015). Estas se enumeraron del 1 al 10 en orden ascendente de valor RMSD para hacer más práctica su identificación. Todas las moléculas evaluadas en este paso, excepto 2-ZINC78904136, dieron como resultado energías de unión negativas, lo que indica que estas presentan afinidad al sitio alostérico de la proteasa NS2B/NS3 del Zika. Además, esto demuestra que de las 10 moléculas obtenidas del modelo farmacóforo, 9 presentaron la capacidad de inhibir alostéricamente esta proteasa. Los residuos que interactúan con las moléculas evaluadas en este paso fueron VAL-76, ALA-77, LEU-78, PHE-84, ASP-1071, LYS-1073, GLN-1074, THR-1118, LYS-1119, ASP-1120, ILE-1123, GLY-1124, ASN-1152, ALA-1164, THR-1166 y GLN-1167. Las interacciones que se dieron entre los residuos y las moléculas evaluadas fueron principalmente puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, sin embargo, también se encontraron puentes salinos, como fue en el caso de las moléculas 1-ZINC03182810 y 3-ZINC94610804 y un enlace de halógeno, como fue el caso de la molécula 6-ZINC08971849 (Cuadro 5).

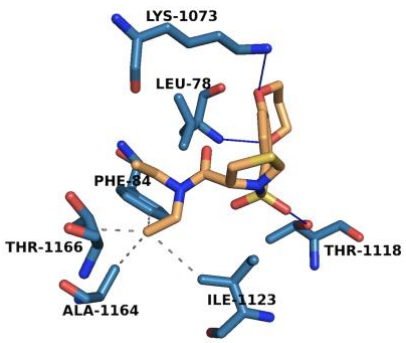
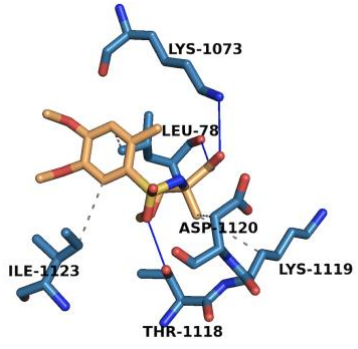
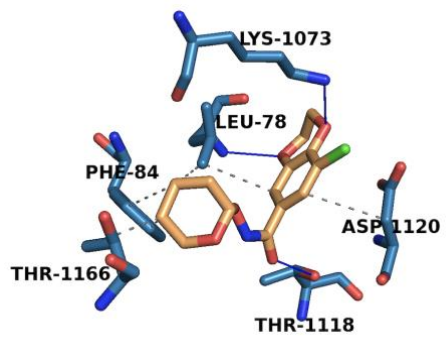
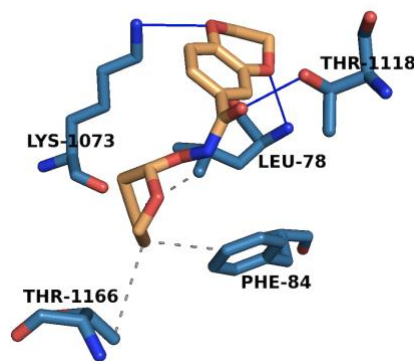
Las moléculas R-12, 5-ZINC08971844 y 6-ZINC08971849 fueron las que presentaron las energías de unión más negativas, siendo la molécula R-12, reportada por Millies y colaboradores, la que mostró la mejor afinidad (-7.63 kcal/mol) (Millies *et al*, 2019). Estas tres moléculas fueron seleccionadas para realizar las modificaciones estructurales semi-empíricas en el siguiente paso.

Cuadro 5. Interacción molecular de las moléculas reportadas en la literatura y las obtenidas mediante el modelo farmacóforo en el sitio alostérico de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika.

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
Myricetina		PH: THR-1118, ASP-1120, GLN-1074, LYS-1073, ASN-1152, LEU-78 IH: LEU-78, GLN 1074	-6.44

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
Quercetina		PH: LEU-78, LYS-1073, GLN-1074, THR-1118, ASP-1120, ASN-1152, THR-1166 IH: LEU-78, PHE-84, GLN-1074	-6.37
Luteolina		PH: LEU-78, LYS-1073, GLN-1074, THR-1118, ASP-1120, ASN-1152, THR-1166 IH: LEU-78, PHE-84, GLN-1074, ILE-1123	-7.21
Curcumina		PH: VAL-76, LYS-1119, ILE-1165, GLN-1167 IH: LEU-78, PHE-84, LYS-1073, GLN-1074, LYS-1119, ILE-1123, ALA-1164, THR-1166	-7.1
R-12		PH: LEU-78, LYS-1119, ASP-1120 IH: ALA-77, THR-1118, ASP-1120, ILE-1123, GLN-1167	-7.63
1-ZINC03182810		PH: LEU-78, LYS-1073, THR-1118 IH: LEU-78, PHE-84, LYS-1073, GLN-1074, ILE-1123, ALA-1164, THR-1166 PS: ASP-1071	-7.14

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
2- ZINC78904136		PH: GLY-1124, ASN-1152, GLN-1167 IH: PHE-84, ILE-1123, ALA-1164, ILE-1165, THR-1166	+45.1
3- ZINC94610804		PH: LEU-78, LYS-1073 IH: LEU-78, PHE-84, GLN-1074 PS: LYS-1073	-4.52
4- ZINC83925409		PH: LEU-78, LYS-1073, GLN-1167 IH: LEU-78, PHE-84, ILE-1123, GLN-1167	-7.45
5- ZINC08971844		PH: LYS-1073, GLN-1074, THR-1118, ASP-1120 IH: LEU-78, LYS-1073, GLN-1074, ILE-1123, GLN-1167	-7.61
6- ZINC08971849		PH: LYS-1073, ASP-1120 IH: LEU-78, GLN-1074, ASP-1120 EH: VAL-76	-7.58

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
7- ZINC65567489		PH: LEU-78, LYS-1073, THR-1118 IH: PHE-84, ILE-1123, ALA-1164, THR-1166	-6.97
8- ZINC71900698		PH: LEU-78, LYS-1073, THR-1118 IH: LEU-78, LYS-1119, ASP-1120, ILE-1123	-5.75
9- ZINC84335291		PH: LEU-78, LYS-1073, THR-1118 IH: LEU-78, PHE-84, ASP-1120, THR-1166	-6.82
10- ZINC84452096		PH: LEU-78, LYS-1073, THR-1118 IH: LEU-78, PHE-84, THR-1166	-6.98

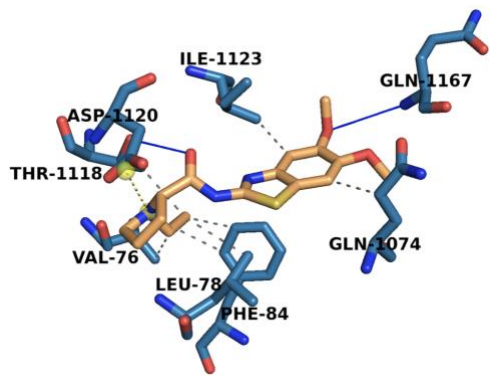
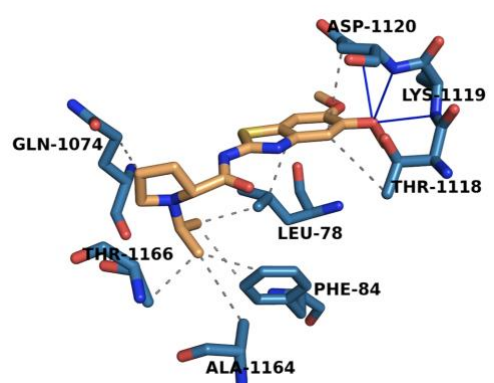
(Morris *et al.*, 2009), (Adasme *et al.*, 2021), (Schrödinger & DeLano, 2020)

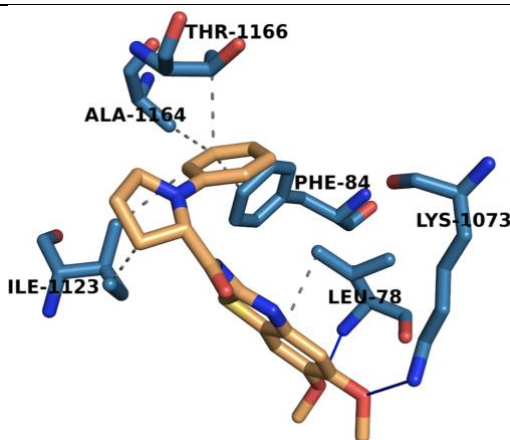
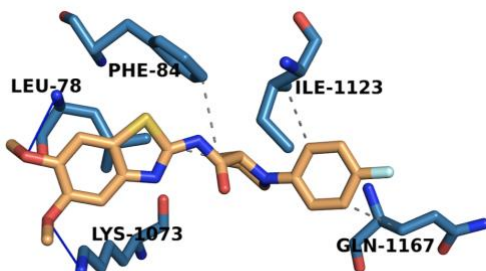
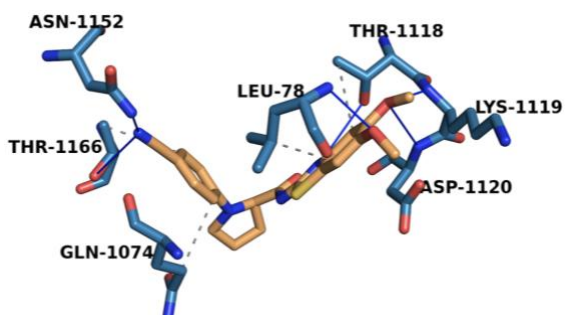
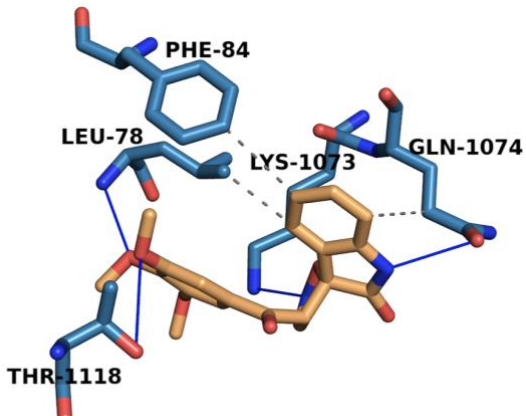
Se realizaron modificaciones estructurales a las tres moléculas con mejor afinidad del paso anterior para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, obteniendo cinco derivados de cada una para un total de 15

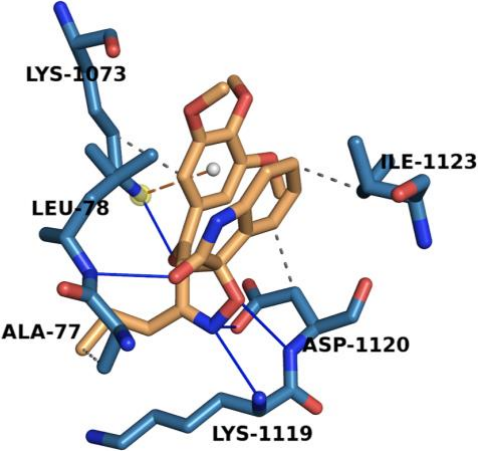
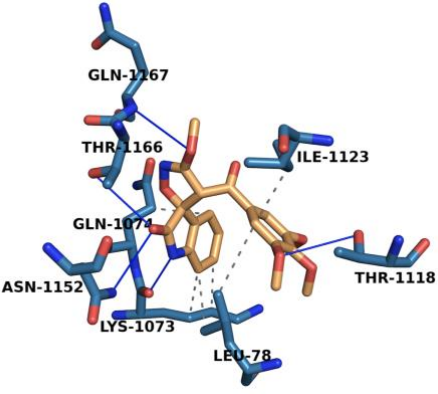
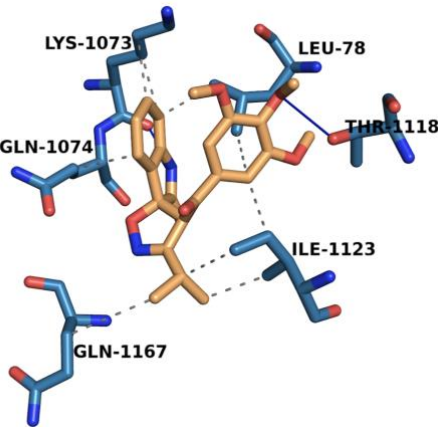
moléculas nuevas. Los residuos involucrados en las interacciones moleculares entre la proteasa y las moléculas evaluadas fueron los mismos que los del paso anterior, sin embargo, se identificó un nuevo tipo de interacción, el cual fue un enlace catión- π entre la molécula 5-ZINC-MOD2 y el residuo LYS-1073 (Cuadro 6).

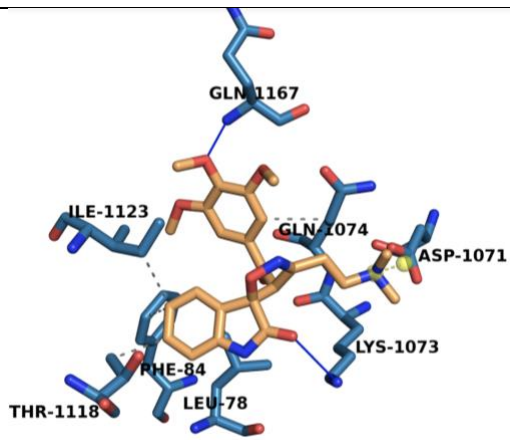
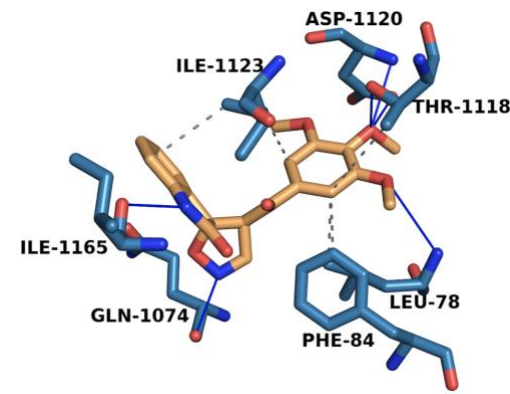
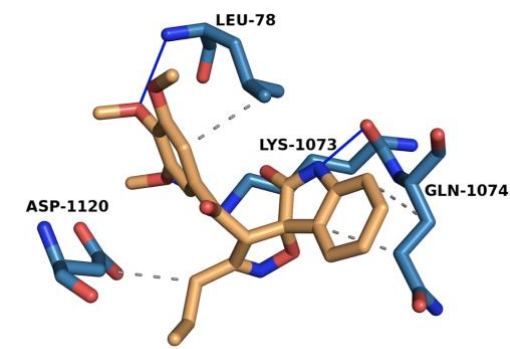
De los derivados de R-12, ninguno obtuvo una energía de unión más negativa que la molécula original, por lo que las modificaciones realizadas no presentaron una mejora en la afinidad al sitio alostérico de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika. Sin embargo, tanto el derivado 5-ZINC-MOD5 como los derivados 6-ZINC-MOD1, 6-ZINC-MOD2, 6-ZINC-MOD3 y 6-ZINC-MOD4 presentaron menores energías de unión que sus moléculas base y que el compuesto R-12, que fue el que obtuvo la mejor afinidad en el paso anterior (-7.63 kcal/mol). De estos derivados, la molécula 6-ZINC-MOD2 mostró tener la menor energía de unión (-7.91 kcal/mol) y, por lo tanto, la mayor afinidad al sitio alostérico del sistema biológico de interés (Cuadro 6).

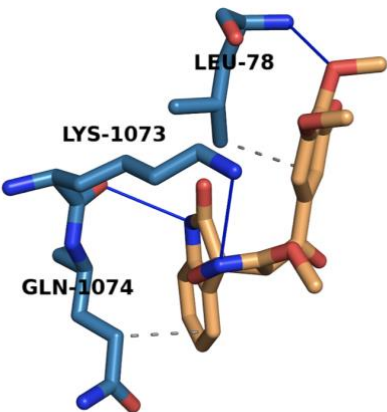
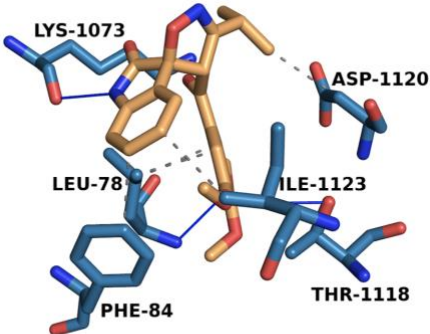
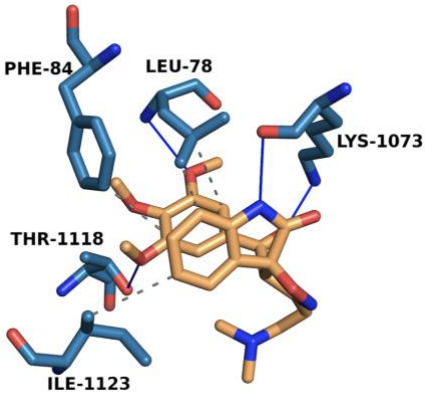
Cuadro 6. Interacción molecular de las moléculas modificadas en el sitio alostérico de la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interaccionan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
R12-MOD1		<p>PH: THR-1118, GLN-1167</p> <p>IH: VAL-76, LEU-78, PHE-84, GLN-1074, THR-1118, ILE-1123</p> <p>PS: ASP-1120</p>	-7.38
R12-MOD2		<p>PH: LYS-1119, ASP-1120</p> <p>IH: LEU-78, PHE-84, GLN-1074, THR-1118, ASP-1120, ALA-1164, THR-1166</p>	-6.79

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
R12-MOD3		PH: LEU-78, LYS-1073 IH: LEU-78, PHE-84, ILE-1123, ALA-1164, THR-1166	-7.22
R12-MOD4		PH: LEU-78, LYS-1073 IH: LEU-78, PHE-84, ILE-1123, GLN-1167	-7.57
R12-MOD5		PH: LEU-78, THR-1118, LYS-1119, ASP-1120, ASN-1152, THR-1166 IH: LEU-78, GLN-1074, THR-1118, THR-1166	-7.55
5-ZINC-MOD1		PH: LEU-78, LYS-1073, GLN-1074, THR-1118 IH: LEU-78, PHE-84, GLN-1074	-7.12

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
5-ZINC-MOD2		PH: LEU-78, LYS-1073, LYS-1119, ASP-1120 IH: ALA-77, LYS-1073, ASP-1120, ILE-1123 Cation-pi: LYS-1073	-7.16
5-ZINC-MOD3		PH: LYS-1073, THR-1118, ASN-1152, THR-1166, GLN-1167 IH: LEU-78, LYS-1073, GLN-1074, ILE-1123	-7.12
5-ZINC-MOD4		PH: LYS-1073, THR-1118 IH: LEU-78, LYS-1073, GLN-1074, ILE-1123, GLN-1167	-7.33

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
5-ZINC-MOD5		PH: LYS-1073, GLN-1167 IH: LEU-78, PHE-84, GLN-1074, THR-1118, ILE-1123 PS: ASP-1071	-7.81
6-ZINC-MOD1		PH: LEU-78, GLN-1074, THR-1118, ASP-1120, ILE-1165 IH: LEU-78, PHE-84, THR-1118, ILE-1123	-7.73
6-ZINC-MOD2		PH: LEU-78, LYS-1073 IH: LEU-78, GLN-1074, ASP-1120	-7.91

Molécula	Interacciones moleculares en el sitio alostérico	Aminoácidos que interactúan con el ligando	Energía de unión (kcal/mol)
6-ZINC-MOD3		PH: LEU-78, LYS-1073 IH: LEU-78, GLN-1074	-7.67
6-ZINC-MOD4		PH: LEU-78, LYS-1073, THR-1118 IH: LEU-78, PHE-84, ASP-1120, ILE-1123	-7.82
6-ZINC-MOD5		PH: LEU-78, LYS-1073, THR-1118 IH: LEU-78, PHE-84, ILE-1123	-7.23

(Morris *et al.*, 2009), (Adasme *et al.*, 2021), (Schrödinger & DeLano, 2020)

Se evaluaron los descriptores de absorción intestinal en humanos, unión a proteínas plasmáticas, depuración y toxicidad aguda oral en ratas, que representan las características de absorción, distribución, excreción y toxicidad, respectivamente. Se predijo que todas las moléculas evaluadas

presentan una absorción intestinal en humanos adecuada. En los demás descriptores se predijeron diversos resultados que se pueden encontrar en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Descriptores de absorción, distribución, excreción y toxicidad de las moléculas evaluadas

Molécula	Absorción Intestinal en humanos	Unión a proteínas plasmáticas	Depuración (mL/min/kg)	Toxicidad agua oral en ratones
Curcumina	HIA-	99.80%	13.839	(++)
Myricetina	HIA-	92.77%	7.716	(---)
Luteolina	HIA-	95.44%	8.146	(---)
Quercetina	HIA-	95.50%	8.284	(---)
R-12	HIA-	98.22%	6.247	(---)
1-ZINC03182810	HIA-	86.66%	4.747	(+++)
2-ZINC78904136	HIA-	89.42%	2.049	(---)
3-ZINC94610804	HIA-	85.61%	11.087	(---)
4-ZINC83925409	HIA-	98.39%	4.84	(---)
5-ZINC08971844	HIA-	98.44%	1.436	(--)
6-ZINC08971849	HIA-	98.65%	1.575	(-)
7-ZINC65567489	HIA-	98.88%	13.462	(---)
8-ZINC71900698	HIA-	42.21%	3.659	(---)
9-ZINC84335291	HIA-	97.36%	12.312	(--)
10-ZINC84452096	HIA-	90.58%	13.727	(-)
R-12-MOD1	HIA-	47.56%	7.561	(++)
R-12-MOD2	HIA-	48.18%	7.925	(+)
R-12-MOD3	HIA-	93.07%	7.581	(++)
R-12-MOD4	HIA-	94.74%	7.658	(+++)
R-12-MOD5	HIA-	92.29%	7.701	(+++)
5-ZINC-MOD1	HIA-	82.96%	3.174	(--)
5-ZINC-MOD2	HIA-	92.13%	1.684	(--)
5-ZINC-MOD3	HIA-	80.19%	3.95	(--)
5-ZINC-MOD4	HIA-	91.16%	1.835	(--)
5-ZINC-MOD5	HIA-	79.59%	4.175	(+)
6-ZINC-MOD1	HIA-	78.82%	4.461	(-)
6-ZINC-MOD2	HIA-	91.21%	2.081	(+)
6-ZINC-MOD3	HIA-	75.82%	5.068	(+)
6-ZINC-MOD4	HIA-	91.19%	2.151	(+)
6-ZINC-MOD5	HIA-	75.85%	5.129	(+)

HIA-: > 30% de absorción intestinal en humanos

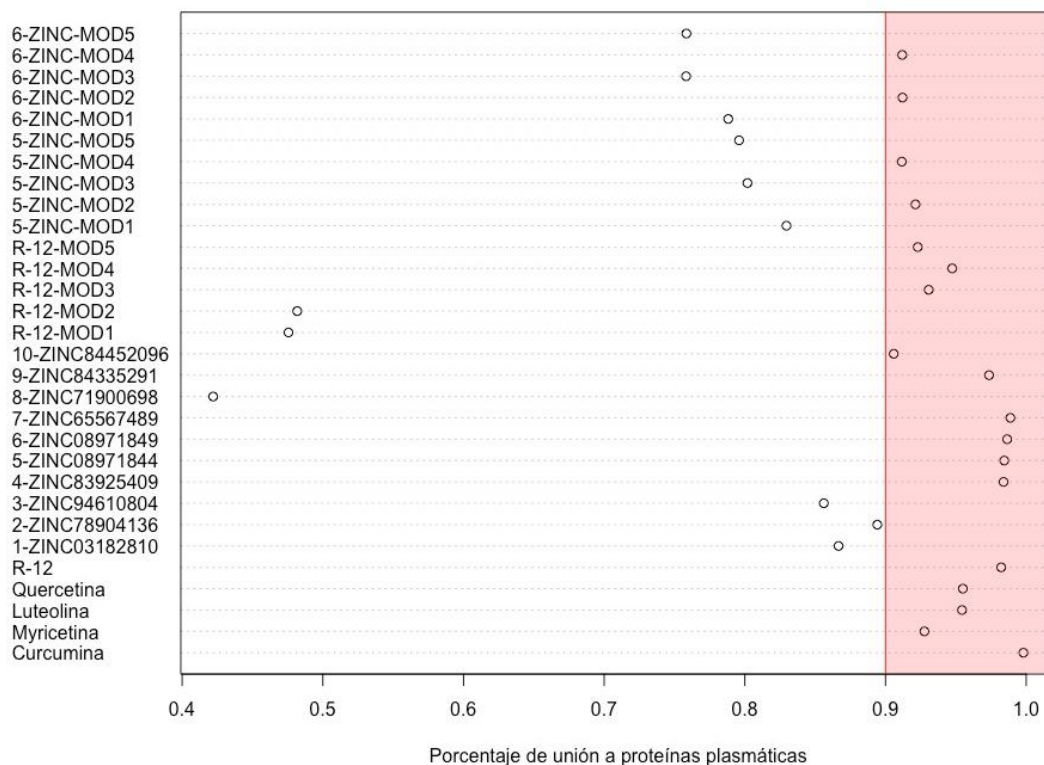
Toxicidad aguda oral en ratas: Probabilidad de que la molécula sea tóxica, de 0 a 1.

(---) es 0-0.1, (--) es 0.1-0.3, (-) es 0.3-0.5, (+) es 0.5-0.7, (++) es 0.7-0.9 y (+++) es 0.9-1.

(Xiong *et al*, 2021)

Para hacer más sencilla la identificación de los mejores candidatos, se elaboraron gráficas de los tres descriptores restantes (Unión a proteínas plasmáticas, depuración y toxicidad aguda oral en ratas).

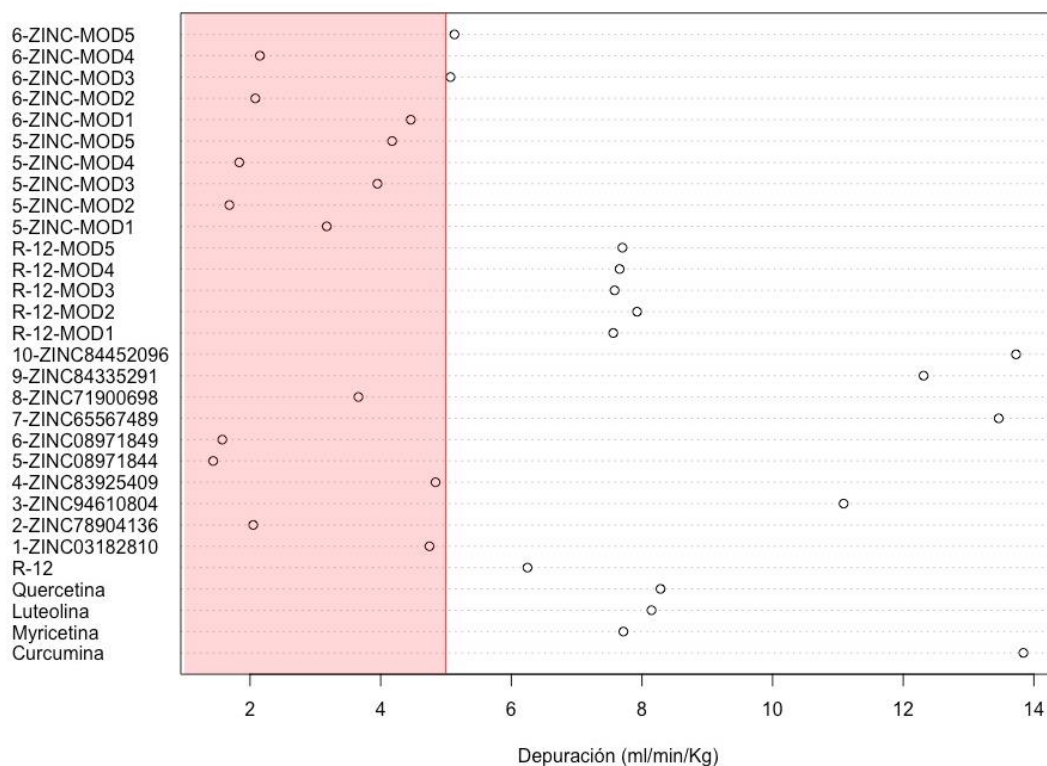
Figura 6. Unión a proteínas plasmáticas de las moléculas evaluadas



(Rstudio Team, 2021)

Las moléculas que mostraron un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas ideal (menor al 90%) fueron 1-ZINC03182810, 2-ZINC78904136, 3-ZINC94610804, 8-ZINC71900698, R-12-MOD1, R-12-MOD2, 5-ZINC-MOD1, 5-ZINC-MOD3, 5-ZINC-MOD5, 6-ZINC-MOD1, 6-ZINC-MOD3 y 6-ZINC-MOD5. Ninguno de los inhibidores alostéricos reportados anteriormente tiene una unión a proteínas plasmáticas ideal (Roy *et al*, 2017), (Millies *et al*, 2019).

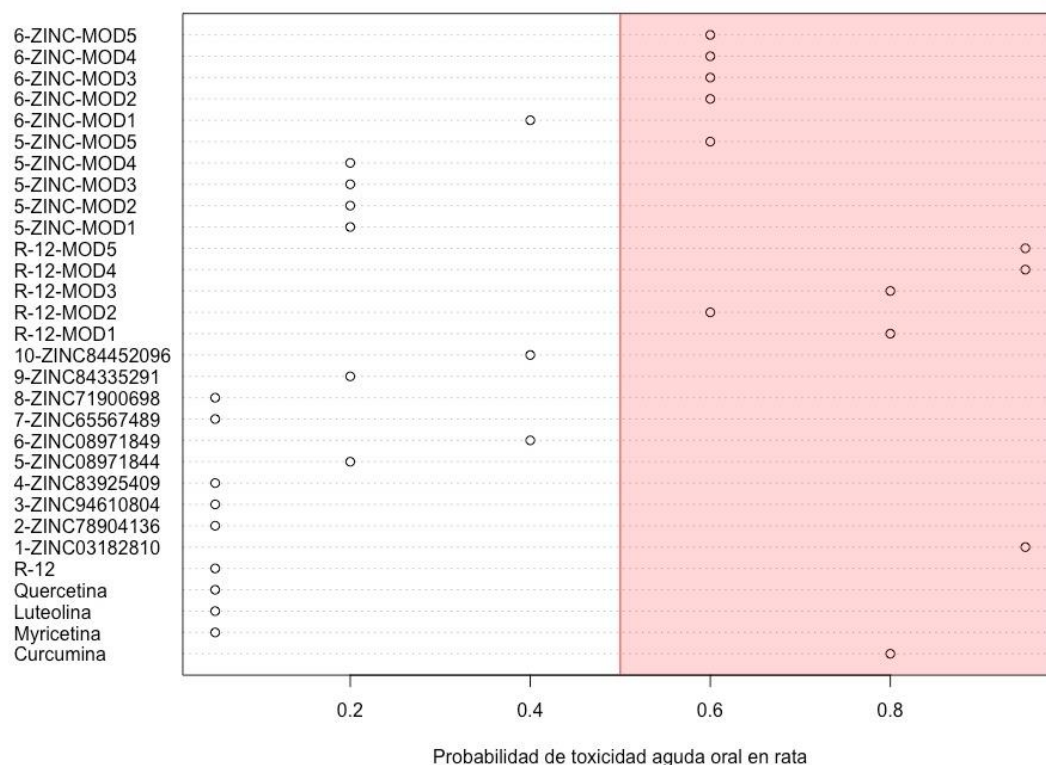
Figura 7. Depuración de las moléculas evaluadas



(Rstudio Team, 2021)

Con respecto al índice de depuración, se predijo que las moléculas que mostrarían una depuración ideal (mayor a 5 ml/min/kg) fueron todos los inhibidores alostéricos reportados anteriormente (curcumina, quercetina, luteolina, myricetina y R-12), 3-ZINC94610804, 7-ZINC65567489, 9-ZINC84335291, 10-ZINC84452096, todos los derivados de R-12, 6-ZINC-MOD3 y 6-ZINC-MOD5. Ninguno de los derivados de 5-ZINC mostraron tener un valor de depuración ideal.

Figura 8. Toxicidad aguda oral en ratones de las moléculas evaluadas (1 es la probabilidad de que sean tóxicas)



(Rstudio Team, 2021)

Las moléculas para las que se predijo baja probabilidad de ser tóxicas por administración oral en ratas fueron los compuestos naturales reportadas por Roy, excepto la curcumina (Roy *et al*, 2017), R-12, todas las moléculas obtenidas de la base de datos de ZINC, excepto 1-ZINC03182810 (Sterling & Irwin, 2015), todos los derivados de 5-ZINC08971844, excepto 5-ZINC-MOD5 y el derivado 6-ZINC-MOD1.

Finalmente, se seleccionaron las moléculas con mejor posibilidad de seguir siendo desarrolladas como fármacos antivirales contra el Zika según sus características farmacocinéticas y seguridad, tomando en cuenta únicamente aquellas cuya una energía de unión al sitio alostérico era más negativa que -7.5 kcal/mol, las cuales fueron R-12, 6-ZINC-MOD1 y 6-ZINC-MOD3 (Cuadro 8 y Cuadro 10 en ANEXOS).

Cuadro 8. Moléculas que exhibieron el mejor potencial para su futuro desarrollo como fármacos antivirales contra el virus Zika

Nombre	Estructura	Energía de unión (kcal/mol)
R-12		-7.63
6-ZINC-MOD1		-7.73
6-ZINC-MOD3		-7.67

(ChemAxon, 2021), (Morris *et al.*, 2009)

VII. DISCUSIÓN

El Zika es una enfermedad provocada por el virus Zika que se transmite principalmente por la picadura de mosquitos. La mayoría de las veces los síntomas que se presentan son leves, sin embargo, este virus está asociado a graves complicaciones en el cerebro o sistema nervioso como el síndrome de Guillain-Barré. En personas embarazadas, la infección durante el embarazo podría llevar a complicaciones como el aborto espontáneo y es causa de microcefalia y otras malformaciones congénitas. Actualmente no existen vacunas o fármacos antivirales para prevenir o tratar la infección por Zika (OMS, 2018). La proteasa NS2B/NS3 del virus Zika es un *target* atractivo para el desarrollo de fármacos antivirales ya que juega un rol importante en la replicación viral (Cox, Stanton & Schinazi, 2015).

Previamente se han reportado varios inhibidores competitivos para la enzima NS2B/NS3 del Zika (Chan *et al*, 2017) (Lei *et al*, 2016) (Lee *et al*, 2017). Sin embargo, el diseño de inhibidores para este tipo de proteasas es un reto ya que el sitio activo es flexible, poco profundo y se encuentra expuesto al solvente (Lee *et al*, 2017). Roy y colaboradores encontraron que algunas moléculas naturales inhibían la proteasa de manera no competitiva y, más adelante, se identificó en una investigación realizada por Lim y colaboradores, que la inhibición alostérica del complejo NS2B/NS3 se da al desestabilizarse la conformación cerrada, que es la conformación activa (Roy *et al*, 2017), (Lim *et al*, 2020). El presente estudio tuvo como finalidad realizar un análisis *in silico* de moléculas obtenidas a partir de un modelo farmacóforo generado de inhibidores alostéricos reportados y diseñar posibles derivados con actividad farmacoterapéutica.

Las interacciones intermoleculares que se dan en el complejo proteína-ligando son importantes para determinar la afinidad y especificidad de una molécula al sitio de unión, ya que a veces permiten aumentar la energía libre de Gibbs, que es importante para determinar la estabilidad de cualquier complejo biológico. Una energía de unión más negativa indica que la molécula muestra una mejor interacción y posiblemente una mejor actividad inhibitoria (Bisantz, Kuhn & Stahl, 2010). Todas las moléculas evaluadas, excepto 2-ZINC78904136, tuvieron un valor de energía de unión negativo, indicando su posible capacidad inhibitoria. Los mejores candidatos (Cuadro 8) tuvieron de las mejores energías de unión observadas, lo que indica una buena afinidad a la proteasa NS2B/NS3 del virus Zika.

El modelo farmacóforo se generó a partir de cinco inhibidores alostéricos de la proteasa NS2B/NS3 del Zika reportados en la literatura y se realizó un cribado virtual (virtual-screening) para encontrar más moléculas que compartieran las mismas características en la misma orientación relativa (Gajipara & George, 2018). De las 10 moléculas seleccionadas, únicamente una (2-ZINC78904136) no mostró afinidad al sitio activo, ya que la energía de unión era positiva (+45.1 kcal/mol), lo que indica que el modelo farmacóforo permitió identificar, en su mayoría, moléculas que inhiben alostéricamente a la proteasa viral NS2B/NS3 del Zika (Cuadro 5).

Luego del primer estudio de acoplamiento molecular se seleccionaron las tres moléculas con menores energías de unión para realizarles modificaciones estructurales. Estas fueron R-12 (-7.63 kcal/mol), 5-

ZINC08971844 (-7.61 kcal/mol) y 6-ZINC08971849 (-7.58 kcal/mol) (Cuadro 5). Para analizar si las modificaciones mejoraron la afinidad a la proteasa viral NS2B/NS3 del Zika, se compararon las energías de unión de las moléculas originales con las de sus derivados. Para el compuesto R-12, las modificaciones estructurales no mejoraron su afinidad al sitio alostérico debido a que sus derivados presentaron energías de unión menos negativas (Cuadro 6). Para el compuesto 5-ZINC08971844, únicamente el derivado 5-ZINC-MOD5 presentó una energía de enlace más negativa (-7.81 kcal/mol) y, por lo tanto, una mayor afinidad (Cuadro 6). Finalmente, para el compuesto 6-ZINC08971849, los derivados 1 – 4 presentaron energías de unión más negativas que la molécula original (-7.73, -7.91, -7.67 y -7.82 kcal/mol, respectivamente), indicando que las modificaciones estructurales realizadas mejoraron su afinidad al sitio alostérico (Cuadro 6).

La predicción de absorción intestinal en humanos es un objetivo importante para el diseño, optimización y selección de candidatos para su desarrollo como fármacos orales (Wessel, Jurs, Tolan, & Muskal, 1998). Se predijo que todas las moléculas evaluadas tendrían un porcentaje de absorción intestinal adecuado (>30%), por lo que se podría pensar que presentarían una absorción por la vía oral adecuada en estudios *in vivo* (Cuadro 7).

Uno de los factores más importantes que afectan el perfil farmacocinético y farmacodinámico de un medicamento es la unión a proteínas plasmáticas, pues este controla la concentración de fármaco libre y terapéuticamente activo en el plasma (Zhivkova & Doytchinova, 2012). Como regla general, los fármacos que tienen una baja unión a proteínas plasmáticas penetran mejor en los tejidos que aquellos que tienen una alta unión, pero se excretan mucho más rápido (Scheife, 1989). Una regla ampliamente aceptada, pero que no se cumple en el 100% de los casos, es que un fármaco más lipofílico presentará mayor unión a las proteínas plasmáticas (Yartsev, 2021). Las moléculas seleccionadas para el diseño de derivados (R-12, 5-ZINC08971844 y 6-ZINC08971849) presentaron una unión a proteínas plasmáticas muy alta (>90%), sin embargo, se observa que algunos derivados obtuvieron mejores resultados para este descriptor (Cuadro 7 y Figura 6).

En el caso de los derivados de R-12, se puede observar que los compuestos R-12-MOD1 y R-12-MOD2 fueron los que presentaron una menor unión plasmática. En el Cuadro 9 (Ver ANEXOS) se observa que la adición de grupos alquilo (propilo e isopropilo), disminuyeron el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, a pesar de que hayan aumentado el valor de logP de la molécula original. Esto deja en evidencia que la regla general de “entre más lipofílica es la molécula mayor será su porcentaje de unión a proteínas plasmáticas” no se cumple estrictamente, ya que existen otros factores que afectan la unión a proteínas plasmáticas, como la semejanza de la molécula a ligandos endógenos y la existencia de sitios de unión selectivos a cierto tipo de familia de fármacos (Yartsev, 2021).

Los compuestos 5-ZINC08971844 y 6-ZINC08971849 son enantiómeros, por lo que sus derivados también lo son entre ellos. En el caso de sus derivados, se observa que las modificaciones 1, 3 y 5 fueron las que demostraron un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas menor (Cuadro 7 y Figura 6). Si se

observan sus estructuras (Cuadro 9 en ANEXOS) se puede notar que fueron los sustituyentes polares los que permitieron disminuir el valor de este descriptor. En este caso, se evidencia que la adición de grupos polares en la molécula disminuye su afinidad por las proteínas plasmáticas, pues se disminuye la hidrofobicidad.

La depuración es un parámetro farmacocinético importante que define, junto al volumen de distribución, la vida media de un fármaco, y por lo tanto, la frecuencia de dosificación. Se refiere al volumen de plasma que es procesado, por unidad de tiempo, para eliminar el determinado fármaco (Maya, 2007). Como se observa en la Figura 7, los 5 inhibidores alostéricos reportados mostraron tener una depuración moderada (5 – 15 ml/min/kg). Las moléculas 5-ZINC08971844 y 6-ZINC08971849 obtuvieron un valor de depuración baja (<5 ml/min/kg). Los derivados de R-12 aumentaron el valor para este descriptor pero se mantuvo en el rango de depuración moderada. Todos los derivados de 5-ZINC08971844 mostraron tener una baja depuración, mientras que los derivados 6-ZINC-MOD3 y 6-ZINC-MOD5 fueron los únicos que mostraron un valor de depuración satisfactorio, justo por encima de 5 ml/min/kg (Cuadro 7).

La determinación de toxicidad aguda oral en mamíferos (por ejemplo, ratas) es una de las tareas más importantes para evaluar la seguridad de los compuestos y es uno de los pasos clave en el diseño de medicamentos (Hughes *et al*, 2008). Las moléculas evaluadas podrían caer en dos clasificaciones, en donde un valor de LD₅₀ > 500 mg/kg se considera de “baja toxicidad” y las moléculas con LD₅₀ < 500 mg/kg se consideran de “alta toxicidad”. En la Figura 8 se muestra que el valor de salida es la probabilidad de que la molécula evaluada sea tóxica, entre el rango de 0 a 1 (Xiong *et al*, 2021). De los inhibidores alostéricos reportados, únicamente la curcumina parece ser tóxica. De las 10 moléculas obtenidas a partir del modelo farmacóforo, únicamente el compuesto 1-ZINC03182810 parece ser tóxico, lo que se puede deber a la presencia de un grupo fosfato en su estructura (Ver Cuadro 9 en ANEXOS), que contribuye a propiedades farmacocinéticas poco favorables (Brenk *et al*, 2008). Se predijo que los derivados de R-12 mostrarían una alta toxicidad aguda oral, al igual que el derivado 5 del compuesto 5-ZINC08971844 y los derivados 2 – 5 del compuesto 6-ZINC08971849 (Figura 8).

Es importante mencionar, que los resultados de toxicidad (-) y (+) (valores de probabilidad entre 0.3 – 0.7) se encuentran en el límite entre “tóxico” y “no tóxico”, por lo tanto, se recomienda no confiar completamente en este resultado y realizar una evaluación más a profundidad (Xiong *et al*, 2021). Tomando en cuenta este aspecto, no se puede concluir con certeza que los compuestos 5-ZINC-MOD5 y los 5 derivados de 6-ZINC08971849 sean tóxicos o no tóxicos según este modelo de predicción.

Para seleccionar las tres moléculas que se consideran los mejores candidatos para fármacos antivirales contra el Zika, se tomaron en cuenta únicamente las que presentaron energías de unión más negativas que -7.5 kcal/mol. Este valor de energía de unión se escogió así de manera empírica, para cerciorarse de que las moléculas candidatos mostraran alta afinidad por la proteasa viral NS2B/NS3 del Zika. De las 30 moléculas evaluadas, solamente 10 se encuentran por debajo de este valor de energía de unión (Ver Cuadro 5 y 6). Luego, se utilizó un sistema de categorización binario de los tres descriptores farmacocinéticos (absorción intestinal, unión a proteínas plasmáticas y depuración) y el descriptor farmacodinámico (toxicidad agua

oral en rata) para escoger los mejores candidatos, en donde “0” representa un valor no ideal y “1” representa un valor ideal para ese descriptor en específico. En el Cuadro 9 (Ver ANEXOS) se puede observar este sistema de clasificación para las moléculas evaluadas. Los únicos compuestos que cumplieron con al menos 3 puntos de 4 y que se consideran como los compuestos con mejor potencial para su posterior investigación fueron R-12, 6-ZINC-MOD1 y 6-ZINC-MOD3.

El compuesto R-12, propuesto por Millies y colaboradores, mostró tener un valor para absorción intestinal en humanos mayor al 30%, una depuración de 6.2 ml/min/kg y una baja toxicidad aguda oral en ratas. Sin embargo, el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas parece estar por encima del ideal (98.2%), lo que podría limitar la habilidad del fármaco de penetrar en los tejidos y representa un obstáculo en el desarrollo de medicamentos. La adición de un centro básico o el aumento del pKa básico de una molécula podría disminuir el grado de unión a proteínas plasmáticas (Gleeson, 2006).

El compuesto 6-ZINC-MOD1 es el que presentó una energía de unión más negativa (-7.73 kcal/mol) que los candidatos propuestos, lo que indica que es el candidato con mayor capacidad inhibitoria. Demostró tener descriptores de absorción intestinal, unión a proteínas plasmáticas y toxicidad aguda oral en ratas adecuados, siendo el descriptor de depuración el único fuera del rango de idealidad, que dio un valor de 4.5 ml/min/kg (Cuadro 7). Cabe mencionar que la probabilidad de este compuesto de ser tóxico es de 0.3 – 0.5, por lo que se requieren de una investigación más a profundidad para predecir la toxicidad aguda oral (Xiong *et al*, 2021).

Finalmente, el compuesto 6-ZINC-MOD3 presentó una energía de unión de -7.67 kcal/mol y valores adecuados para los descriptores de absorción, distribución y excreción, sin embargo, el resultado para toxicidad aguda oral en ratas fue desfavorable y representa una limitante. Como se mencionó anteriormente, debido a que el compuesto tiene una probabilidad entre 0.5 y 0.7 de ser tóxico, se recomienda investigar más a profundidad la toxicidad de este para hacer una conclusión certera (Xiong *et al*, 2021).

Es importante mencionar que en los estudios de acoplamiento molecular los estados de protonación, especialmente dentro del sitio de unión, son de crucial importancia para predecir el modo de unión y la afinidad (Berry, Fielding & Gamielien, 2015). Si se asignan estados de protonación incorrectos, esto afectará el estado de los donadores y aceptores de hidrógenos, lo que limita enormemente la predicción precisa de las interacciones proteína-ligando (Polgár & Keserü, 2005). Además, las cadenas laterales de los aminoácidos ionizables también pueden variar sus estados de protonación dependiendo del ambiente local y el pH. Comúnmente, los aminoácidos asparagina y glutamina se encuentran desprotonados y arginina y lisina se encuentran protonados, sin embargo, esta es una generalización (Berry, Fielding & Gamielien, 2015). Para obtener resultados acertados se deben tomar en cuenta el microambiente del residuo y el pH fisiológico del receptor (Polgár & Keserü, 2005).

Por ejemplo, el compuesto 5-ZINC-MOD2 tiene una interacción del tipo catión- π entre el anillo bencénico y el residuo LYS-1073 (Cuadro 6). Si la cadena lateral de este residuo no se encontrara protonada

debido al microambiente en donde se encuentra, esta interacción no se daría y la energía de unión sería diferente. Se deben utilizar técnicas para predecir correctamente los estados de protonación, pero esto depende del tipo de receptor que se está estudiando, por lo que se requiere una investigación profunda y verificación de las técnicas utilizadas para este fin (Berry, Fielding & Gamielien, 2015).

Los estudios *in silico* presentan diversas ventajas para el descubrimiento de fármacos como la predicción de factores importantes, entre los cuales destacan la interacción molecular con enzimas y descriptores farmacocinéticos. Sin embargo, este tipo de estudios presentan limitantes relacionadas con el tratamiento estático o semiflexible de los ligandos y los targets. Además, no toman en cuenta la solvatación y el efecto entrópico, lo que limita fuertemente su poder predictivo. Por esta razón, se recomiendan las simulaciones de dinámica molecular (MD) pues estas permiten una exploración completa del reconocimiento y unión del ligando al target de interés, tanto desde el punto de vista energético como mecanístico (Gioia, Bertazzo, Recanatini, Masetti & Cavalli, 2017).

VIII. CONCLUSIONES

El modelo farmacóforo generado a partir de inhibidores alostéricos de la proteasa viral NS2B/NS3 del Zika permitió obtener moléculas con capacidad inhibitoria ya que se obtuvieron energías de enlace favorables (-7.61 a -4.52 kcal/mol), exceptuando el compuesto 2-ZINC78904136, que mostró una energía de enlace positiva (+41.5 kcal/mol). Por lo tanto, pueden inhibir la proteasa viral del Zika dando como resultado su muerte.

Se encontró que de los inhibidores reportados y de las 10 moléculas obtenidas del modelo farmacóforo, las moléculas con una energía de unión más negativa y, por lo tanto, mejor afinidad al sitio alostérico fueron R-12 (-7.63 kcal/mol), 5-ZINC08971844 (-7.61 kcal/mol) y 6-ZINC08971849 (-7.58 kcal/mol). Los derivados generados a partir de estas moléculas presentaron en algunos casos energías de unión más negativas que los compuestos originales, indicando que algunas modificaciones estructurales mejoraron su afinidad al sitio alostérico.

Los candidatos que exhibieron un mejor potencial para su futuro desarrollo farmacoterapéutico fueron las moléculas R-12, 6-ZINC-MOD1 y 6-ZINC-MOD3, pues presentaron energías de unión favorables de -7.63 kcal/mol, -7.73 kcal/mol y -7.67 kcal/mol, respectivamente. Además, también presentaron al menos 3 de 4 descriptores farmacocinéticos y farmacodinámicos en niveles adecuados.

La molécula R-12 fue el candidato que presentó el perfil farmacológico más seguro por su resultado no tóxico en el descriptor de toxicidad aguda oral en ratas.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un análisis a profundidad de los estados de protonación en el sitio alostérico para predecir el modo de unión y la afinidad de manera precisa.

Se recomienda dar seguimiento a esta investigación realizando un análisis de acoplamiento molecular dinámico para eliminar las limitantes asociadas al tratamiento estático o semiflexible de los estudios de acoplamiento molecular comunes y comparar los resultados con los obtenidos en este estudio.

Se recomienda realizar la síntesis de los candidatos R-12, 6-ZINC-MOD1 y 6-ZINC-MOD2 para realizar estudios *in vitro* e *in vivo* que ayuden a determinar su potencial farmacoterapéutico y para demostrar la eficacia y seguridad de los mismos.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., & Schroeder, M. (2021). «PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA» *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W530–W534. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB294>
- Alqahtani, S. (2017). «In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects». In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 13, Issue 11, pp. 1147–1158). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>
- Baell, J. B., & Holloway, G. A. (2010). «New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays». *J. Med. Chem.*, 53, 2719–2740.
- Barnard, T. R., Abram, Q. H., Lin, Q. F., Wang, A. B., & Sagan, S. M. (2021). «Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly». *Trends in biochemical sciences*, 46(5), 378–390. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.007>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). «Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses». *Chemical reviews*, 118(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
- Berry, M., Fielding, B., & Gamielien, J. (2015). «Practical Considerations in Virtual Screening and Molecular Docking». In *Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology: Algorithms and Software Tools* (pp. 487–502). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802508-6.00027-2>
- Bissantz, C., Kuhn, B., & Stahl, M. (2010). «A Medicinal Chemist’s Guide to Molecular Interactions». *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(14), 5061–5084. <https://doi.org/10.1021/JM100112J>
- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I. H., Frearson, J., & Wyatt, P. G. (2008). «Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases». *Chemmedchem*, 3(3), 435. <https://doi.org/10.1002/CMDC.200700139>
- Cabezas C, García P. «Diagnóstico de la infección por el virus zika». *An Fac med.* 2017;78(1):89-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i1.13028>
- Caracciolo, V. & Giordaano, A. (2010) «Viruses and Carcinogenesis». *Comprehensive Toxicology*, 1-13. doi:10.1016/b978-0-08-046884-6.01413-5
- Centers for Disease Control and Prevention (23 de septiembre del 2021). *Acerca del dengue*. <https://www.cdc.gov/dengue/es/about/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (23 de octubre del 2020). *Microcefalia*. <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/birthdefects/microcephaly.html>

- Chambers, T. J., Monath, T. P. (2003) *The flavivirus: Structure, replication and evolution*. San Diego: Elsevier Academic Press
- Chan, J.F.-W., Chik, K.K.-H., Yuan, S., Yip, C.C.-Y., Zhu, Z., Tee, K.-M., Tsang, J.O.-L., Chan, C.C.-S., Poon, V.K.-M., Lu, G., Zhang, A.J., Lai, K.-K., Chan, K.-H., Kao, R.Y.-T., Yuen, K.-Y. (2017) «Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor». *Antiviral Research* doi: 10.1016/j.antiviral.2017.02.002.
- ChemAxon (2021) *MarvinJS* 21.15.0. <http://www.chemaxon.com/>
- Chen, X., Yang, K., Wu, C., Chen, C., Hu, C., Buzovetsky, O., Wang, Z., Ji, X., Xiong, Y., & Yang, H. (2016). «Mechanisms of activation and inhibition of Zika virus NS2B-NS3 protease». *Cell Research*, 26(11), 1260. <https://doi.org/10.1038/CR.2016.116>
- Choudhury C., Narahari Sastry G. (2019) «Pharmacophore Modelling and Screening: Concepts, Recent Developments and Applications in Rational Drug Design». In: *Mohan C. (eds) Structural Bioinformatics: Applications in Preclinical Drug Discovery Process. Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*, vol 27. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05282-9_2
- Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. (2017) «SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules». *Sci Rep* 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- De Sousa LRF, Wu H, Nebo L, Fernandes JB, Kiefer W, Kanitz M, et al. (2015) «Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies». *Bioorg Medic Chem.*; 23: 466–470.
- Dörwald, F. Z. (2013). *Lead Optimization for Medicinal Chemists: Pharmacokinetic Properties of Functional Groups and Organic Compounds* (1st ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Freitas, R. F. de, & Matthieu, S. (2017). «A systematic analysis of atomic protein–ligand interactions in the PDB». *MedChemComm*, 8(10), 1970–1981. <https://doi.org/10.1039/C7MD00381A>
- Gajipara, J. and George, J. J. (2018). *Tools for ligand based drug discovery*. Proceedings of 10th National Science Symposium on Recent Trends in Science and Technology (pp. 57-64). ISBN: 9788192952130. Rajkot, Gujarat, India: Christ Publications
- Gleeson, M. P. (2006). «Plasma Protein Binding Affinity and Its Relationship to Molecular Structure: An In-silico Analysis». *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(1), 101–112. <https://doi.org/10.1021/JM060981B>
- Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. (2012). «Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform». *Journal of Cheminformatics*, 4, 17 - 17.
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). «Structural biology of Zika virus and other flaviviruses». *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(1), 13–20. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>
- Hodgson, J. (2001). «ADMET--turning chemicals into drugs». *Nature Biotechnology*, 19(8), 722–726. <https://doi.org/10.1038/90761>

- Hoen, B., Schaub, B., Funk, A. L., Ardillon, V., Boullard, M., Cabié, A., Callier, C., Carles, G., Cassadou, S., Césaire, R., Douine, M., Herrmann-Storck, C., Kadhel, P., Laouénan, C., Madec, Y., Monthieux, A., Nacher, M., Najioullah, F., Rousset, D., Ryan, C., ... Fontanet, A. (2018). «Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas». *The New England journal of medicine*, 378(11), 985–994. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709481>
- Holford, N. H. G., & Sheiner, L. B. (1982). «Kinetics of pharmacologic response». *Pharmacology & Therapeutics*, 16(2), 143–166. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(82\)90051-1](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90051-1)
- Huey, R., Morris, G. M., & Forli, S. (2012). *Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial*. <http://autodock.scripps.edu>.
- Hughes, J. D., Blagg, J., Price, D. A., Bailey, S., DeCrescenzo, G. A., Devraj, R. v., Ellsworth, E., Fobian, Y. M., Gibbs, M. E., Gilles, R. W., Greene, N., Huang, E., Krieger-Burke, T., Loesel, J., Wager, T., Whiteley, L., & Zhang, Y. (2008). «Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(17), 4872–4875. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2008.07.071>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2019). «PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces». *Nucleic Acids Res.*, 49(D1), D1388–D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Koes, D. R., & Camacho, C. J. (2012). «ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database». *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W409–W414. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS378>
- Lee, H., Ren, J., Nocadello, S., Rice, A. J., Ojeda, I., Light, S., Minasov, G., Vargas, J., Nagarathnam, D., Anderson, W. F., & Johnson, M. E. (2017). «Identification of novel small molecule inhibitors against NS2B/NS3 serine protease from Zika virus». *Antiviral research*, 139, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.12.016>
- Lei J, Hansen G, Nitsche C, Klein CD, Zhang L, Hilgenfeld R. (2016) «Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor». *Science*. 353:503?505. <https://doi.org/10.1126/science.aag2419> PMID:27386922
- Li, G.-B., Yu, Z.-J., Liu, S., Huang, L.-Y., Yang, L.-L., Lohans, C. T., & Yang, S.-Y. (2017). «IFPTarget: A Customized Virtual Target Identification Method Based on Protein–Ligand Interaction Fingerprinting Analyses». *Journal of chemical information and modeling*, 57(7), 1640-1651.
- Lim, L., Dang, M., Roy, A., Kang, J., & Song, J. (2020). «Curcumin Allosterically Inhibits the Dengue NS2B-NS3 Protease by Disrupting Its Active Conformation». *ACS Omega*, 5(40), 25677–25686. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00039>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). «Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings». *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1–3), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)

- Ma, W.; Li, S.; Ma, S.; Jia, L.; Zhang, F.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Wong, G.; Zhang, S.; Lu, X.; et al. (2017) «Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice». *Cell*, 168, 542.
- Mahawaththa MC, Pearce BJG, Szabo M, Graham B, Klein CD, Nitsche C, Otting G. (2017) «Solution conformations of a linked construct of the Zika virus NS2B-NS3 protease». *Antiviral Res.*; 142:141–147. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.011> PMID: 28336347
- Maya, J. D. (2007) *Pharmacokinetics: elimination*. Medwave. Jun;7(5):e3450 doi: 10.5867/medwave.2007.05.3450
- Millies, B., von Hammerstein, F., Gellert, A., Hammerschmidt, S., Barthels, F., Göppel, U., Immerheiser, M., Elgner, F., Jung, N., Basic, M., Kersten, C., Kiefer, W., Bodem, J., Hildt, E., Windbergs, M., Hellmich, U. A., & Schirmeister, T. (2019). «Proline-Based Allosteric Inhibitors of Zika and Dengue Virus NS2B/NS3 Proteases». *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(24), 11359–11382. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01697>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) «Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility». *J. Computational Chemistry*. 16: 2785-91.
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). «Open Babel: An open chemical toolbox». *Journal of cheminformatics*, 3, 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Organización Mundial de la Salud. (20 de julio de 2018) *Enfermedad por el virus de Zika*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- Othman R, Kiat TS, Khalid N, Yusof R, Irene Newhouse E, Newhouse JS, et al. (2008) «Docking of noncompetitive inhibitors into dengue virus type 2 protease: understanding the interactions with allosteric binding sites». *J Chem Info Modell.*; 48: 1582–1591.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004) «UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis». *J Comput Chem*. Oct;25(13):1605-12.
- Pires, D. E., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). «pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures». *Journal of medicinal chemistry*, 58(9), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b001>
- Polgár, T., & Keserü, G. M. (2005). «Virtual Screening for β -Secretase (BACE1) Inhibitors Reveals the Importance of Protonation States at Asp32 and Asp228». *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(11), 3749–3755. <https://doi.org/10.1021/JM049133B>
- Ponce, G. M. (2019) *Análisis in silico de polifenoles de la rosa de Jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) como inhibidores de la enzima HMG Co-A reductasa y diseño de posibles derivados con actividad farmacoterapéutica*. Universidad de San Carlos de Guatemala
- Qing, X., Lee, X. Y., Raeymaecker, J. de, Tame, J. R., Zhang, K. Y., Maeyer, M. de, & Voet, A. R. (2014). «Pharmacophore modeling: advances, limitations, and current utility in drug discovery». *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, 7, 81–92. <https://doi.org/10.2147/JRLCR.S46843>

- Roy A, Lim L, Srivastava S, Lu Y, Song J (2017) «Solution conformations of Zika NS2B- NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants». *PLoS ONE* 12(7): e0180632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180632>
- Roy, K. (2019) *In silico drug design: repurposing techniques and methodologies*. Ed. 1 San Diego: Academic Press
- RStudio Team (2021). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>
- Scheife R. T. (1989). «Protein binding: what does it mean?». *DICP: the annals of pharmacotherapy*, 23(7-8 Suppl), S27–S31. <https://doi.org/10.1177/106002808902300706>
- Schneidman-Duhovny, D., Dror, O., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2008). «PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection». *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_2), W223–W228. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN187>
- Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). *PyMOL*. Recuperado de: <http://www.pymol.org/pymol>
- Sledz, P., & Caflisch, A. (2018). «Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics». *Current Opinion in Structural Biology*, 48, 93–102.
- Siju, E. N., Rajalakshmi, G. R., Paulose, A. P., Dhanya, F. T., Hariraj, N., & Rahul, K. (2017). «CADD: pharmacological approaches in drug design and drug discovery». *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 892–908.
- Tripp, R. A., & Ross, T. M., (2016) «Development of a zika vaccine». *Expert Review of Vaccines*, vol. 15, no. 9, pp. 1083–1085
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). «AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading». *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Vardanyan, R., & Hruby, V. (2016). *Antiviral Drugs. Synthesis of Best-Seller Drugs*, 687–736. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411492-0.00034-1>
- Voss, S., & Nitsche, C. (2020). «Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3». *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 30(5), 126965. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.126965>
- Wessel, M. D., Jurs, P. C., Tolan, J. W., & Muskal, S. M. (1998). «Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure». *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38(4), 726–735. <https://doi.org/10.1021/CI980029A>
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). «ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties». *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5–W14. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB255>
- Yartsev, A. (13 de Agosto de 2021) *Protein binding of drugs*. Deranged Physiology. <https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/pharmacokinetics/Chapter%20334/protein-binding-drugs>
- Yildiz M, Ghosh S, Bell JA, Sherman W, Hardy JA. (2013) «Allosteric inhibition of the NS2B-NS3 protease from dengue virus». *ACS Chem Biol.*; 8: 2744–2752. <https://doi.org/10.1021/cb400612h> PMID: 24164286

- Yongye, A. B., & Medina-Franco, J. L. (2012). «Data mining of protein-binding profiling data identifies structural modifications that distinguish selective and promiscuous compounds». *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52, 2454–2461.
- Zhivkova, Z., & Doytchinova, I. (2012). «Quantitative structure--plasma protein binding relationships of acidic drugs». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(12), 4627–4641. <https://doi.org/10.1002/JPS.23303>

XI. ANEXOS

Figura 9. Proteasa NS2B/NS3 del virus Zika A) con el inhibidor cn-716 en el sitio activo y B) sin inhibidor. La cadena roja representa la molécula "A" y la azul representa la molécula "B" (código PDB 5LC0).

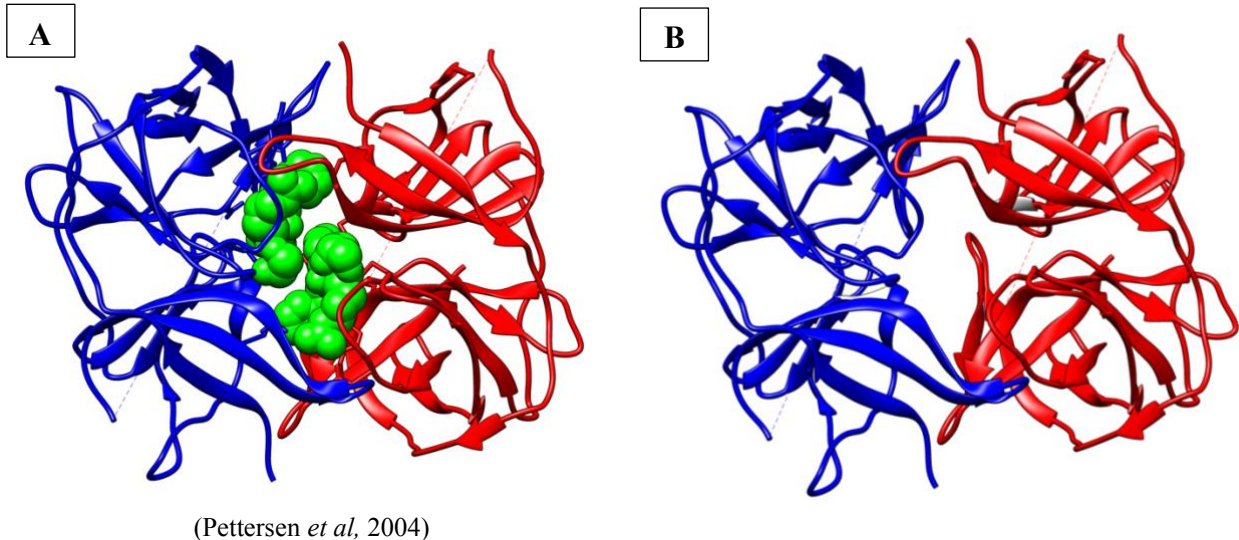


Figura 10. Proteasa NS2B/NS3 del virus Zika con el cubo de interacción molecular (verde) en las coordenadas $x = 90.46$, $y = 49.76$ y $z = 143.94$ y tamaño 40, 54 y 60, respectivamente.

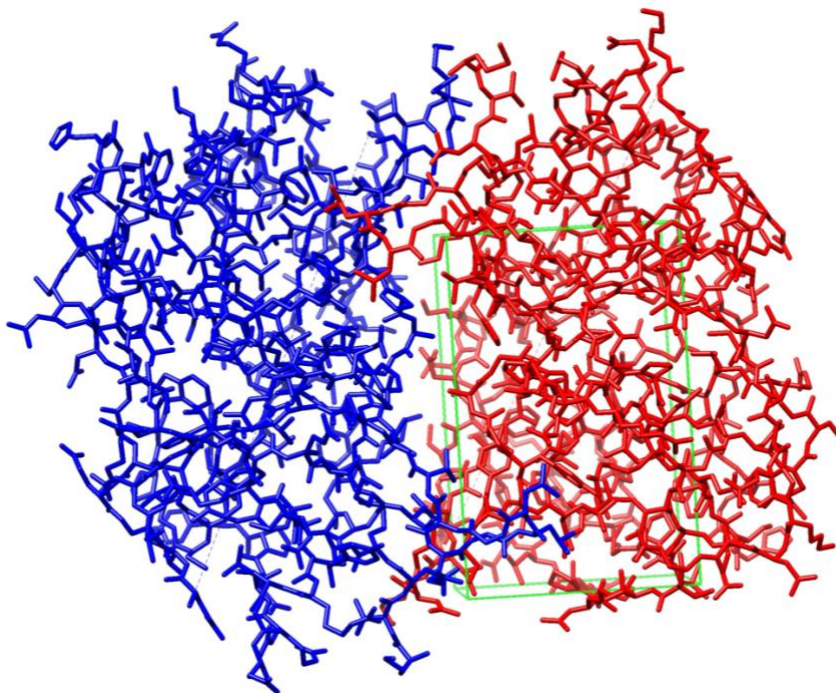


Figura 11. *Script* realizado en RStudio para tratar los resultados obtenidos de ZINCPharmer (paso 3 en Métodos).

```

#Librerias
install.packages('cinf', repos='http://R-Forge.R-project.org')
library('cinf')
install.packages('rcdk')
library('rcdk')
chooseCRANmirror()
install.packages("BiocManager")
library(BiocManager)
BiocManager::install('ChemmineR')
library(ChemmineR)
install.packages('writexl')
library(writexl)

#Cargar base de datos
moleculassdf <- read.SDFset("/Users/anajuarez/Desktop/Universidad/TESIS/query_results.sdf")
moleculassmi <- read.SMIset("TESISAJ/query.smi")

#Crear vector con SMILES en formato adecuado (IAtomObject) (en 3 vectores)
vector <- c()
for (i in 1:length(moleculassmi)){
  mol <- moleculassmi[[i]]
  mol <- as.character(mol)
  mol <- parse.smiles(mol[[1]])
  vector <- c(vector, mol[[1]])
}

#Evaluar ley de Lipinski (en tres vectores)
vector2 <- c()
for (i in 1:length(moleculassmi)) {
  desc <- eval.desc(vector[[i]],"org.openscience.cdk.qsar.descriptors.molecular.RuleOfFiveDescriptor")
  vector2 <- c(vector2, desc)
}

#Juntar listas para crear la lista de Lipinski
listaLipinski <- c(vector4, vector5, vector6)

#Convertir lista a vector que contenga unicamente las fallas de Lipinski

for (i in 1:length(listaLipinski)){
  lip <- listaLipinski[[i]]
  vectorLipinski <- c(vectorLipinski, lip)
}

#Vector nombres
Nombres <- c()
for (i in 1:length(moleculassmi)) {
  nombre <- sdfid(moleculassdf[[i]])
  Nombres <- c(Nombres, nombre[[1]])
}

#Vector SMILES
vectorSmiles <- c()
for (i in 1:length(moleculassmi)) {
  smi <- moleculassmi[[i]]
  smi <- as.character(smi)
  vectorSmiles <- c(vectorSmiles, smi)
}

#Vector RMSD
vectorRMSD <- c()
for (i in 1:length(moleculassmi)) {
  rmsd <- datablock(moleculassdf[[i]])
  vectorRMSD <- c(vectorRMSD, rmsd[[1]])
}

#Crear data frame
dataframeLip <- data.frame(Nombres, vectorSmiles, vectorLipinski, vectorRMSD)

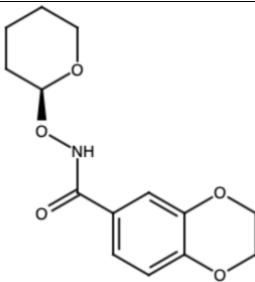
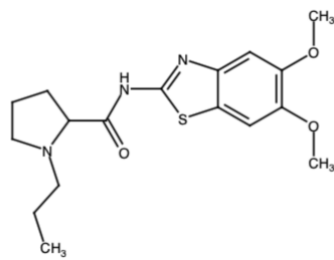
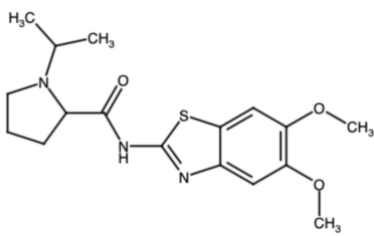
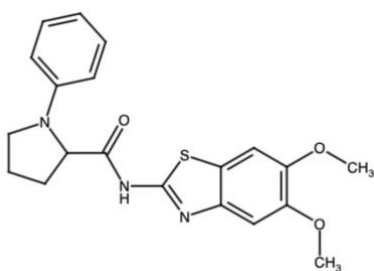
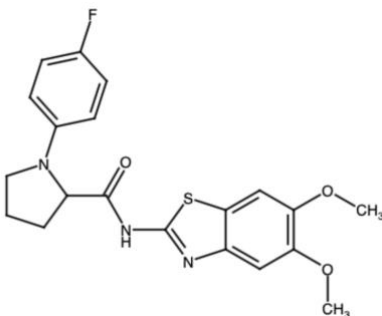
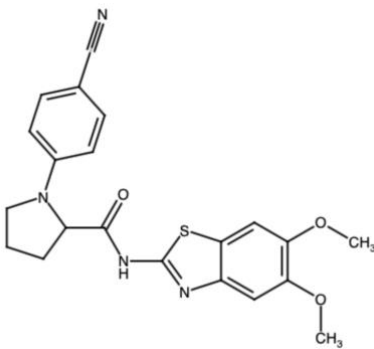
#Exportar como Excel
write_xlsx(dataframeLip, '/Users/anajuarez/Desktop/Universidad/TESIS/LIPINSKI_ZINC.xlsx')

```

Cuadro 9. Moléculas evaluadas en el estudio

Nombre	Código SMILES	Estructura
Curcumina	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C=CC(=O)CC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)OC)O</chem>	
Myricetina	<chem>C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C(=C3O2)O)O)O)O</chem>	
Luteolina	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C(=C3O2)O)O)O)O)O</chem>	
Quercetina	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C(=C3O2)O)O)O)O)O)O</chem>	
R-12	<chem>OC1=C(O)C=C2N=C(NC(=O)[C@@H]3CCCN3S(=O)(=O)C3=CC=C(C(=C3)N(=O)=O)SC2=C1</chem>	
1-ZINC03182810	<chem>CCN(P1(=O)OC(=Nc2c1c(C)nc2c1cccc1)c1cc(OC)c(c(c1)OC)OC)CC</chem>	
2-ZINC78904136	<chem>COc1cc(c(cc1OC)Br)S(=O)(=O)N[C@@H]1CCC[C@@H]1C(=O)N</chem>	
3-ZINC94610804	<chem>CCCC[C@@H]([C@@H](c1ccc(c(c1)OC)O)(O)C)C(=O)[O-]</chem>	

Nombre	Código SMILES	Estructura
4-ZINC83925409	<chem>COc1cc2c(cc1OC)nc([nH]c2=O)c1cc(Cl)c2c(c1)OCCCO2</chem>	
5-ZINC08971844	<chem>COc1c(OC)cc(cc1OC)C(=O)[C@H]1C(=NO[C@@]21C(=O)Nc1c2cccc1)c1ccc(cc1)Cl</chem>	
6-ZINC08971849	<chem>COc1c(OC)cc(cc1OC)C(=O)[C@H]1C(=NO[C@]21C(=O)Nc1c2cccc1)c1ccc(cc1)Cl</chem>	
7-ZINC65567489	<chem>CCN(C(=O)[C@@H]1CSCN1S(=O)(=O)c1ccc2c(c1)OCCCO2)CC</chem>	
8-ZINC71900698	<chem>COC[C@@](C(=O)N)(NS(=O)(=O)c1cc(OC)c(cc1C)OC)C</chem>	
9-ZINC84335291	<chem>O=C(c1cc(Cl)c2c(c1)OCCO2)NO[C@H]1CCCCO1</chem>	

Nombre	Código SMILES	Estructura
10-ZINC84452096	<chem>O=C(c1ccc2c(c1)OCCO2)NO[C@H]1CCCCO1</chem>	
R-12-MOD1	<chem>CCCN1CCCC1C(=O)NC1=NC2=CC(OC)=C(OC)C=C2S1</chem>	
R-12-MOD2	<chem>COC1=C(OC)C=C2N=C(NC(=O)C3CCCN3C(C)C)SC2=C1</chem>	
R-12-MOD3	<chem>COC1=C(OC)C=C2N=C(NC(=O)C3CCCN3C3=CC=CC=C3)SC2=C1</chem>	
R-12-MOD4	<chem>COC1=C(OC)C=C2N=C(NC(=O)C3CCCN3C3=CC=C(F)C=C3)SC2=C1</chem>	
R-12-MOD5	<chem>COC1=C(OC)C=C2N=C(NC(=O)C3CCCN3C3=CC=C(C#N)C=C3)SC2=C1</chem>	

Nombre	Código SMILES	Estructura
5-ZINC-MOD1	<chem>COC1=CC(=CC(OC)=C1OC)C(=O)[C@H]1C=NO[C@]111C(=O)NC2=C1C=C C=C2</chem>	
5-ZINC-MOD2	<chem>CCCC1=NO[C@@]2([C@H]1C(=O)C1=CC(OC)=C(OC)C(OC)=C1)C(=O)NC1=C2C=CC=C1</chem>	
5-ZINC-MOD3	<chem>COC1=NO[C@@]2([C@H]1C(=O)C1=CC(OC)=C(OC)C(OC)=C1)C(=O)NC1=C2C=CC=C1</chem>	
5-ZINC-MOD4	<chem>COC1=CC(=CC(OC)=C1OC)C(=O)[C@H]1C(=NO[C@]111C(=O)NC2=C1C=CC=C2)C(C)C</chem>	
5-ZINC-MOD5	<chem>COC1=CC(=CC(OC)=C1OC)C(=O)[C@H]1C(CCN(C)C)=NO[C@]111C(=O)NC2=C1C=CC=C2</chem>	
6-ZINC-MOD1	<chem>COC1=CC(=CC(OC)=C1OC)C(=O)[C@H]1C=NO[C@@]111C(=O)NC2=C1C=CC=C2</chem>	

Nombre	Código SMILES	Estructura
6-ZINC-MOD2	<chem>CCCC1=NO[C@]2([C@H]1C(=O)C1=CC(OC)=C(OC)C(OC)=C1)C(=O)NC1=C2C=CC=C1</chem>	
6-ZINC-MOD3	<chem>COC1=NO[C@]2([C@H]1C(=O)C1=C(OC)=C(OC)C(OC)=C1)C(=O)NC1=C2C=CC=C1</chem>	
6-ZINC-MOD4	<chem>COC1=CC(=CC(OC)=C1OC)C(=O)[C@H]1C(=NO[C@@]11C(=O)NC2=C1C=CC=C2)C(C)C</chem>	
6-ZINC-MOD5	<chem>COC1=CC(=CC(OC)=C1OC)C(=O)[C@H]1C(CCN(C)C)=NO[C@@]11C(=O)NC2=C1C=CC=C2</chem>	

(ChemAxon, 2021)

Cuadro 10. Descriptores de absorción, distribución, excreción y toxicidad de las moléculas con energía de unión más negativa que -7.5 kcal/mol (binaria).

Nombre	Absorción intestinal en humanos	Unión a proteínas plasmáticas	Depuración	Toxicidad aguda oral en ratas	TOTAL
R-12	1	0	1	1	3
5-ZINC08971844	1	0	0	1	2
6-ZINC08971849	1	0	0	1	2
R-12-MOD4	1	0	1	0	2
R-12-MOD5	1	0	1	0	2
5-ZINC-MOD5	1	1	0	0	2
6-ZINC-MOD1	1	1	0	1	3
6-ZINC-MOD2	1	0	0	0	1
6-ZINC-MOD3	1	1	1	0	3
6-ZINC-MOD4	1	0	0	0	1

Absorción intestinal en humanos: 1 es HIA-, 0 es HIA+

Unión a proteínas plasmáticas: 1 es < 90%, 0 es > 90%

Depuración: 1 es > 5 ml/min/kg, 0 es < 5 ml/min/kg

Toxicidad aguda oral en ratas: 1 es probabilidad de ser tóxico < 0.5, 0 es probabilidad de ser tóxico > 0.5 (Xiong *et al*, 2021)