



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**BÚSQUEDA POR SIMILITUD ESTRUCTURAL DE POTENCIALES
BLANCOS MOLECULARES EN *LEISHMANIA MEXICANA* PARA
COMPUESTOS BENCIMIDAZÓLICOS CON ACTIVIDAD
ANTIPARASITARIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Ramón Gudiño García

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Alicia Hernández Campos



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **María Alicia Hernández Campos**

VOCAL: **Profesor:** **María Eugenia Mendoza Jasso**

SECRETARIO: **Profesor:** **J. Eleazar Martínez Barajas**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **Abel Gutiérrez Ramos**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **César Sebastian Huerta García**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,
LABORATORIO 122, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. César Sebastian Huerta García

SUSTENTANTE:

Ramón Gudiño García

Agradecimientos institucionales

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis a través del proyecto titulado “Síntesis y actividad de nuevos derivados del bencimidazol contra *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi*”, con el número de proyecto 251726 y número de becario 30395.

A la DGTIC, UNAM por el soporte recibido en el uso de la supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL, “Miztli”.

Al programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), UNAM, con proyecto 5000-9133, cuyo apoyo resulta fundamental en el funcionamiento de nuestro laboratorio.

Agradecimientos personales

A la Dra. María Alicia Hernández Campos por todo el conocimiento, guía y entrenamiento que me aportó, y que serán muy útiles para mi vida profesional, así como por su todo su apoyo para mi desarrollo personal y profesional y por dejarme formar parte del Laboratorio 122.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por permitirme formar parte de su gran equipo de investigación en el Laboratorio 122.

Al M. en C. César Sebastián Huerta García por todo su apoyo y orientación para realizar el presente trabajo, así como durante los últimos años de mi carrera.

Al QFB Cristian Alejandro Nava García por su gran ayuda e importante guía para la elaboración del presente trabajo y navegación en los últimos años de mi carrera.

Al Dr. Antonio Romo Mancilla de la Universidad Autónoma de Querétaro y al Dr. Elkin Eduardo Sanabria Chanaga de la Universidad de Pamplona en el Norte de Santander, Colombia por su importante contribución en la realización del presente trabajo.

A los honorables miembros del Jurado por su retroalimentación para el mejoramiento del presente trabajo y su apoyo brindado.

A la Dra. Perla Castañeda López por el soporte y orientación brindados durante la carrera.

A la Dra. María del Consuelo Socorro Sandoval García por sus grandes enseñanzas y contribuir positivamente a mi desarrollo profesional y personal.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y a la Dra. Lilián González Segura por su ayuda para la aplicación al posgrado.

A la M. en I. Karla M. Díaz Gutiérrez, la Dra. Elena Guadalupe Ramírez López y la M. en C. Ivonne Ramírez Wence por su guía y gran ayuda durante mi proceso de titulación.

A mis amigos de la Facultad de Química: Juan, Natalia, Luis Daniel y Alejandra, y a los demás por su sincera amistad, los grandes momentos y apoyo durante la carrera.

A los miembros y amigos del laboratorio 122 por ayudarme a tener una genial experiencia de investigación en el laboratorio 122.

A la Profesora María de Jesús Beltrán Paz por contribuir a mi interés y amor por la química durante mi estancia en la Escuela Nacional Preparatoria 6 Antonio Caso.

A todos los profesores que contribuyeron a mi crecimiento profesional y personal durante la universidad.

Para mis padres, quienes siempre me apoyaron para seguir mis sueños y hacer lo que realmente me apasiona. A mi madre, quien me enseñó valiosas lecciones y ser fuerte desde muy joven. A mi padre, quien me enseñó a buscar y luchar por lo que me apasiona, y alimentó mi interés por el conocimiento y aprendizaje desde muy joven.

A. Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida. Se sabe que existen 9 millones de personas en riesgo por leishmaniasis en nuestro país.

En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos de una búsqueda por similitud estructural realizada en la base de datos de ChEMBL, así como los resultados de los estudios de acoplamiento molecular, dinámica molecular y diseño de fármacos asistido por computado que acompañaron esta búsqueda. La búsqueda se realizó a partir de 25 derivados bencimidazólicos, los cuales fueron diseñados, sintetizados y evaluados como antiparasitarios en nuestro grupo de investigación. Si bien estos compuestos han mostrado actividad biológica, aún no se conoce el blanco molecular sobre el que actúan.

A partir de la búsqueda de moléculas con actividad biológica reportada y estructuralmente semejantes a los compuestos de este estudio, se identificaron los blancos sobre los que actúan. A partir de estos blancos, se realizó un filtrado para finalmente identificar cinco potenciales dianas moleculares presentes en *Leishmania mexicana* para su posterior evaluación en los estudios de acoplamiento molecular consenso utilizando dos programas, MOE y Autodock 4.2.6. De estos blancos, se modeló por homología la estructura de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) en *L. mexicana*, la cual no se encuentra reportada en la base de datos RCSB PDB; la calidad del modelo se validó por medio de diferentes parámetros (diagramas de Ramachandran, MolProbity, etc.).

Con los estudios de acoplamiento molecular entre los 25 derivados bencimidazólicos de partida y los blancos moleculares identificados en *L. mexicana*, así como sus ortólogos en el humano, se determinó que la DHODH_{LM} es el blanco más prometedor. Se pudo llegar a esta conclusión debido a que el promedio de los valores de energía de unión y del coeficiente de selectividad de los compuestos de partida para esta enzima es el más bajo y alto, respectivamente, en ambos programas de acoplamiento utilizados. A partir de

estos resultados, se utilizó una estrategia de evaluación de consenso en donde se identificaron los derivados más prometedores para esta enzima. De manera paralela, los resultados de dinámica molecular en conjunto con el acoplamiento molecular indican que los derivados bencimidazólicos interaccionan con residuos importantes para la actividad de la DHODH y se mantienen en el sitio de unión de interés por el tiempo de la dinámica (25 ns).

Adicionalmente, por medio de un modelo de farmacóforo, se determinó que la presencia del núcleo de bencimidazol clorado y la sulfonamida son características estructurales clave para la interacción con la enzima. Esto permitió diseñar tres compuestos que presentan mejor o igual energía de unión que los compuestos evaluados, poseen las características farmacofóricas deseadas y cumplen con la regla de los cinco de Lipinski.

B. Abreviaturas y símbolos

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
%	Porcentaje	GAPDH_{Lm}	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
1,6-FBP	Fructosa-1,6-bisfosfato	Gln	Glutamina
1,6-FBPAHs	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa en <i>H. sapiens</i>	Glu	Ácido glutámico
1,6-FBPAL_m	Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa en <i>L. mexicana</i>	Gly	Glicina
10 MCS	Coficiente de selectividad dentro de los mejores 10	<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
2,6-FBP	Fructosa-2,6-bisfosfato	HBA	Aceptor de puente de hidrógeno
1,6-MBP	Manitol-1,6-bisfosfato	HBD	Donador de puente de hidrógeno
ABC	Transportadores dependientes de ATP	His	Histidina
Acc	Aceptor de puente de hidrógeno	HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
ACPYE	<i>Ante Chamber Python Parser Interface</i>	HTS	Secuenciación de alto rendimiento
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Hyd	Hidrofóbico
Ala	Alanina	I.V.	Intravenoso
Arg	Arginina	Ile	Isoleucina
Aro	Aromático	<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
Asn	Asparagina	<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
Asp	Ácido aspártico	LABCG2	Transportador dependiente de ATP superfamilia G miembro 2 de <i>Leishmania</i>
ATD4	Autodock 4.2.6	Leu	Leucina
ATP	Adenosín trifosfato	LIT1	Transportador de hierro 1
CL	Leishmaniasis cutánea	LmABCB3	Transportador dependiente de ATP superfamilia B miembro 3 de <i>L. mexicana</i>
CYP51	Esterol 14-demetilasa	Lys	Lisina
Cys	Cisteína	MAPK	Proteína cinasas activada por mitógeno
Dho	Ácido 4,5-dihidroorótico/dihidroorotato	MD	Dinámica molecular
DHODH	Dihidroorotato deshidrogenasa	Met	Metionina
DIFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora	MLR	Mejor que el ligando de referencia
ETD	Enfermedad Tropical Desatendida	MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
GAPDHHs	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en <i>H. sapiens</i>	MSE	Mejor que el sustrato endógeno
NA	No aplica	Tyr	Tirosina
NaCl	Cloruro de sodio	UBCE2HS	Complejo de ubiquitina E2 en <i>H. sapiens</i>

NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido	UBCE2Lm	Complejo de ubiquitina E2 en <i>L. mexicana</i>
Naft	Naftilo	Val	Valina
NAR	Número de anillos aromáticos		
nm	Nanómetro		
NMD	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrosobutan-1-amina		
NPT	Ensamble isobárico-isotérmico		
ns	Nanosegundo		
NVT	Ensamble canónico		
OMS	Organización Mundial de la Salud		
PDB	<i>Protein Data Bank</i>		
Phe	Fenilalanina		
PM	Peso molecular		
Pro	Prolina		
PYKHs	Piruvato cinasa de <i>H. sapiens</i>		
PYKLm	Piruvato cinasa de <i>L. mexicana</i>		
QSAR	Estudios de relación estructura-actividad cuantitativos		
Redox	Reacciones de oxidación y reducción		
RMN	Resonancia magnética nuclear		
RMSD	Desviación cuadrática media de las posiciones atómicas		
RMSF	Fluctuación cuadrática media de las posiciones atómicas		
S50%	Mitad superior del ranking		
Ser	Serina		
S_NAr	Sustitución nucleofílica aromática		
SQM	Mecánica cuántica semiempírica		
TA	Temperatura ambiente		
Thr	Treonina		
TIP3P	Potencial intermolecular transferible con tres puntos		
TND	<i>N</i> -6-(1,2,3,4-tetrahidronaftil)-2'-deoxi-2'-(3,5-dimetoxibenzamido)adenosina		
Trp	Triptófano		

Índice General

1.- INTRODUCCIÓN..... 1

2.- ANTECEDENTES..... 3

2.1. Leishmaniasis.....3

 2.1.1 Generalidades.....3

 2.1.2 Distribución e incidencia.....3

 2.1.3 Etiología y ciclo de parásito.....5

 2.1.4 Manifestaciones clínicas.....8

 2.1.5 Tratamiento.....8

 2.1.6 Avances en el tratamiento de la leishmaniasis.....9

2.2 Desarrollo de fármacos asistido por computadora..... 12

 2.2.1 Generalidades.....12

 2.2.2 Búsqueda por similitud.....13

 2.2.3 Acoplamiento molecular.....17

 2.2.3.1 Acoplamiento molecular: Generalidades.....17

 2.2.3.2 Algoritmos de búsqueda.....18

 2.2.3.3 Funciones de evaluación.....19

 2.2.3.4 Acoplamiento molecular consenso.....21

 2.2.4 Dinámica molecular.....23

 2.2.5 Modelado de proteínas.....24

 2.2.5.1 Generalidades.....24

 2.2.5.2 Modelado comparativo.....25

 2.2.5.3 Evaluación y validación de la calidad del modelo.....26

 2.2.6 Farmacóforo.....28

3.- JUSTIFICACIÓN.....29

4.- HIPÓTESIS..... 31

5.-OBJETIVOS.....32

 5.1 Objetivo general.....32

 5.2 Objetivos particulares.....32

6.- METODOLOGÍA..... 34

 6.1 Diagrama general.....34

 6.2 Búsqueda por similitud estructural.....34

 6.3 Modelado por homología de la dihidroorotato deshidrogenasa.....35

6.4 Acoplamiento molecular consenso.....	37
6.4.1 Preparación de los derivados bencimidazólicos y ligandos de referencia no cristalizados..	37
6.4.2 Preparación de ligandos cocristalizados (ligandos de referencia y/o sustratos endógenos)	39
6.4.3 Preparación de blancos moleculares (proteínas).....	40
6.4.4 Acoplamiento molecular.....	41
6.4.4.1 MOE.....	41
6.4.4.2 Autodock 4.2.6.....	41
6.4.5 Validación del acoplamiento.....	42
6.4.6 Obtención de la diana molecular más prometedora.....	42
6.4.7 Cálculo de coeficiente de selectividad de la energía de unión.....	43
6.4.8 Tratamiento de energía de unión y coeficientes de selectividad por ranqueo.....	43
6.5 Dinámica molecular.....	43
6.6 Construcción del farmacóforo.....	44
6.7 DIFAC.....	46
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
7.1 Búsqueda por similitud estructural.....	47
7.2 Modelado por homología de la DHODHLm.....	55
7.3 Acoplamiento molecular.....	64
7.3.1 Validación.....	64
7.3.2 Resultados globales de energía de unión y coeficiente de selectividad en la energía de unión.....	67
7.3.2.1 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDHLm y GAPDHHs).....	69
7.3.2.2 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (1,6-FBPALm y 1,6-FBPAHs).....	70
7.3.2.3 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la piruvato cinasa (PYKLM y PYKHs).....	72
7.3.2.4 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad del complejo conjugado de ubiquitina E2 (UBCE2Lm y UBCE2Hs).....	73
7.3.2.5 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODHLm y DHODHHs).....	73
7.3.3 Resultados individuales de energía de unión y coeficiente de selectividad en la energía de unión sobre DHODHLm.....	75
7.4 Dinámica molecular.....	83
7.4.1 Resultados del ligando 3.....	84
7.4.2 Resultados del ligando 19.....	93
7.5 Construcción del farmacóforo.....	101
7.6 DIFAC (propuestas y diseño).....	109
8.- CONCLUSIONES.....	121

9.- PERSPECTIVAS.....	122
10.- REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS.....	124
11.- ANEXOS.....	140
11.1 Anexo de la búsqueda por similitud.....	140
11.2 Anexo del modelado por homología.....	148
11.3 Anexo del acoplamiento molecular consenso.....	149
11.4 Anexo de la dinámica molecular.....	153
11.5 Anexo del DIFAC.....	154

Índice de figuras

Figura 1 . Distribución geográfica del número de casos de leishmaniasis visceral de acuerdo con los reportes de la OMS en 2018.....	4
Figura 2 . Distribución geográfica del número de casos de leishmaniasis cutánea de acuerdo con los reportes de la OMS en 2018.....	4
Figura 3 . Zonas endémicas de leishmaniasis en México.....	5
Figura 4 . Representación gráfica del ciclo de vida de <i>Leishmania</i> en el vector y el hospedero (humano.....	7
Figura 5 . Proporción de las vías metabólicas estudiadas para el desarrollo de nuevos tratamientos para la leishmaniasis en los últimos 5 años.....	10
Figura 6 . Clasificación del DIFAC y herramientas que comprende cada clasificación.....	13
Figura 7 . Representación gráfica de distintos tipos de similitud.....	15
Figura 8 . Representación de un fingerprint subestructural de 10 bits, con tres bits establecidos (cuadros sombreados en gris con el número 1) puesto que las subestructuras que representan están presentes en la molécula.....	15
Figura 9 . Representación del tratamiento de datos por ranqueo.....	22
Figura 10 . Ejemplo de la estrategia de evaluación consenso de ranqueo por voto. Se da un voto a aquellos modelos en las 5 mejores posiciones por programa.....	23
Figura 11 . Representación gráfica de una dinámica molecular.....	24
Figura 12 . Protocolo de RosettaCM.....	26
Figura 13 . Representación del diagrama de Ramachandran.....	27
Figura 14 . Representación gráfica de los ángulos Φ y Ψ del enlace peptídico.....	28
Figura 15 . Ejemplo de farmacóforo formado en MOE.....	28
Figura 16 . Esquema general de la metodología empleada en el presente trabajo.....	34
Figura 17 . Representación gráfica de la metodología seguida para la búsqueda por similitud estructural en ChEMBL.....	35
Figura 18 . Algoritmo usado para obtener la estructura molde y resumen de la metodología del modelado por homología.....	36

Figura 19 . Representación de la estrategia de evaluación consenso utilizada para determinar los compuestos para la construcción del farmacóforo y de la metodología usada para la construcción de éste..... 45

Figura 20 . Esquema de la metodología general para la sección de DIFAC..... 46

Figura 21 . Espacio químico de los derivados bencimidazólicos de partida (esferas azules sólidas) y los compuestos obtenidos como resultado de la búsqueda (esferas rojas sólidas)..... 48

Figura 22 . Espacio químico de los antiparasitarios aprobados por la FDA obtenidos de la base de datos ZINC³², derivados bencimidazólicos y compuestos resultados de la búsqueda..... 49

Figura 23 . Espacio químico de antiparasitarios aprobados por la FDA, bencimidazoles de partida, fármacos aprobados y compuestos resultantes de la búsqueda..... 50

Figura 24 . Representación 2D de los sitios S1 (catalítico) y S2 (sitio adyacente y acceso al sitio catalítico) de la DHODHLM en presencia del producto de la reacción (orotato), así como del sitio adyacente nombrado S3..... 54

Figura 25 . Alineamiento de las secuencias de la DHODHLM y la 3MHU en Clustal Omega..... 56

Figura 26 . Estructura de la DHODHLM modelada en Robetta..... 56

Figura 27 . Alineamiento estructural de la proteína molde en color morado (3MHU) y la modelada en Robetta en color verde (DHODHLM)..... 57

Figura 28 . Diagrama de Ramachandran general de la proteína DHODHLM modelada generado en Molprobit..... 58

Figura 29 . Representación gráfica de la calidad de la estructura de la DHODHLM modelada generada por A) QMEAN y B) ModFOLD6..... 61

Figura 30 . Calidad local del modelo DHODHLM por el servidor QMEAN..... 62

Figura 31 . Evaluación local del modelo DHODHLM obtenida usando el servidor MolFOLD6..... 63

Figura 32 . Calidad local por residuo y código de colores con base en los valores de QMEAN4 locales [0,1]..... 63

Figura 33 . Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLM y el ligando 1..... 76

Figura 34 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 1..... 77

Figura 35 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 1 en el sitio de unión..... 78

Figura 36 . Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLM y el ligando 16..... 78

Figura 37 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 16 obtenido en MOE..... 79

Figura 38 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 16 obtenido en ATD4..... 80

Figura 39 . Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLM y el ligando 10..... 80

Figura 40 . Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLM y el ligando 10..... 81

Figura 41 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 10..... 82

Figura 42 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 10..... 82

Figura 43 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 10 en el sitio de unión..... 83

Figura 44 . Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 10 en el sitio de unión..... 83

Figura 45 . Valores de RMSD del ligando 3 en el lapso de la MD (25 ns)..... 84

Figura 46 . Representación del complejo DHODHLM-ligando 3 inicial de la MD..... 86

Figura 47 . Representación del complejo DHODHLM-ligando 3 a los 5000 ps de la MD..... 87

Figura 48 . Complejo 3D Ligando 3-DHODHLM a los 8500 ps de la MD..... 88

Figura 49 . Representación del complejo DHODHLM-ligando 3 al final de la dinámica..... 89

Figura 50 . RMSF de la cadena principal y lateral de los residuos de la DHODHLM en presencia del ligando 3..... 91

Figura 51 . Puentes de hidrógeno presentes entre la DHODHLM y el ligando 3 durante la MD..... 92

Figura 52 . Pares de átomos ligando 3-receptor dentro de 0.35 nm durante la MD..... 93

Figura 53 . Valores de RMSD del ligando 19 en el lapso de la MD (25 ns)..... 94

Figura 54 . RMSF de la cadena lateral y principal de los residuos de la DHODHLm en presencia del ligando 19.....	95
Figura 55 . Puentes de hidrógeno presentes entre la DHODHLm y el ligando 19 durante la MD.....	96
Figura 56 . Pares de átomos ligando 19-receptor dentro de 0.35 nm durante la MD.....	97
Figura 57 . Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 19 en el punto inicial de la MD.....	98
Figura 58 . Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 19 a los 10000 ps de la MD.....	98
Figura 59 . Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 19 a los 20000 ps de la MD.....	99
Figura 60 . Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 19 a los 25000 ps de la MD.....	99
Figura 61 . Farmacóforo del ligando 10.....	106
Figura 62 . Diagrama 2D de interacciones entre la DHODHLm y el ligando 10.....	107
Figura 63 . Farmacóforo del ligando 16.....	108
Figura 64 . Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLm y el ligando 16.....	108
Figura 65 . Esquema de los resultados de las transformaciones en Medchem y los filtros para el DIFAC.....	110
Figura 66 . Espacio químico de los 25 derivados bencimidazólicos de partida y los 71 compuestos obtenidos en DIFAC.....	110
Figura 67 . Espacio químico de los compuestos obtenidos por DIFAC, antiparasitarios aprobados, bencimidazoles de partida y fármacos aprobados por la FDA.....	111
Figura 68 . Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando. A) receptor- ligando 32; B) receptor- ligando 49; C) receptor- ligando 60.....	114
Figura 69 . Diagrama 2D de interacciones entre la DHODHLm y el ligando 32.....	115
Figura 70 . Diagrama 2D de interacciones entre la DHODHLm y el ligando 49.....	116
Figura 71 . Diagrama 2D de interacciones entre la DHODHLm y el ligando 60.....	117
Figura 72 . Estrategia de síntesis para los ligandos 32, 49 y 60.....	119
Figura 73 . Estrategia alternativa utilizando (Fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo.....	120
Figura 74 . Diagramas de Ramachandran de la proteína DHODHLm modelada generados en Molprobability.....	148

Índice de tablas

Tabla 1 . <i>Especies de Leishmania representativas y su localización geográfica</i>	6
Tabla 2 . Principales fármacos usados para el tratamiento para la leishmaniasis junto a sus principales características y desventajas.....	9
Tabla 3 . <i>Principales rutas metabólicas y enzimas que se han estudiado para el tratamiento de la leishmaniasis</i>	11
Tabla 4 . Estructura química de los 25 derivados bencimidazólicos de partida.....	38
Tabla 5 . Ligandos cristalizados usados como referencia en el acoplamiento molecular y/o validación.....	39
Tabla 6 . Resolución en Å de las estructuras cristalográficas de las proteínas encontradas.....	41
Tabla 7 . Dimensiones de la malla de prisma rectangular construida en Autogrid 4.2.6 para cada proteína estudiada.....	42
Tabla 8 . Blancos presentes en <i>L. mexicana</i> e identificados como importantes para la supervivencia del parásito, así como sus ortólogos humanos. También se muestran los residuos que forman parte de los sitios de unión seleccionados de interés.....	50
Tabla 9 . Proteína elegida como molde y los parámetros de alineamiento obtenidos en BLAST.....	55
Tabla 10 . Resultados principales de la evaluación del modelo utilizando MolProbability.....	59

Tabla 11 . Ligandos cristalizados de referencia para las dianas en <i>L. mexicana</i>	64
Tabla 12 . Ligandos cristalizados de referencia para las dianas en <i>H. sapiens</i>	65
Tabla 13 . Valores de RMSD obtenidos para la validación del acoplamiento molecular en MOE y ATD4.....	67
Tabla 14 .Valores de energía de unión promedio y coeficiente de selectividad en energía de unión obtenidos en MOE para los 25 derivados bencimidazólicos y los ligandos de referencia.....	68
Tabla 15 . Valores de energía de unión promedio y coeficiente de selectividad en energía de unión obtenidos en ATD4 para los 25 derivados bencimidazólicos y los ligandos de referencia.....	71
Tabla 16 . Resumen de resultados de acoplamiento molecular entre los derivados bencimidazólicos y dianas estudiadas.....	74
Tabla 17 . Valores de energía de unión entre DHODHLm, DHODHs, los derivados bencimidazólicos y ligandos de referencia, así como los coeficientes de selectividad correspondientes.....	75
Tabla 18 . Residuos de la proteína DHODHLm con los que interactúa el ligando 3 durante la MD..	89
Tabla 19 . Residuos de DHODHLm que interactúan con el ligando 19 durante la MD.....	100
Tabla 20 . Energía de unión de los ligandos 3 y 19 obtenida en MD durante los últimos 5 ns.....	101
Tabla 21 .Tratamiento de los valores de energía entre los derivados bencimidazólicos, ligandos de referencia y la DHODHLm.....	102
Tabla 22 . Tratamiento de los valores de coeficiente de selectividad sobre la DHODHLm, en términos de energía, de los derivados bencimidazólicos.....	103
Tabla 23 . Resultados de la estrategia de ranqueo por voto para los derivados bencimidazólicos.	104
Tabla 24 . Compuestos obtenidos del DIFAC con los mejores valores de energía de unión y coeficiente de selectividad.....	113
Tabla 25 . Compuestos resultantes de la búsqueda por similitud estructural, los cuales presentan actividad biológica, potencia reportada y blanco conocido.....	140
Tabla 26 . Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre GAPDHLm, así como energía de unión a GAPDHHs de los 25 derivados bencimidazólicos.....	149
Tabla 27 . Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre 1,6-FBPALm, así como energía de unión a 1,6-FBPAHs de los 25 derivados bencimidazólicos.....	150
Tabla 28 . Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre PYKLm, así como energía de unión a PYKHs de los 25 derivados bencimidazólicos.....	151
Tabla 29 . Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre UBCE2Lm, así como energía de unión a UBCE2Hs de los 25 derivados bencimidazólicos.....	152
Tabla 30 . Valores de energía del ligando 3 en presencia de la DHODHLm.....	153
Tabla 31 . Valores de energía del ligando19 en presencia de la DHODHLm.....	153
Tabla 32 . Energías de unión a la DHODHLm y DHODHHs, así como coeficientes de selectividad de los 71 compuestos obtenidos por DIFAC después de los filtros (regla de los cinco de Lipinski y presencia de núcleo de bencimidazol).....	154
Tabla 33 . Los 71 ligandos obtenidos por medio del DIFAC y después de los filtros, junto con su SMILE.....	156

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1 . Ecuación de Tanimoto.....	16
Ecuación 2 . Índice de Tversky vectorizado para dos fingerprints (A y B) usado por el algoritmo de búsqueda de ChEBML.....	17
Ecuación 3 . Función de campo de fuerza de Autodock 4.....	20
Ecuación 4 . Función de evaluación London dG.....	21
Ecuación 5 . Función general de la dinámica molecular.....	23
Ecuación 6 . Modelo matemático para el cálculo del coeficiente de selectividad de la energía de unión.....	43

1.- Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por especies del protozoo flagelado del género *Leishmania*, transmitido al humano por la mordedura de mosquitos infectados con el parásito. Esta parasitosis es considerada por la OMS como una de las siete enfermedades tropicales más importantes en el mundo y una enfermedad tropical desatendida, que puede tener un resultado fatal en caso de no ser tratada adecuadamente. Se sabe que la leishmaniasis afecta alrededor de 12 millones de personas en el mundo y produce un millón de nuevos casos y hasta 65 mil defunciones cada año.

Esta enfermedad es endémica de regiones en África, Sur de Europa y Asia, el Medio Oriente, México, Centroamérica y Sudamérica. Dentro de México, las principales zonas afectadas por la enfermedad se encuentran en el sureste del territorio. Su tratamiento se basa principalmente en fármacos tóxicos, de difícil acceso para los países afectados y para los que en la mayoría de los casos el parásito muestra resistencia.

En la actualidad, el conocimiento y empleo de métodos computacionales o *in silico* dentro de la investigación en el área de la química farmacéutica ha permitido un gran aceleramiento en el desarrollo y descubrimiento de moléculas con potencial terapéutico y blancos moleculares prometedores para su potencial uso en el desarrollo de nuevos fármacos.

Anteriormente, en nuestro grupo de investigación se han desarrollado diferentes derivados benimidazólicos que han demostrado actividad terapéutica en contra de distintos parásitos en estudios *in vitro*, incluyendo *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*. De igual forma, se han realizado estudios apoyados con herramientas computacionales con la finalidad de entender el mecanismo por el cual actúan y la manera en que interaccionan con el parásito, tales como estudios de acoplamiento y dinámica molecular. Sin embargo, aún se desconoce el blanco molecular sobre el que actúan muchos de ellos.

Por lo cual, en el presente trabajo se realizó la identificación de potenciales dianas biológicas en *L. mexicana*, apoyado de la búsqueda por similitud estructural en la base de datos de ChEMBL a partir de 25 derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria conocida, pero cuyo blanco sobre el actúan no se conoce.

De manera conjunta, se realizaron estudios de acoplamiento molecular, dinámica molecular y construcción de farmacóforo con la finalidad de determinar el blanco más prometedor para los compuestos de partida, y encontrar las interacciones adecuadas para la unión de estos ligandos a dicho blanco y con ello diseñar otros compuestos basados en este conocimiento.

2.- Antecedentes

2.1. Leishmaniasis

2.1.1 Generalidades

La leishmaniasis o leishmaniosis es una enfermedad tropical desatendida (ETD) que afecta a una vasta población en las áreas tropicales y subtropicales en el mundo, y de la cual se conocen tres formas clínicas principales: visceral (la forma más grave de la enfermedad); cutánea (la más común); y mucocutánea.¹ Es causada por especies del protozoo flagelado del género *Leishmania*, transmitidas al ser humano por la mordedura de moscas de los arenales (*Phlebotomus* y *Lytzomya*) hembras infectadas con el parásito.^{1,2}

2.1.2 Distribución e incidencia

La leishmaniasis es endémica en 98 países y afecta a 12 millones de personas en el mundo.^{1,2} Se estima que alrededor de 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad en 88 países.²⁻⁴ Con este respecto, en un reporte del 2016 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estimó que existen 399 millones de personas en 11 países altamente endémicos en riesgo de desarrollar leishmaniasis cutánea, y alrededor de 556 millones de individuos en los 12 países más infectados en peligro de contraer leishmaniasis visceral.⁵ Cada año, se reportan hasta 1 millón de nuevos casos, y de 20,000 a 30,000 muertes a causa de leishmaniasis en las zonas endémicas, por lo que esta enfermedad parasitaria constituye un importante problema de salud pública.^{1,3,5}

Esta parasitosis se encuentra asociada con la pobreza, precarias condiciones de vivienda, pobres medidas sanitarias y de higiene, desplazamientos poblacionales, así como con una alimentación baja en proteínas, vitamina A y algunos minerales. Por lo cual aquellos países que sufren de dichos problemas son los que presentan una mayor prevalencia de la enfermedad.^{1,2} En 2018, más del 95 % de los casos reportados de leishmaniasis visceral (VL, por sus siglas en inglés) ocurrieron en diez países: Brasil, China, Etiopía, India, Iraq, Kenia, Nepal, Somalia, Sudán del Sur y Sudán (Figura 1).^{1,6}

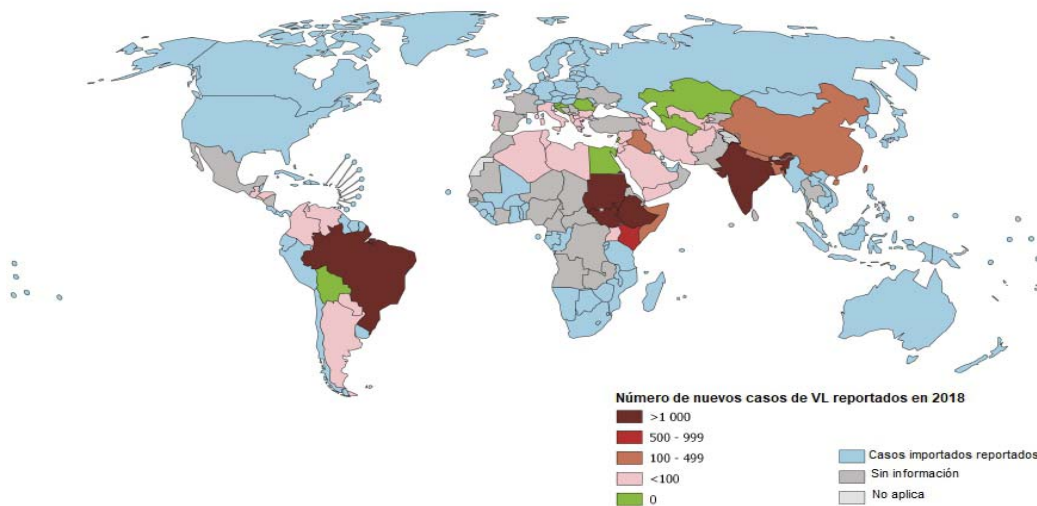


Figura 1. Distribución geográfica del número de casos de leishmaniasis visceral de acuerdo con los reportes de la OMS en 2018.⁶

Por otro lado, el 85 % de los casos de leishmaniasis cutánea (CL, por sus siglas en inglés) ocurrieron en Afganistán, Argelia, Bolivia, Brasil, Colombia, Irán, Iraq, Pakistán, Siria y Túnez. Mientras que más del 90 % de los casos de leishmaniasis mucocutánea ocurrieron entre Bolivia, Brasil, Etiopía y Perú (Figura 2).^{1,6}

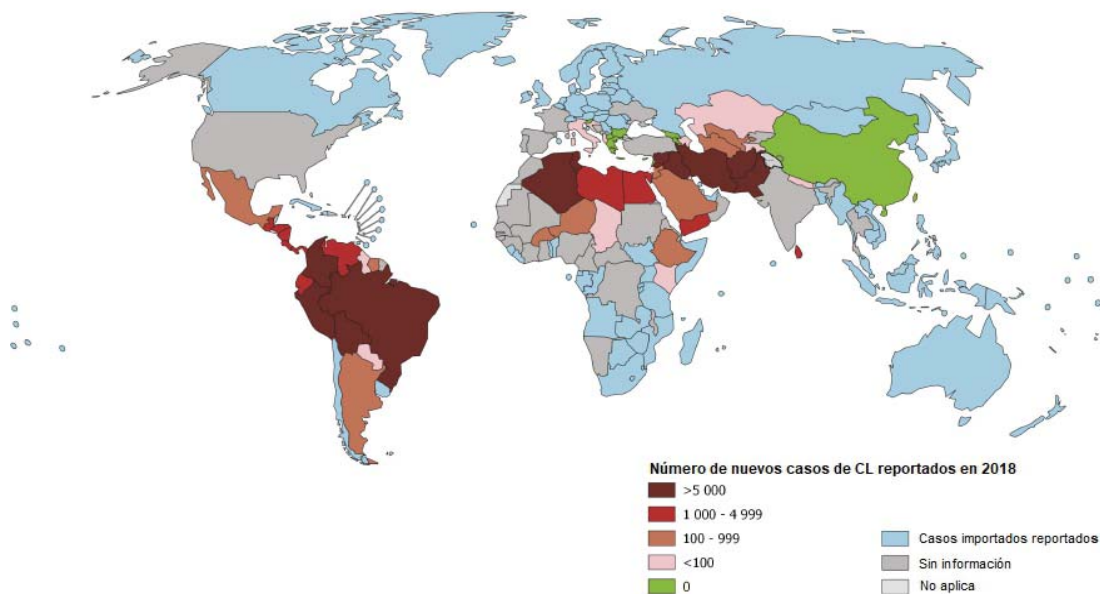


Figura 2. Distribución geográfica del número de casos de leishmaniasis cutánea de acuerdo con los reportes de la OMS en 2018.⁶

En México, la leishmaniasis generalmente se presenta en áreas agrícolas donde se siembra y cosecha cacao, café o árboles chicleros, razón por la cual en esta región a la leishmaniasis también se le denomina “úlceras de los chicleros”. Existen 9 millones de personas en riesgo por leishmaniasis en México, las cuales están distribuidas en 13 entidades federativas: Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Morelos y Puebla (Figura 3).⁷



Figura 3. Zonas endémicas de leishmaniasis en México.⁷

Debido a que esta enfermedad se localiza en zonas remotas en donde existe poca asistencia médica y ciertos estigmas socioculturales relacionados con la presentación clínica de la enfermedad, no todos los casos de leishmaniasis son diagnosticados, lo que dificulta saber el impacto real de la enfermedad.^{2,8}

2.1.3 Etiología y ciclo de parásito

Los parásitos del género *Leishmania* son protozoos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*.³ Se conocen alrededor de 90 especies patógenas transmisoras de *Leishmania* y más de 20 especies de *Leishmania* han demostrado ser patógenas en mamíferos, incluyendo animales

domésticos y selváticos.^{1-3,8} La Tabla 1 muestra algunas de las especies más comunes de *Leishmania* y las regiones dónde se encuentran.

Tabla 1. Especies de *Leishmania* representativas y su localización geográfica⁸

Especie	Región	Especie	Región
<i>L. Donovanii</i>	India, China, Bangladesh	<i>L. aethiopica</i>	Etiopía, Kenia
<i>L. archibaldi</i>	Sudán Eipía	<i>L. gerbilli</i>	China, Mongolia
<i>L. infantum</i>	Centro y norte de Asia, noreste de China, Oriente Medio, noreste de África	<i>L. mexicana</i>	México, Belice, Guatemala, sur de Estados Unidos
<i>L. chagasi</i>	América central y del sur	<i>L. amazonensis</i>	Baja Amazonas y Brasil
<i>L. tropica</i>	Áreas urbanas de Próximo Oriente e India	<i>L. venezuelensis</i>	Venezuela
<i>L. killicki</i>	Túnez	<i>L. braziliensis</i>	Brasil
<i>L. major</i>	África, Oriente Medio, norte de Asia	<i>L. peruviana</i>	Oeste de los Andes
<i>L. arabica</i>	Arabia Saudita	<i>L. panamensis</i>	Panamá, Costa Rica

Los parásitos de *Leishmania* son transmitidos al animal huésped por medio de dos distintos géneros de moscas de los arenales (*Psychodidae*) hematófagas: *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lytzomya* en el nuevo mundo.^{1,3,8}

La mayor parte de las leishmaniosis son zoonosis parasitarias en las que diferentes especies de animales actúan como reservorios del parásito, aunque algunas pueden ser del tipo antroponótico.^{3,8,9} El ciclo de vida de *Leishmania* está caracterizado por dos morfologías distintas: la elongada y flagelada, promastigote, encontrada en el tracto gastrointestinal del vector hembra (mosca de arenal), y la inmóvil y circular, amastigote, presente en circulación sanguínea y tejidos del mamífero hospedero.^{3,8}

El ciclo (Figura 4) comienza cuando un vector infectado pica y se alimenta de sangre de un hospedero, donde regurgita al parásito en su forma promastigote hacia éste. Subsecuentemente, los promastigotes son endocitados por células dendríticas y macrófagos en la capa dermal de la piel. Una vez dentro de estas

células, se diferencian en amastigotes y se multiplican dentro del fagolisosoma por fisión binaria mientras evaden la degradación por las enzimas lisosomales. Una vez que el macrófago o célula dendrítica se lisa, los amastigotes se diseminan vía el sistema linfático y circulatorio con la finalidad de infectar a otros macrófagos del sistema reticuloendotelial. Estos parásitos persisten en los macrófagos en bazo, médula ósea, hígado y nodos linfáticos, induciendo inflamación y hematopoyesis exacerbadas. Así, los pacientes infectados sirven como reservorios de *Leishmania* y pueden infectar a otros vectores o mosquitos cuando estos se alimentan de la sangre del paciente con macrófagos infectados con el parásito. Después de que dichos macrófagos son ingeridos por el mosquito, durante 4 a 25 días los amastigotes siguen su desarrollo y se transforman a promastigotes en el intestino medio del insecto, se multiplican y migran al extremo proximal del intestino (faringe, boca y probóscide), donde permanecen hasta el siguiente ciclo de transmisión vector-hospedador.^{8,10}

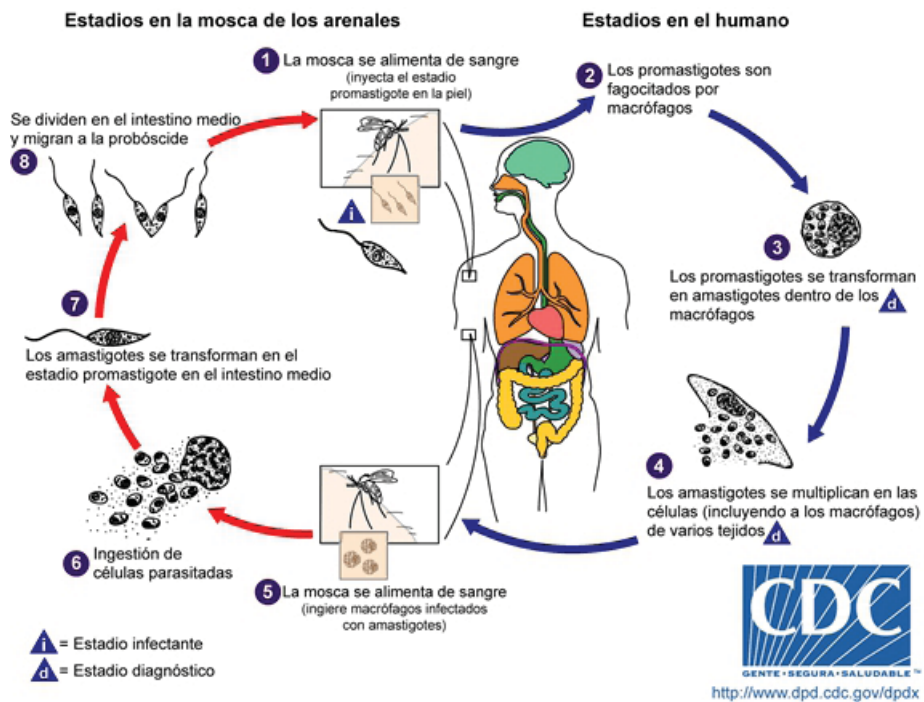


Figura 4. Representación gráfica del ciclo de vida de *Leishmania* en el vector y el hospedero (humano).¹⁰

2.1.4 Manifestaciones clínicas

Las características clínicas de la leishmaniasis dependen de distintos factores, incluyendo la forma clínica de la misma (visceral, cutánea y mucocutánea), la especie de *Leishmania* causante de la enfermedad, la biología del vector y la respuesta inmune del hospedero.^{3,11}

La leishmaniasis visceral es la forma clínica más severa de la enfermedad, capaz de llevar a la muerte si no se trata de manera oportuna.^{1,3} Las manifestaciones clínicas de esta forma pueden comenzar de manera aguda o gradual, dentro de un lapso de dos semanas hasta ocho meses.^{3,9} Esta forma se caracteriza por fiebre persistente, hepatomegalia, esplenomegalia, pancitopenia, pérdida de peso e hipergammaglobulinemia. En algunas regiones del sur de Asia, se puede presentar una hiperpigmentación (kala-azar).^{1,3,11} La segunda forma de la enfermedad, la cutánea, es la más común de todas.^{1,11} Se sabe que *L. mexicana* causa principalmente esta forma de la enfermedad, la cual se manifiesta generalmente como lesiones papulosas en el sitio de mordedura del insecto, las cuales incrementan de tamaño y se ulceran con el tiempo, pero no son dolorosas a pesar de su aspecto.^{3,9,11} Finalmente, la forma mucocutánea causa la destrucción parcial y completa de las membranas mucosas de nariz, boca y garganta.^{1,9}

2.1.5 Tratamiento

El tratamiento para la leishmaniasis es variado y depende del tipo de la enfermedad, la especie del parásito, ubicación geográfica, el vector y características asociadas al paciente.¹² Este tratamiento se basa principalmente en el uso de diferentes fármacos, los cuales tienen diferentes efectos secundarios no deseados, alta toxicidad, presentan un alto costo para los países endémicos de la enfermedad y ante los que muchas veces el parásito muestra resistencia. Aunado a esto, no existe una vacuna para la prevención eficaz de la enfermedad, y se ha observado que la coinfección con el VIH complica el tratamiento de la enfermedad. La Tabla 2 resume las características principales de los fármacos más empleados

para el tratamiento de la leishmaniasis, así como las desventajas asociadas con el uso de éstos.

Tabla 2. Principales fármacos usados para el tratamiento para la leishmaniasis junto a sus principales características y desventajas^{5,12,13}

Fármaco	Características	Desventajas
Antimoniales	Fármaco de primera línea contra CL y VL. Disponibles como antimonio de meglumina y estibogluconato de sodio. Inhibe las rutas glucolíticas y oxidativas en el amastigote.	Hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y resistencia. Complejo régimen terapéutico. Puede causar mialgia, fiebre, dolor de cabeza, anorexia, vómito, mareo y artralgia.
Anfotericina B	Fármaco de segunda línea contra leishmaniasis. Es un polieno fungicida que ha demostrado ser prometedor para el tratamiento de VL, y que se administra I.V. debido a su baja biodisponibilidad oral. Está presente en cuatro formulaciones distintas y actúa tanto sobre amastigotes como promastigotes, aumentando la permeabilidad de la membrana al actuar sobre el ergosterol.	Costoso y generalmente solo disponible a través de organismos internacionales. Está asociada con fiebre, vómito, náusea, escalofríos, hipocalcemia, nefrotoxicidad, problemas del corazón e incluso la muerte. Existen especies resistentes y su administración sólo puede llevarse a cabo en hospitales capacitados.
Pentamidina	Fármaco de segunda línea. Es una dibenzamidina que actúa sobre la síntesis de ADN.	Los principales efectos adversos son hipotensión, mialgia, absceso en el sitio de aplicación, hipoglicemia y diabetes mellitus.
Miltefosina	Fármaco de tercera línea para el tratamiento de leishmaniasis. Es el único tratamiento oral disponible para VL y CL.	Su larga vida media incrementa el riesgo de teratogenicidad y resistencia. Está asociado con malestares gastrointestinales, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad.
Paromomicina	Es un aminoglucósido que es utilizado sólo o en conjunto con gentamicina contra diferentes parasitosis, incluyendo la leishmaniasis.	Puede presentar un alto costo para los países endémicos. Los principales efectos adversos son ototoxicidad y dolor en la administración del fármaco.

2.1.6 Avances en el tratamiento de la leishmaniasis

Debido a los problemas e inconvenientes asociados con los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la leishmaniasis (Tabla 2) y a que normalmente se requiere una terapia combinatoria para obtener verdaderos resultados,¹² existe un gran interés en el desarrollo de nuevos tratamientos para la leishmaniasis. En

este sentido hay investigación en el desarrollo de productos derivados basados en las estructuras químicas de los actuales fármacos,¹⁴ de productos naturales,^{15,16} y de otras estructuras con potenciales antiparasitario y antiinfectivos, como benzoxazoles,¹⁷ imidazoles,¹⁸ chalconas,^{19,20} quinolinas,²¹ derivados del benzimidazol,²²⁻²⁴ entre otras.³

Actualmente, las principales terapias disponibles involucran en su mecanismo de acción diferentes dianas moleculares.²⁵ Las enzimas que participan en la vía glucolítica (la principal fuente de energía del parásito), la biosíntesis de nucleótidos, y los metabolismos del hierro y antioxidante han sido de principal interés en estudios para el desarrollo de nuevos tratamientos para leishmaniasis en los últimos cinco años^{25,26} (Ver Figura 5)



Figura 5. Proporción de las vías metabólicas estudiadas para el desarrollo de nuevos tratamientos para la leishmaniasis en los últimos 5 años.²⁵

En la mayoría de los casos se busca una gran diferencia genética y estructural entre el blanco molecular presente en parásito y su ortólogo en el humano, y que la inhibición de éste lleve a la muerte del parásito.^{25,26} Ejemplos son la piruvato cinasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (vía glucolítica), el sistema

redox transmembranal (metabolismo antioxidante), HMG-CoA (síntesis de esteroides), y arginasa (metabolismo de poliaminas).²⁵ (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Principales rutas metabólicas y enzimas que se han estudiado para el tratamiento de la leishmaniasis²⁵⁻²⁹

Ruta metabólica	Función	Principales blancos estudiados
Glucólisis	Principal ruta por la cual el patógeno obtiene su energía	Piruvato cinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, cinasa fosfoglicerato, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, e isomerasa glucosa-6-fosfato.
Ácidos grasos y esteroides	Síntesis de moléculas que son vitales para la estructura y función de la membrana celular.	Escualeno sintetasa, esteroil metiltransferasa, HMG-CoA, y CYP51.
Folato	Los folatos actúan como cofactores en la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo de aminoácidos.	Timidilato sintasa, dihidrofolato reductasa, y pteridina reductasa 1.
Poliamina	Policaciones de bajo peso molecular que son importantes para procesos de diferenciación y proliferación. Juegan un papel importante en la síntesis de tripanotiona, que combate el estrés oxidativo.	Arginasa, ornitina descarboxilasa, espermidina sintasa, tripanotiona sintetasa, y tripanotiona reductasa.
Nucleótidos	Bloques para la síntesis de ácidos nucleicos.	Hipoxantina-guanina, xantina y adenina fosforibosiltransferasas.
Redox	Permiten su supervivencia en el macrófago.	Tripanotiona sintetasa, tripanotiona reductasa y triparedoxina peroxidasa.
Hierro	Importante para la diferenciación, virulencia y protección del patógeno.	LIT1, superóxido dismutasa, y los transportadores ABC LmABCB3 y LABCG2.

MAPK	Juegan un papel importante en proliferación, diferenciación, regulación del estrés y apoptosis.	MAPKs principalmente. 1,2,3,4
Topoisomerasas	Necesarias para los procesos de replicación, transcripción y reparación	Topoisomerasa I y II

2.2 Desarrollo de fármacos asistido por computadora

2.2.1 Generalidades

El espacio químico es el conjunto de todas las moléculas orgánicas posibles, de las cuales se estima existen al menos 10^{63} .³⁰ Lo cual incluye a los compuestos que forman parte de los organismos vivos, fármacos y los materiales empleados en nuestra vida cotidiana.³¹ Por lo tanto, el estudio de este espacio químico para la identificación de moléculas orgánicas activas y el posterior desarrollo de fármacos es una tarea ardua.^{30,31} Por fortuna, millones de estos compuestos se encuentran clasificados y almacenados en diferentes bases de datos, tales como ZINC,³² BindingDB,³³ ChEMBL³⁴ y PubChem.³⁵

La mayoría de los medicamentos que están en uso clínico son el resultado de un proceso de investigación muy complejo, largo y costoso.^{36,37} Por lo mismo, es necesaria la unión de esfuerzos de diferentes disciplinas científicas para descubrir y desarrollar medicamentos con efectos clínicos benéficos y mínimos efectos secundarios.³⁶ En la actualidad, las herramientas del diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) actúan como un atajo virtual, asistiendo en el aceleramiento de este largo proceso y reduciendo potencialmente los costos de investigación y desarrollo. Por esta razón, estas herramientas han llegado a ser indispensables y efectivas en el desarrollo de productos farmacéuticos.³⁷ El DIFAC puede ser clasificado en dos categorías generales: basado en estructura y basado en ligando (Figura 6). La primera descansa en el conocimiento sobre la estructura de la proteína objetivo o diana molecular para calcular las energías asociadas con la interacción entre los compuestos evaluados y una diana molecular dada; mientras que el DIFAC basado en ligando hace uso del conocimiento de

moléculas activas e inactivas conocidas a través de búsquedas por similitud química (*target fishing*) o la construcción predictiva, modelos de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), etc.^{37,38}



Figura 6. Clasificación del DIFAC y herramientas que comprende cada clasificación.^{37,38}

2.2.2 Búsqueda por similitud

Los compuestos huérfanos se definen como aquellos compuestos que tienen un efecto en el fenotipo celular o presentan una actividad biológica identificada, pero cuyo blanco molecular no se conoce.³⁹ El método por el cual se busca un potencial blanco para una molécula dada utilizando las bases de datos es conocido como *target fishing in silico* o computacional. Esta tecnología permite la predicción de dianas biológicas de compuestos con base en la estructura química utilizando información biológica almacenada y organizada en las bases de datos químicas (ZINC,³² ChEMBL,³⁴ etc.). Esta herramienta también permite identificar blancos

adicionales para compuestos con mecanismos de acción conocidos, así como blancos no deseados que permiten la predicción de efectos adversos generados por un compuesto evaluado.⁴⁰ Se han desarrollado diferentes métodos para realizar el *target fishing*, entre ellos los principales son: búsqueda por similitud química/molecular, minería de datos/aprendizaje automatizado, acoplamiento inverso en panel y análisis de espectros de bioactividad.⁴¹ De manera general, el *target fishing* se puede dividir en métodos basado en ligando y métodos basados en la diana molecular. Los métodos basados en el blanco usan la información de proteínas diana, los cuales incluyen acoplamiento inverso, comparación de similitud entre la secuencia de proteínas o los sitios de unión, etc. Por otro lado, los métodos basados en ligando simplifican el problema al uso de búsqueda por similitud y usan solamente la información del ligando para predecir el blanco correspondiente.⁴²

La búsqueda por similitud química y molecular está basada en el principio de similitud química, el cual establece que moléculas similares tienen la probabilidad de tener las mismas propiedades (siendo la biológica la más importante). Por lo que estos métodos predicen los potenciales blancos de una molécula de partida, identificando proteínas con ligandos conocidos que son altamente similares a los compuestos de prueba o de partida.⁴¹

A pesar de que los términos de similitud química y molecular suelen usarse de manera indiferente, existen diferencias sutiles que deben considerarse. La similitud química está basada principalmente en las características fisicoquímicas de los compuestos (solubilidad, punto de ebullición, LogP, peso molecular, momento dipolar, etc.), mientras que la similitud molecular o estructural se enfoca principalmente en las características estructurales (subestructuras compartidas, sistemas de anillos, topologías, etc.) de los compuestos y sus representaciones.

Tanto las propiedades fisicoquímicas como las características estructurales son representadas por diferentes tipos de descriptores.⁴³

Similitud química	P.M.	LogP	Enlaces rotables	Anillos aromáticos	Átomos pesados
	A	341.4	5.23	4	4
B	463.5	4.43	4	5	35

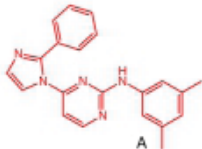
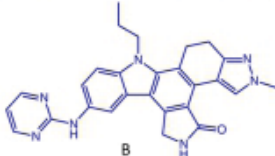
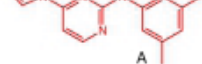
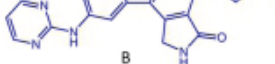
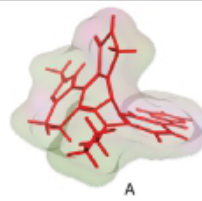
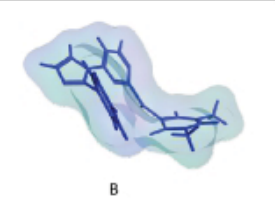
Similitud molecular		
Similitud 2D		
Similitud 3D		

Figura 7. Representación gráfica de distintos tipos de similitud.⁴³

Debido a la complejidad asociada con el proceso de medir la similitud entre dos moléculas, la manera más fácil de llevar a cabo la comparación entre dos o más representaciones moleculares computacionalmente es a través del uso de los *fingerprints* químicos, los cuales involucran transformar las características estructurales de una molécula (graban la presencia o ausencia, o conteo del número de ocurrencias, de características o subestructuras en particular) en una secuencia de bits que pueden compararse fácilmente entre moléculas (Figura 8).^{44,45} Existen diferentes tipos de *fingerprints* (basados en claves subestructurales, topológicos, circulares, farmacóforicos), los cuales pueden incluir información 2D (deducida de gráficas moleculares) y 3D (información conformacional y propiedades relacionadas).^{43,44}

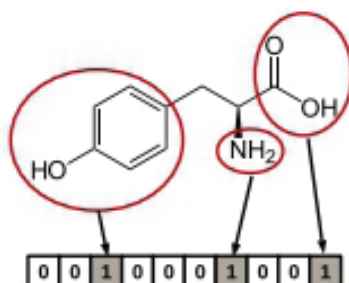


Figura 8. Representación de un *fingerprint* subestructural de 10 bits, con tres bits establecidos (cuadros sombreados en gris con el número 1) puesto que las subestructuras que representan están presentes en la molécula.⁴⁴

La comparación cuantitativa entre estos *fingerprints* suele llevarse a cabo por medio del coeficiente de Tanimoto (Ecuación 1), el cual consiste en el número común de bits para ambos *fingerprints* (ambas moléculas) dividido por el número total del conjunto de bits presentes en ambos *fingerprints* (ambas moléculas). Para ello, 1 se otorga cuando la característica está presente, mientras que 0 es que no lo está, y el coeficiente sólo puede tener valores de 0 a 1.^{43,44}

$$Tc(A.B) = \frac{c}{a + b - c}$$

Dónde a y b representan el número de características presentes en los compuestos A y B respectivamente. El término c en el numerador representa el número de características compartidas entre los compuestos A y B, mientras que el término c en el denominador corrige el doble conteo de las características. Tc cuantifica la fracción de características en común entre A y B con respecto al número total de características de A o B.

Ecuación 1. Ecuación de Tanimoto.⁴³

ChEMBL es una gran base de datos curada de libre acceso con un enfoque en el descubrimiento de fármacos con el objetivo de capturar el conocimiento e información de la química farmacéutica a lo largo del proceso de desarrollo e investigación farmacéutica. La información sobre pequeñas moléculas y su actividad biológica es extraída de artículos de texto completo de diferentes revistas clave en química farmacéutica e integrada con información respecto a fármacos aprobados y candidatos en desarrollo clínico. Esta información incluye el mecanismo de acción y las indicaciones terapéuticas. La base de datos resultante tiene diferentes herramientas, incluyendo herramientas para la búsqueda de dianas moleculares, evaluación de la selectividad de compuestos, entre otras.⁴⁶

La búsqueda por similitud estructural en ChEMBL se basa en el algoritmo de búsqueda FPSim2 (desarrollada en ChEMBL), la cual involucra la representación de la estructura de las moléculas de partida usando fingerprints de conectividad extendida (EFCP), los cuales están basados en el algoritmo de Morgan. Estos últimos representan vecindarios circulares atómicos y producen fingerprints de longitud variada. Una vez creados estos fingerprints, se usa la interpretación vectorial de los mismos y se compara con la información de los compuestos presentes en la base de datos, utilizando como medición de similitud el índice de Tversky (una generalización del coeficiente de Tanimoto).^{44,45,47} (Ver Ecuación 2)

$$S_{\alpha\beta}(\vec{A}, \vec{B}) = \frac{A \cap B}{\alpha A + \beta B + (1 - \alpha - \beta)(A \cap B)}$$

Donde α y β son parámetros propios del índice de Tversky.

Ecuación 2. Índice de Tversky vectorizado para dos fingerprints (A y B) usado por el algoritmo de búsqueda de ChEBML.

2.2.3 Acoplamiento molecular

2.2.3.1 Acoplamiento molecular: Generalidades

El acoplamiento molecular es un método computacional empleado para predecir la interacción entre dos moléculas, generando un modelo de unión.⁴⁸ Este método normalmente se realiza entre una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula (más comúnmente una proteína), teniendo como objetivo principal entender y predecir el reconocimiento molecular, tanto estructuralmente a través de la predicción de los modos de unión experimentales, como energéticamente con la predicción de las afinidades de unión de estas moléculas pequeñas dentro de un sitio de unión específico de un receptor o macromolécula.^{49,50} En la actualidad, también es posible realizar un estudio de acoplamiento para predecir la interacción entre dos macromoléculas, por ejemplo, proteína-proteína.^{48,49}

El acoplamiento molecular es una herramienta útil en biología molecular estructural y en el DIFAC. Entre sus aplicaciones se encuentran la optimización de compuestos líder, estudios actividad-estructura, contribución de hipótesis de unión para facilitar predicciones en estudios de mutagénesis, estudios de mecanismos químicos, encontrar potenciales compuestos líder en cribados virtuales, entre otros.^{49,50}

En la actualidad, la mayoría de los programas para realizar acoplamiento se basan en mecánica molecular, la cual involucra la descripción de un sistema poliatómico usando física clásica con la finalidad de limitar el costo computacional requerido para los cálculos de mecánica cuántica. Así, los átomos son considerados como esferas cargadas conectadas por medio de resortes, ignorando la presencia de electrones de acuerdo con la aproximación de Born-Oppenheimer.^{48,51} En estos

sistemas, los parámetros experimentales tales como cargas, ángulos geométricos y de torsión son usados para disminuir las diferencias entre la información experimental y las predicciones de la mecánica molecular. De manera conjunta, las ecuaciones matemáticas que representan estos sistemas suelen ser parametrizadas con base en cálculos teóricos *ab initio* y semiempíricos de mecánica cuántica. Con este respecto, los campos de fuerza moleculares son un conjunto de ecuaciones con diferentes parámetros con el objetivo de describir los sistemas. La mayoría de éstos descansan en cinco términos que tienen una interpretación física: energía potencial, términos de torsión, geometría de enlace, términos electrostáticos y potencial de Lenard-Jones.⁴⁸

Se sabe que un estudio de acoplamiento molecular tiene tres objetivos principales: predicción de las poses, cribado virtual y estimación de la afinidad de unión. En este sentido, el acoplamiento cuenta con un algoritmo de búsqueda y una función de evaluación para generar y evaluar las conformaciones del ligando respectivamente.⁵⁰

2.2.3.2 Algoritmos de búsqueda

Los algoritmos de búsqueda se usan para explorar el campo de energía libre con la finalidad de encontrar las mejores conformaciones del ligando.^{48,50} Estos algoritmos se clasifican en tres grupos principales de acuerdo con la metodología empleada para explorar la flexibilidad del ligando: sistemático, estocástico y determinístico.⁵⁰ Algunos algoritmos implementan un enfoque híbrido combinando dos o las tres estrategias de búsqueda, este último es el algoritmo empleado por el programa comercial Molecular Operating Environment (MOE).⁴⁸

La búsqueda sistemática involucra un muestreo exhaustivo de todas las conformaciones y combinación de parámetros estructurales, explorando todos los grados de libertad del ligando durante la búsqueda. Este método generalmente consume más tiempo y recursos para construir y evaluar los conformeros individualmente. Para reducir estos últimos problemas, en este sistema también se suele usar otro enfoque en donde el ligando se construye a partir de diferentes fragmentos.⁵² Los métodos estocásticos cambian aleatoriamente todos los grados

de libertad del ligando (traslacionales, rotacionales y conformacionales) en cada paso, generando una gran diversidad de soluciones. Estas conformaciones del ligando son evaluadas de acuerdo con un criterio probabilístico para decidir su aceptación o rechazo de las mismas.⁵⁰ Dentro de estos métodos, se encuentran los tipo Monte Carlo y Algoritmos Genéticos.⁵¹ Como parte de este último grupo, se encuentra el algoritmo genético Lamarckiano, el principal método para búsqueda de conformaciones en Autodock 4.2. En este método, una población de conformaciones de prueba es creada, los cuales en generaciones siguientes sufren mutaciones, intercambian parámetros conformacionales (entrecruzamientos) y compiten en una manera análoga a la evolución biológica, siendo seleccionadas aquellas conformaciones con las energías de unión más bajas. El aspecto Lamarckiano es una característica añadida que permite a las conformaciones individuales buscar su espacio conformacional local para encontrar su mínimo energético local, y pasar así esta información a las generaciones de conformaciones posteriores.⁵³ Finalmente, en los métodos determinísticos el estado real del sistema determina las modificaciones que se le realizan para llevarlo a su siguiente estado de energía. La minimización de energía y la dinámica molecular son ejemplos de este último método.⁵⁰

2.2.3.3 Funciones de evaluación

Los métodos de búsqueda de algoritmo dan como resultado un gran número de conformaciones del ligando a ser evaluadas (usualmente millones).^{48,50} Por lo tanto, las funciones de evaluación determinan la calidad de estas conformaciones de acoplamiento, guiando a los métodos de búsqueda con la finalidad de identificar las conformaciones más relevantes, con base en distintas propiedades, incluyendo efectos electrostáticos, interacciones intermoleculares, efectos entrópicos, desolvatación, entre otros.⁴⁸ Una función de evaluación debe ser capaz de distinguir los modos de unión observados experimentalmente de todas las otras poses exploradas por el algoritmo de búsqueda, clasificar los ligandos como activos e inactivos y, el paso más crítico, predecir las constantes de afinidad y clasificar muchos compuestos de acuerdo con su afinidad de unión estimada.⁵⁰

Estas funciones se dividen en tres tipos principales. El primer tipo es el basado en un campo de fuerza, el cual consistente en una función que descompone la energía de unión del ligando en términos de interacciones intramoleculares (potencial armónico y potencial torsional) e intermoleculares individuales (energía de Van der Waals (VDW), electrostática de Coulomb, torsión/estiramiento/doblamiento, etc.).^{51,54} Autodock 4.2 emplea un campo de fuerza de energía libre semiempírico para predecir las energías libres de unión de las moléculas pequeñas a las moléculas blanco (Ecuación 3).^{53,55}

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{H-bond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{tor}$$

Dónde ΔG_{vdw} es la energía asociada a interacciones de Van der Waals, ΔG_{H-bond} hace referencia a los términos de energía de puente de hidrógeno, ΔG_{elec} se refiere a la energía en términos electrostáticos, ΔG_{desolv} se refiere a la energía de desolvación y ΔG_{tor} a la energía en términos de torsión.

Ecuación 3. Función de campo de fuerza de Autodock 4.⁵⁶

Los segundos tipos de funciones de evaluación son las empíricas. Estas funciones se basan en la suma de valores experimentales de energía (energía de VDW, electrostática, puente de hidrógeno, hidrofobicidad, etc.) ponderados por coeficientes optimizados para calcular el puntaje de energía de unión de un complejo dado. El último tipo, son las funciones basadas en conocimiento, cuyos parámetros son derivados directamente de la información estructural de los complejos ligando-proteína determinados experimentalmente. Estos métodos asumen que los contactos proteína-ligando que se exploran con mayor frecuencia, están estadísticamente correlacionadas con interacciones más favorables.^{51,54}

La función de evaluación London dG (Ecuación 4) es otra función basada en campo de fuerza y fue la usada en este trabajo en el programa MOE. Esta función estima la energía libre de unión de un ligando en una pose dada.⁵⁷

$$\Delta G = c + E_{flex} + \sum_{h-bonds} C_{HB} f_{HB} + \sum_{m-lig} C_M f_M + \sum_{atoms_i} \Delta D_i$$

Dónde c representa el promedio de la pérdida/ganancia de la entropía traslacional y rotacional. E_{flex} es la energía debido a la pérdida de flexibilidad del ligando (se calcula a partir de la topología del ligando solamente); f_{HB} mide las imperfecciones geométricas de los puentes de hidrógeno y toma valores en [0,1]; C_{HB} es la energía de un puente de hidrógeno ideal; f_M mide las imperfecciones geométricas de ligantes metálicos y toma valores en [0,1]; C_M es la energía de un ligante metálico ideal; y D_i es la energía de desolvación.

Ecuación 4. Función de evaluación London dG.⁵⁷

2.2.3.4 Acoplamiento molecular consenso

El acoplamiento consenso es una metodología introducida para superar las limitaciones del acoplamiento para generar modos de unión cercanos al nativo y correctamente clasificar los compuestos de acuerdo con su afinidad. Esta estrategia involucra la comparación de las poses (las cuales fueron generadas por dos o más programas de acoplamiento molecular) con la posición más alta de la clasificación (ranking) de cada compuesto estudiado.⁵⁸ Se ha demostrado que las poses que pasan los filtros del consenso son más probables de corresponder al modo de unión nativo del ligando. Esto permite validar los resultados obtenidos por un programa dado e identificar a los compuestos más prometedores en un cribado virtual.^{58,59}

Esta metodología primero involucra un tratamiento de datos y la posterior comparación de los valores de energía de unión obtenidos de diferentes programas por medio de estrategias de evaluación para consenso. El tratamiento de datos permite disminuir el efecto de la diferencia de los valores de energía obtenidos por diferentes funciones de evaluación y programas. Los métodos principalmente usados para este paso son el método de ranqueo y el de escalamiento. El primero y el empleado en este trabajo, involucra: 1) ordenar a las diferentes poses que obtuvieron el mejor puntaje de energía de unión para cada ligando evaluado, 2) ranquear las diferentes poses, teniendo en cuenta que la pose o modelo con el puntaje más alto (energía de unión más baja) se le otorga el

número 1 y así sucesivamente (Figura 9). Estos pasos se realizan por cada función de puntaje y/o programas empleados.^{58,60}


Modelo	Puntaje		Ranqueo
1	-10.5		4
2	-13.4		2
3	-16.8		1
4	-4.5		6
5	-7.7		5
6	-11.4		3

Figura 9. Representación del tratamiento de datos por ranqueo.⁶⁰

Una vez tratados los datos, la comparación de los valores se hace empleando los valores de ranqueo y no los obtenidos a partir de la función de evaluación. Dentro de las estrategias de evaluación se encuentran el ranqueo por voto, el promedio del ranqueo (ranqueo-por-ranqueo) y el de las afinidades de unión (ranqueo-por-número).^{58,60} El ranqueo por voto fue la estrategia usada en este trabajo y consiste en que después del tratamiento de los datos por ranqueo, se establece un criterio que deben pasar estos compuestos con base en los números obtenidos en el ranqueo (por ejemplo, los cinco compuestos con el ranqueo más alto), otorgando un voto a aquellas poses que cumplen con el criterio para cada programa. Finalmente, se suman los votos y se establece un límite de votos que debe cumplir un compuesto para poder determinar aquellos compuestos que son elegidos o excluidos para estudios posteriores (pruebas *in vitro*, por ejemplo).⁶⁰ La Figura 10 describe un ejemplo de dicha estrategia.

Modelo	Valor programa	Valor programa	Número de votos	Resultado (aceptado/rechazado)
1	1	3	2	Aceptado
2	4	8	1	Rechazado
3	3	5	2	Aceptado
4	2	1	2	Aceptado
5	7	6	0	Rechazado
6	2	6	1	Rechazado

Aceptado
 2 o más votos


Figura 10. Ejemplo de la estrategia de evaluación consenso de ranqueo por voto. Se da un voto a aquellos modelos en las 5 mejores posiciones por programa. En este caso, el límite de votos es dos para poder ser aceptado para estudios posteriores.⁶⁰

2.2.4 Dinámica molecular

La dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés) es una técnica computacional que simula el comportamiento dinámico de sistemas moleculares en función del tiempo, tratando a todas las entidades en la caja de simulación (ligando, proteína, y moléculas de agua si se encuentran explícitas) como flexibles (Figura 11).^{51,61} La dinámica molecular computa los movimientos de los átomos a lo largo del tiempo por medio de la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton (mecánica clásica). Ver Ecuación 5.

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i(t)}{m_i}$$

Dónde: $F_i(t)$ se refiere a la fuerza ejercida sobre el átomo i a un tiempo dado t , $r_i(t)$ es el vector de posición del átomo i al tiempo t , y m_i es la masa del átomo.

Ecuación 5. Función general de la dinámica molecular.⁵¹

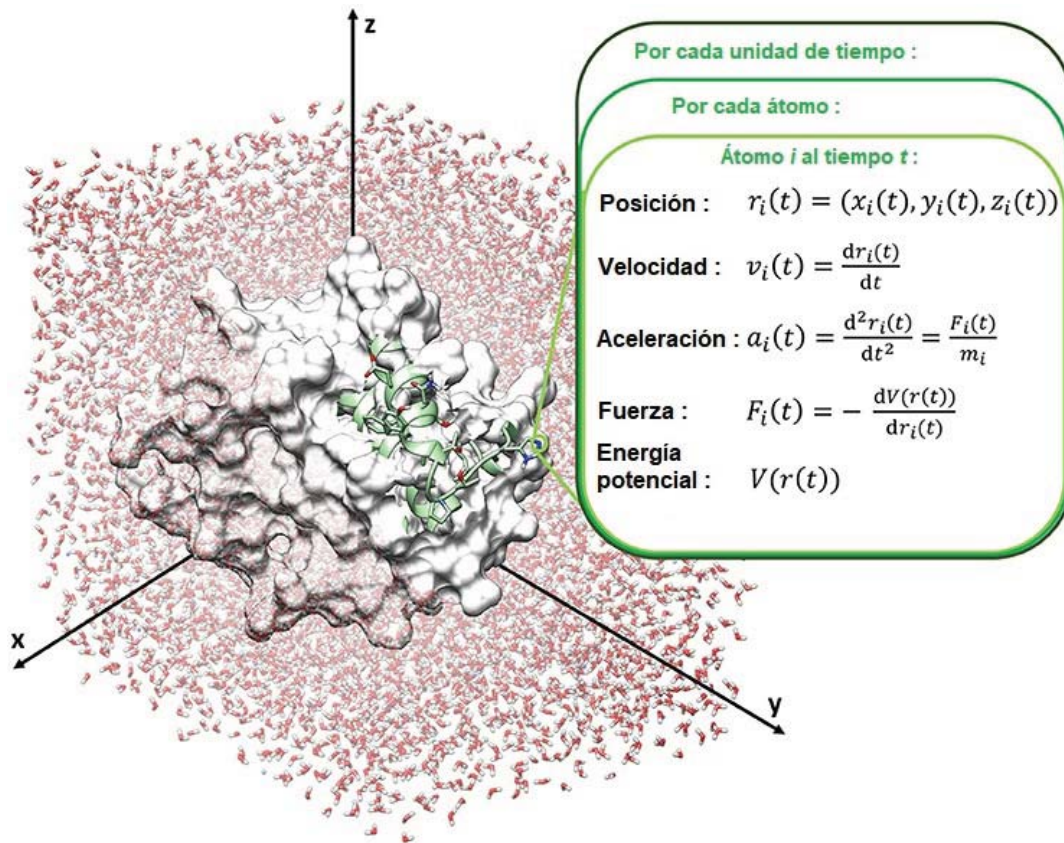


Figura 11. Representación gráfica de una dinámica molecular.⁵¹

2.2.5 Modelado de proteínas

2.2.5.1 Generalidades

Las estructuras de las proteínas son cruciales para entender su función biológica. Sin embargo, solo se ha logrado determinar la estructura de una fracción muy pequeña de todas las proteínas conocidas. De manera paralela, la determinación de la estructura de proteínas por métodos experimentales tales como cristalografía de rayos X o espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) requieren mucho más tiempo y no son exitosos con todas las proteínas, especialmente las proteínas membranales.^{62,63} Afortunadamente, actualmente se conocen la estructura de por lo menos una proteína representativa de la mayoría de las familias de proteínas, y existen diferentes métodos computacionales que pueden usarse para generar modelos tridimensionales confiables de muchas proteínas usando estas estructuras representativas como puntos de partida, tal como el

modelado comparativo o por homología.⁶² De igual forma, existen métodos que no requieren de esta proteína molde para obtener un modelo.⁶⁴

2.2.5.2 Modelado comparativo

El modelado por homología o comparativo es el método más comúnmente usado y exacto para modelar la estructura de proteínas, el cual predice la estructura desconocida de una proteína usando información de una o más proteínas homólogas. Este método involucra usualmente tres pasos: i) la identificación de estructuras molde para el modelado de la proteína problema, ii) alineamiento entre la secuencia del molde y la de la proteína problema, iii) modelado de la estructura problema.⁶⁵ La calidad del modelado por homología depende principalmente en la similitud con la secuencia de la estructura molde. Un buen modelo tridimensional se produce en general si la secuencia homóloga usada presenta una identidad global igual o mayor al 30 % con respecto a la secuencia problema. Sin embargo, se requiere de un porcentaje de identidad mayor al 50 % para aplicaciones en el diseño y descubrimiento de fármacos.^{63,65}

Debido al interés de representaciones confiables de proteínas, existen diferentes programas y servidores para obtener estos modelos por homología. El servidor de Robetta, usado para este trabajo por medio de un protocolo de RosettaCM, ha demostrado ser útil para obtener dichos modelos con una gran precisión.⁶⁶ La Figura 12 proporciona una descripción del algoritmo de trabajo de Robetta en el protocolo empleado (RosettaCM).

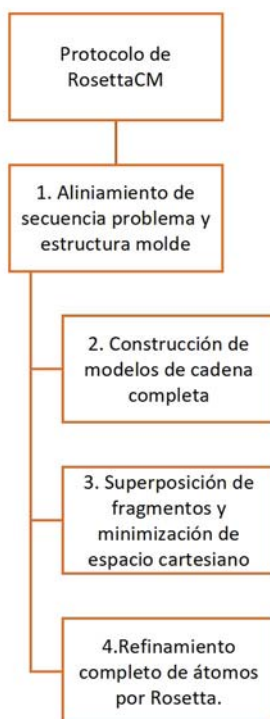


Figura 12. Protocolo de RosettaCM. 1) Alineamiento de la secuencia problema con la estructura molde. 2) Los modelos se construyen por medio del algoritmo Monte Carlo a partir de la recombinación de los fragmentos de las estructuras del molde alineadas con la secuencia y de fragmentos *de novo* representando a las regiones no alineadas obtenidos usando información local de la secuencia que llevan a la topología correcta de la estructura. 3) Las desviaciones se exploran y las brechas se cierran usando una combinación de superposición de fragmentos y minimización de espacio cartesiano. 4) El esqueleto base o principal y las cadenas laterales se optimizan por medio de un refinamiento completo de átomos por Rosetta utilizando una función de energía realística físicamente.⁶²

2.2.5.3 Evaluación y validación de la calidad del modelo

Debido a la importancia de contar con estructuras confiables y correctas para estudiar procesos biológicos, se requiere llevar a cabo la validación y la evaluación de la calidad de las estructuras tridimensionales obtenidas por modelado.⁶⁷ Esto incluye la evaluación de los valores de las longitudes de los enlaces, ángulos de enlace, ángulos diedros dentro de los residuos y en los enlaces del péptido, así como elementos estructurales secundarios (hélices, láminas, *coils*).

La calidad geométrica, en general, de una cadena principal de la proteína es caracterizada por un diagrama de Ramachandran.⁶⁸ Los diagramas de Ramachandran (Figura 13) permiten conocer si una combinación dada de los ángulos Φ y Ψ de los enlaces del esqueleto de la proteína (Figura 14) son posibles

para evitar choques estéricos entre los átomos de la proteína.⁶⁹ Mientras que los choques estéricos potenciales indican regiones problemáticas en el modelo estructural, y pueden ser identificados por MolProbity.⁶⁸ Este último es ampliamente usado para la validación de modelos estructurales de ácidos nucleicos y proteínas, introduciendo los criterios de los diagramas de Ramachandran, rotámeros de cadenas laterales, análisis de contacto de todos los átomos (incluyendo hidrógenos), energías asociadas con choques estéricos, desviación $C\beta$, etc.⁷⁰

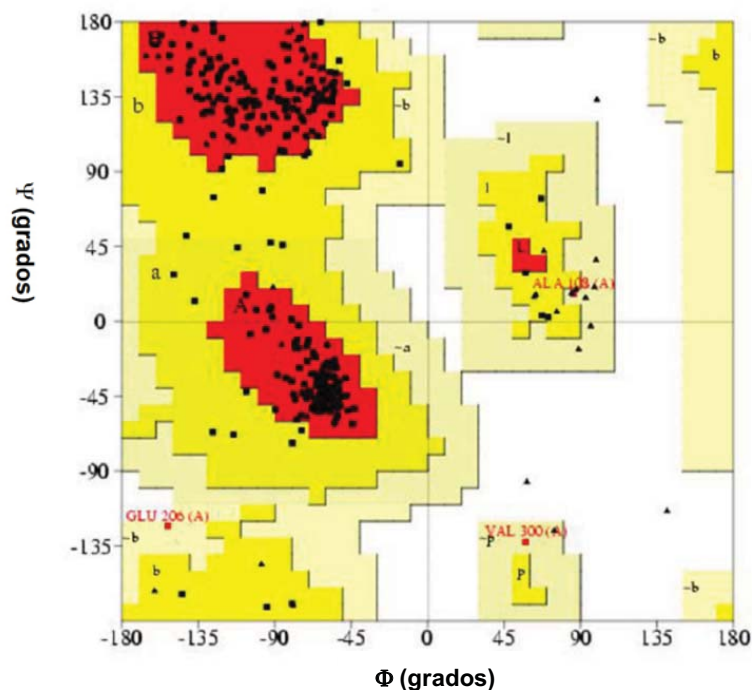


Figura 13. Representación del diagrama de Ramachandran. En donde las regiones [A, B, L] son las más favorecidas, [a,b,l,p] regiones adicionales permitidas, [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p] regiones permitidas generosamente, y las demás regiones son no permitidas.⁷¹

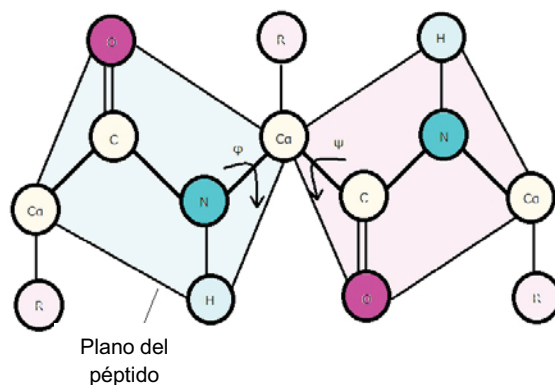


Figura 14. Representación gráfica de los ángulos Φ y Ψ del enlace peptídico.⁷²

Otros métodos que complementan estas herramientas para detectar errores geométricos y estereoquímicos en los modelos, son MOLFOLD y QMEAN. Estos dos servidores evalúan la calidad global del modelo por medio de distintos parámetros (evaluación de choques estéricos, etc.) dando un puntaje global sobre la calidad de un modelo tridimensional que permite comparar modelos e identificar los modelos más adecuados con base en la escala de dicho puntaje.⁷³⁻⁷⁶

2.2.6 Farmacóforo

El farmacóforo es la representación de un conjunto de características electrónicas y estéricas necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con un blanco biológico en específico, con la finalidad de modular su respuesta biológica (Figura 15).⁷⁷ Dentro de estas características encontramos hidrofóbicas (HyD), aromáticas (Aro), aceptores de puente de hidrógeno (HBAs), donadores de puente de hidrógeno (HBDs), cationes y aniones.⁷⁸ Esta representación normalmente se desarrolla de tres formas: basada en ligando, basada en el receptor y basada en complejo ligando-receptor.⁷⁸⁻⁸⁰ Este último es muy útil para el avance en el desarrollo de fármacos.⁷⁷

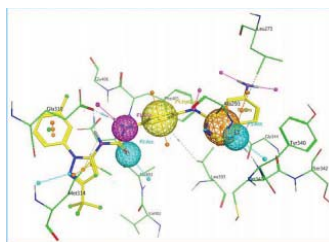


Figura 15. Ejemplo de farmacóforo formado en MOE.

3.- Justificación

La leishmaniasis es una parasitosis que afecta a millones de personas en todo el mundo, incluyendo diferentes regiones de México. Se considera una ETD, lo que implica que los países endémicos de la enfermedad sean los responsables de desarrollar nuevos tratamientos para la leishmaniasis. Sin embargo, la gran mayoría de las zonas endémicas de esta parasitosis son regiones pobres, lo que dificulta el avance en el desarrollo de nuevos tratamientos. Adicionalmente, no existe una vacuna aprobada para prevenir la enfermedad y el principal tratamiento actual se basa en el uso de diferentes fármacos que en su mayoría son tóxicos, presentan diferentes efectos adversos, son de difícil acceso para los países endémicos y para los que el parásito presenta resistencia.

Con base en la situación que envuelve a esta parasitosis, existe una demanda imperante en el oportuno desarrollo y diseño de fármacos más eficientes, seguros y accesibles para las regiones afectadas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha diseñado, sintetizado y evaluado derivados bencimidazólicos que han demostrado actividad antiparasitaria en estudios *in vitro*, incluyendo para *L. mexicana*. Sin embargo, se desconoce realmente su mecanismo de acción y/o la diana blanco molecular sobre el que actúan la gran mayoría de estos compuestos.

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea realizar la búsqueda por similitud estructural de potenciales dianas moleculares en *L. mexicana* partiendo de 25 derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria. Esta búsqueda se complementará con estudios de acoplamiento molecular que permitirán determinar la afinidad en términos de energía de unión de los compuestos bencimidazólicos por los posibles blancos encontrados con el fin de identificar el más prometedor. Aunado a esto, el estudio de la dinámica molecular nos permitirá tener un mejor conocimiento de la interacción entre estos 25 derivados bencimidazólicos y la potencial diana identificada más prometedora.

Una vez encontrada esta diana, la identificación de las características del farmacóforo presentes en los ligandos que tienen la mejor interacción con ésta nos permitirá conocer las características electrónicas y estructurales necesarias para la adecuada interacción de éstos. Este conocimiento asentará las bases para el diseño de nuevos compuestos con características estructurales similares y con potencial actividad leishmanicida, enfocados a algún blanco no explorado por nuestro grupo previamente.

4.- Hipótesis

Se encontrarán potenciales blancos moleculares presentes en *L. mexicana* mediante la metodología de búsqueda por similitud estructural en ChEMBL partiendo de 25 derivados bencimidazólicos con actividad antiparasitaria comprobada. La energía de unión y selectividad de los ligandos serán adecuadas, con la finalidad de que sirvan para asentar las bases para el diseño de nuevos compuestos con potencial actividad leishmanicida enfocados a estos blancos.

5.-Objetivos

5.1 Objetivo general

Realizar la búsqueda de potenciales blancos terapéuticos en *Leishmania mexicana* mediante el uso de herramientas computacionales con el fin de contribuir al diseño de nuevos agentes terapéuticos leishmanicidas.

5.2 Objetivos particulares

Con la finalidad de cumplir con el objetivo general del presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Buscar blancos moleculares en *L. mexicana* por medio de un estudio de similitud estructural entre 25 derivados bencimidazólicos de nuestro grupo de investigación con actividad antiparasitaria y la base de datos de ChEMBL.
- 2.- Realizar un estudio de acoplamiento molecular consenso entre los derivados bencimidazólicos de nuestro grupo de trabajo y los blancos encontrados a partir de la búsqueda en ChEBML, así como con las proteínas ortólogas en el humano a estos blancos.
- 3.- Determinar las interacciones proteína-ligando entre los blancos encontrados, las proteínas ortólogas en el humano y los compuestos bencimidazólicos usados para llevar a cabo la búsqueda, así como con ligandos de referencia específicos de cada blanco.
- 4.- Establecer el blanco molecular más prometedor por medio de los resultados de energía de unión y la determinación del coeficiente de selectividad de esta energía de unión para todos los derivados bencimidazólicos de partida.
- 5.- Identificar los ligandos más prometedores, entre los 25 derivados, para el blanco más prometedor por medio de una estrategia de evaluación para consenso.
- 6.- Realizar la dinámica entre el blanco más prometedor y dos de los 25 derivados bencimidazólicos representativos de los mismos (uno de tamaño pequeño y uno grande respectivamente).

7.- Identificar el farmacóforo de los ligandos más prometedores.

8.- Diseñar nuevas moléculas con base en la información del farmacóforo y acoplamiento molecular por medio del uso de las herramientas presentes en el programa MOE.

6.- Metodología

En esta sección se describe la metodología seguida para la búsqueda por similitud estructural, los estudios de acoplamiento molecular consenso, el estudio de dinámica molecular, la construcción del farmacóforo y el DIFAC (Figura 16).

6.1 Diagrama general

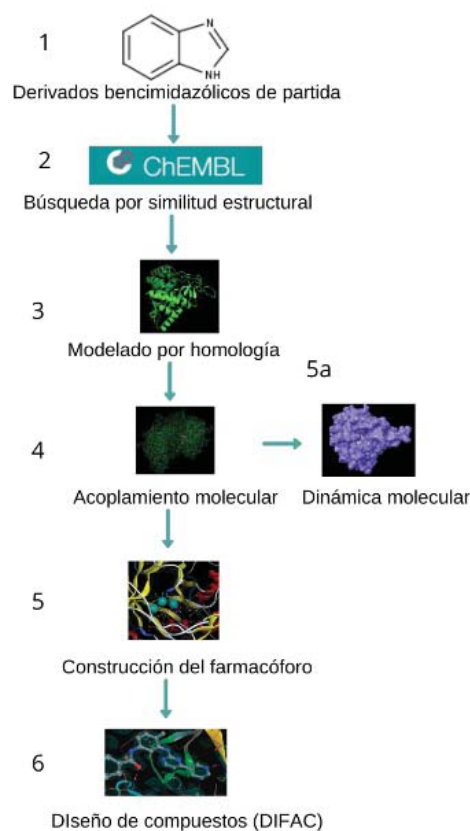


Figura 16. Esquema general de la metodología empleada en el presente trabajo.

6.2 Búsqueda por similitud estructural

Se introdujeron las estructuras químicas en 2D de los 25 derivados bencimidazólicos de partida en el motor de búsqueda por similitud estructural de ChEMBL⁴⁶ (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) y se realizó la búsqueda con un porcentaje de similitud de entre 100-40%. De las estructuras con similitud estructural obtenidas, se realizó un filtro eligiendo aquellas que tienen actividad biológica, poseen un blanco molecular conocido y una potencia reportada.

De los compuestos filtrados, se extrajeron los blancos moleculares sobre los que actúan. A partir de estas dianas moleculares, se escogieron aquellos que están presentes en *L. mexicana*. Apoyado de la literatura, se realizó otro filtro buscando los blancos que tienen una función importante para el desarrollo y/o supervivencia del parásito. De los blancos encontrados, se identificaron los ortólogos en el *Homo sapiens*. Finalmente, se buscaron potenciales sitios de unión con la finalidad de realizar sobre éstos los estudios de acoplamiento molecular. (Ver Figura 17)

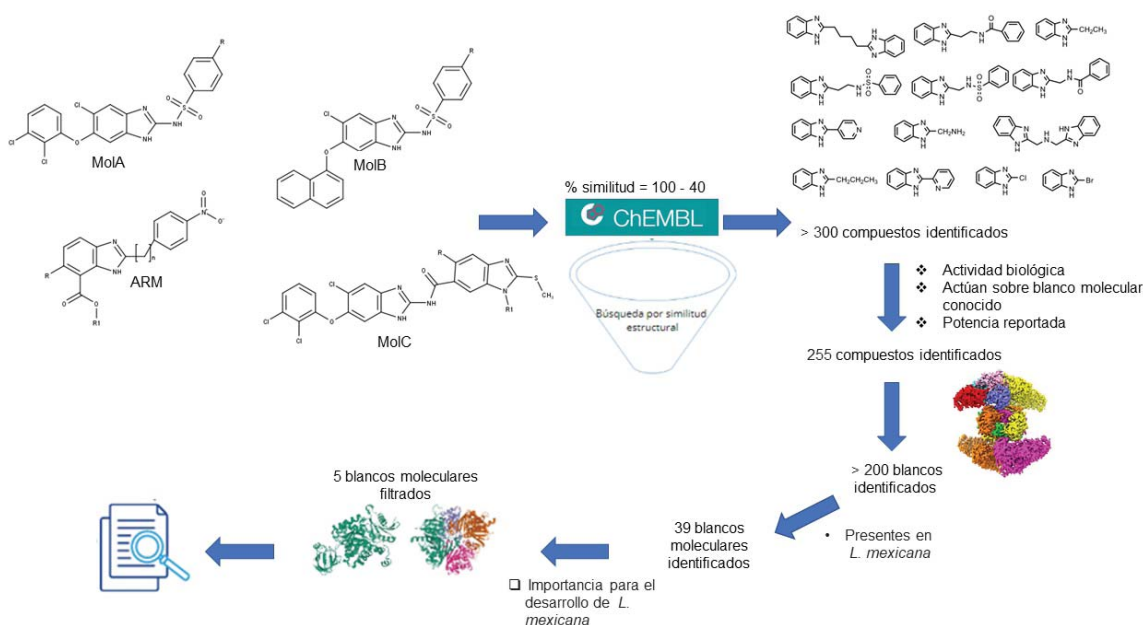


Figura 17. Representación gráfica de la metodología seguida para la búsqueda por similitud estructural en ChEMBL.

6.3 Modelado por homología de la dihidroorotato deshidrogenasa

Se siguió el esquema de trabajo mostrado en la Figura 18. Para comenzar, se obtuvo la secuencia en formato FASTA de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) de *L. mexicana* de la base de datos Uniprot⁸¹ (<https://www.uniprot.org/>). Se buscó una proteína homóloga para usarla como molde en la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) usando la opción *Protein Blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).⁸² Posteriormente, se escogió la proteína cuya secuencia tuvo un valor de E igual a 0.00 y con la cobertura de la búsqueda y porcentaje de identidad más alto, siempre que su estructura tridimensional

estuviera reportada en una base de datos y publicada con una resolución aceptable (3MHU, Dihidroorotato deshidrogenasa de *L. major*). A continuación, se realizó el alineamiento de ambas secuencias en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)⁸³ para identificar la similitud entre ambas secuencias en sitios importantes para el estudio de acoplamiento molecular. Se obtuvo la estructura cristalográfica de la proteína molde de la DHODH de la base de datos RCSB PDB⁸⁴ y se eliminaron todos los ligandos cocrystalizados y moléculas de agua usando Chimera1.15rc.⁸⁵ Seguido de esto, se modeló por homología la DHODH de *L. mexicana* en el servidor Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/>)⁶² usando la secuencia de la DHODH de *L. mexicana* y el archivo PDB de la proteína usada como molde (3MHU). Finalmente, se evaluó y validó la calidad del modelo obtenido usando MolProbity (http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php?MolProbSID=gc1s6aj42dd7uu7kjfe_ma75ft3&eventID=232),⁷⁰ el servidor QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>)⁸⁶ y el servidor ModFOLD6 (https://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/ModFOLD6_form.html).⁷⁴

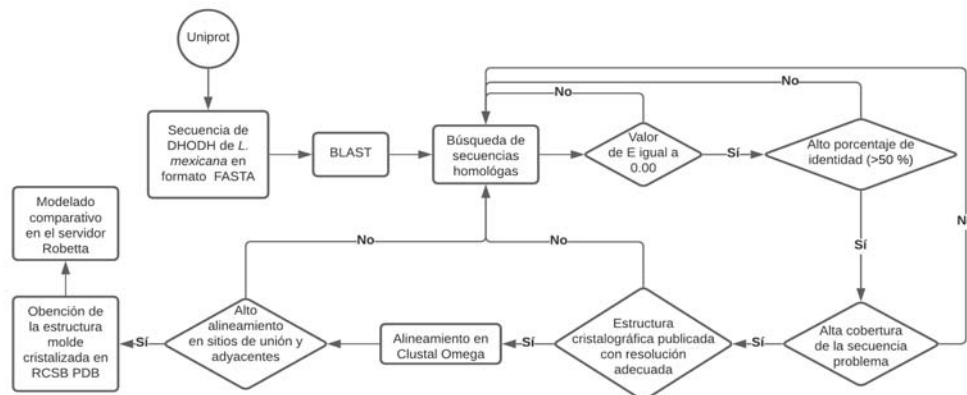


Figura 18. Algoritmo usado para obtener la estructura molde y resumen de la metodología del modelado por homología.

6.4 Acoplamiento molecular consenso

El acoplamiento molecular se realizó en dos programas: Autodock 4.2.6 y MOE. Se obtuvieron las energías de unión entre los ligandos y las dianas moleculares (Ver Sección 6.2), así como con sus correspondientes blancos ortólogos en *Homo sapiens*. Esto permitió, además, calcular los coeficientes de selectividad entre *L. mexicana* y *H. sapiens* en términos de energía de unión para cada proteína. A partir de ello, se determinó la diana más prometedora. A continuación, se describen con más detalle cada uno de los pasos del acoplamiento.

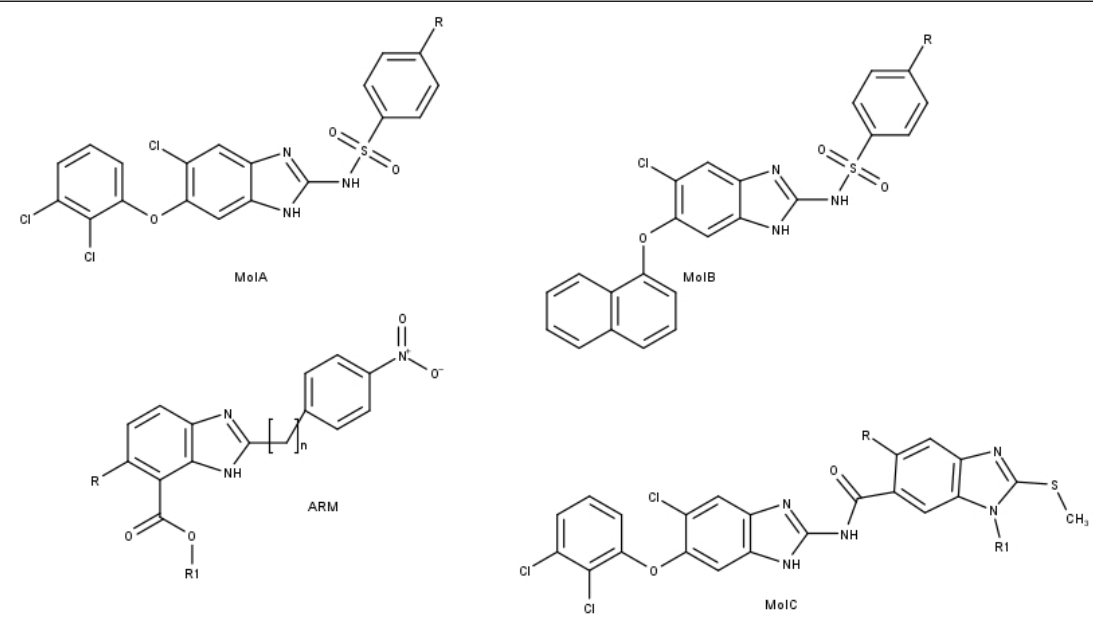
6.4.1 Preparación de los derivados bencimidazólicos y ligandos de referencia no cristalizados

Los 25 derivados bencimidazólicos (Tabla 4) se construyeron y minimizaron usando el método semiempírico PM6 en el programa *Spartan 10* de Wavefunction Inc (<https://www.wavefun.com/>). Las estructuras se guardaron en formato PDB para su uso en MOE. Adicionalmente, para aquellas moléculas que poseen un ácido carboxílico en su estructura, se asignó la carga correspondiente tomando en cuenta el pH fisiológico utilizando las herramientas de preparación de cargas en MOE.

Posteriormente, sólo para su uso en Autodock 4.2.6, se identificaron de manera automática los enlaces rotables (raíz y ramas torsionales), se asignaron cargas atómicas Gasteiger-Marsilli y se fusionaron los hidrógenos no polares a su carbono adyacente utilizando el programa AutoDockTools 1.5.7.⁵³ Estas estructuras se guardaron en el formato PDBQT apropiado para su uso en Autodock 4.2.6.

La misma metodología se siguió para la preparación de los ligandos de referencia que no están cristalizados. Para el caso de los blancos 6ZM3 y 1J7D, fueron los inhibidores NSC697923 y BAY 11-7082; el ligando CHEMBL1579136 para la 3HQP y el dihidroorotato tanto para LDMR (modelada) como para 2FPV.

Tabla 4. Estructura química de los 25 derivados bencimidazólicos de partida

				
Serie	Ligando		R	R1
ARM	1	n= 1	H	H
	2	n= 1	H	CH ₃
	3	n= 1	Cl	H
	4	n= 1	Cl	CH ₃
	5	n= 0	H	H
	6	n= 0	H	CH ₃
	7	n= 0	Cl	H
	8	n= 0	Cl	CH ₃
MolA	9		H	NA
	10		Br	NA
	11		CH ₃	NA
	12		OCH ₃	NA
	13		NO ₂	NA
MolB	14		H	NA
	15		Br	NA
	16		CH ₃	NA
	17		OCH ₃	NA
	18		NO ₂	NA
	19		Naft	NA
	20		I	NA

	21	Cl	NA
	22	F	NA
MolC	23	NA	CH ₃
	24	Cl	CH ₃
	25	Cl	NA

6.4.2 Preparación de ligandos cocrystalizados (ligandos de referencia y/o sustratos endógenos)

Se obtuvo el archivo PDB de la estructura cristalizada de cada proteína con su ligando de la base de datos RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>).⁸⁴ Para cada archivo PDB, se eliminaron las moléculas de agua cristalográficas, las cadenas de la proteína y cualquier otro ligando cocrystalizado que no sea el de interés usando el programa Chimera1.15rc.⁸⁵ Las estructuras resultantes se guardaron en formato PDB para su uso posterior en MOE y Autodock 4.2.6.

Para el caso de Autodock 4.2.6, se siguió el procedimiento de preparación de ligandos previamente descrito (Ver Sección 6.4.1).

La Tabla 5 muestra los ligandos y/o sustratos endógenos cristalizados usados como referencia para los estudios de acoplamiento molecular de cada proteína.

Tabla 5. Ligandos cristalizados usados como referencia en el acoplamiento molecular y/o validación

Blanco molecular (código PDB)	Ligando de referencia y/o sustrato endógeno cristalizado.	Blanco molecular (código PDB)	Ligando de referencia y/o sustrato endógeno cristalizado.
3HQP	Fructosa-2,6-bisfosfato (2,6-FBP)	4FXF	Fructosa-1,6-bisfosfato (1,6-FBP)
1I32	NMD TND NAD ⁺	6IQ6	NAD ⁺
2QDH	Manitol-1,6-bisfosfato (1,6-MBP) Fructosa-1,6-bisfosfato (1,6-FBP)	5KY6	Manitol-1,6-bisfosfato (1,6-MBP) Fructosa-1,6-bisfosfato (1,6-FBP)

Ldmr (modelada)	Orotato Ácido 4-aminoorótico (L27)	2FPV	Orotato Ácido 4-aminoorótico (L27)
--------------------	---------------------------------------	------	---------------------------------------

6.4.3 Preparación de blancos moleculares (proteínas)

Las estructuras cristalográficas de los blancos moleculares encontrados (proteínas) se obtuvieron de la base de datos en línea del RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>).⁸⁴ (Tabla 6). La DHODH se obtuvo a partir de modelado por homología (ver Sección 6.3). Se completaron los átomos, cadenas y residuos faltantes para aquellas proteínas con dichos problemas empleando la herramienta *Modeller* en UCSF Chimera 1.15rc.⁸⁵ Se removieron manualmente las cadenas repetidas para las proteínas (en caso de dímeros, tetrámeros, etc.), dejando sólo la cadena de interés para el acoplamiento molecular, utilizando el mismo programa. Las estructuras resultantes se acondicionaron para el estudio de acoplamiento molecular usando la herramienta de preparación *Dockprep* disponible en el programa UCSF Chimera 1.15rc,⁸⁵ con el que se removieron las moléculas de agua cristalográficas, contra-iones y ligandos presentes en las estructuras, y se añadieron cargas e hidrógenos faltantes con un campo AMBER ff14Sb.⁸⁷ Posteriormente, estas estructuras se minimizaron energéticamente, usando el campo de fuerza AMBER99 en el programa MOE.⁸⁸

Para el estudio de acoplamiento en Autodock 4.2.6,⁵³ además de los pasos anteriores, a las estructuras se les asignaron cargas Gasteiger-Marsilli, los hidrógenos no polares se fusionaron a su carbono adyacente y se asignaron átomos tipo AD4. Estas estructuras se guardaron en el formato PDBQT apropiado para su uso tanto por Autogrid 4.2.6 como por Autodock 4.2.6.

Tabla 6. Resolución en Å de las estructuras cristalográficas de las proteínas encontradas

Proteína de <i>L. mexicana</i> (Código PDB)	Resolución (Å)	Proteína de <i>Homo sapiens</i> (Código PDB)	Resolución (Å)
1I32	2.60	6IQ6	2.29
2QDH	1.90	5KY6	1.94
3HQP	2.30	4FXF	2.55
6ZM3	1.70	1J7D	1.85
Ldmr	Modelada	2FPV	1.80

6.4.4 Acoplamiento molecular

6.4.4.1 MOE

Se seleccionaron los residuos de interés en el sitio de unión para cada blanco molecular estudiado y se realizó el acoplamiento molecular con los 25 derivados bencimidazólicos, usando un refinamiento de receptor rígido con *Triangle matcher* como el algoritmo de búsqueda para las poses y *London dG* como función de evaluación para el *scoring* y *rescoring*. Se retuvieron 30 de las mejores conformaciones obtenidas para cada ensayo.

6.4.4.2 Autodock 4.2.6

Se calcularon los mapas atómicos o *grids* necesarios para el acoplamiento molecular en Autogrid 4.2.6, usando una malla de prisma rectangular de distintas dimensiones de acuerdo con el tamaño del sitio de interés en cada blanco (Tabla 7), centrada en la interfaz de las enzimas con un espaciamiento de 0.375 Å.

Tabla 7. Dimensiones de la malla de prisma rectangular construida en Autogrid 4.2.6 para cada proteína estudiada

Proteína (Código PDB)	Dimensiones
1I32 & 6IQ6	80 x 80 x 80
2FPV, 2QDH, 5KY6 & Idmr (modelada por homología)	70 x 70 x 70
1J7D, 3HQP, 4FXF & 6ZM3	60 x 60 x 60

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron en Autodock 4.2.6 usando un algoritmo genético de tipo Lamarckiano como método de búsqueda conformacional. Se realizaron 50 corridas con un número máximo de evaluaciones energéticas de 25,000,000 y una población inicial de 150 conformeros. El resto de los parámetros se dejó en sus valores predeterminados.

6.4.5 Validación del acoplamiento

Se realizó el acoplamiento molecular entre los blancos moleculares identificados en la búsqueda y los ligandos cocrystalizados de referencia y/o sustratos endógenos (Tablas 5 y 6) utilizando ambos programas. Se obtuvo el valor de RMSD en el programa PyMOL,⁸⁹ alineando la mejor pose generada de cada ligando de referencia con el mismo ligando cocrystalizado obtenido del archivo PDB de la base de datos RCSB PDB. Para aquellos blancos que no contienen un ligando cocrystalizado reportado en la base de datos, se analizaron los valores de RMSD de los resultados de acoplamiento obtenidos para los 25 derivados bencimidazólicos. La validación se realizó tanto para los modelos generados con MOE, como para los generados por ATD4.

6.4.6 Obtención de la diana molecular más prometedora

Se analizaron las energías de unión y los coeficientes de selectividad de los 25 derivados bencimidazólicos en las cinco dianas moleculares identificadas y se compararon con respecto a los ligandos de referencia. Se escogió aquella diana

molecular con los mejores valores para estos parámetros en ambos programas utilizados.

6.4.7 Cálculo de coeficiente de selectividad de la energía de unión

El cálculo del coeficiente de selectividad para la energía de unión se realizó con base en la Ecuación 6. Este cálculo se realizó por proteína para los 25 derivados bencimidazólicos, ligandos de referencia y sustratos endógenos. Este cálculo se llevó a cabo con los datos de energía de unión obtenidos de ambos programas de manera independiente.

$$\text{Coeficiente de selectividad} = \frac{\text{Energía de unión blanco molecular en } L. \text{ mexicana}}{\text{Energía de unión blanco ortólogo en } H. \text{ sapiens}}$$

Ecuación 6. Modelo matemático para el cálculo del coeficiente de selectividad de la energía de unión.

6.4.8 Tratamiento de energía de unión y coeficientes de selectividad por ranqueo

Los valores de energía de unión y coeficientes de selectividad tanto de los derivados bencimidazólicos como de los ligandos de referencia para cada proteína fueron tratados siguiendo un método de ranqueo (Ver Figura 9, Sección 2.2.3.4). Se realizó el tratamiento para los valores obtenidos de ambos programas.

6.5 Dinámica molecular

Se llevó a cabo una dinámica molecular entre los ligandos 3 y 19 y la diana más prometedora (DHODH, modelada por homología de *L. mexicana*) con un tiempo de 25 ns. Para ello, se consideró la conformación obtenida del acoplamiento molecular con Autodock 4.2.6 con la energía libre de unión más baja para cada complejo como la conformación inicial. Las topologías moleculares y parámetros para los ligandos se generaron usando el método semi-empírico SQM de ACPYPE. Las simulaciones MD de los complejos proteína-ligando se realizaron usando GROMACS 5.0.4. Los complejos se describieron usando el campo de fuerza Amber99-ILDN. Los complejos proteína-ligando se solvataron con agua en una caja cúbica con 1.0 nm en todos los lados usando un modelo de tres puntos para

agua (TIP3P). Adicionalmente, se añadió NaCl hasta alcanzar una concentración 0.15 M.

Primero, se llevó a cabo una minimización de energía del sistema usando un algoritmo de tipo *steepest descent*. El sistema se equilibró por dos dinámicas moleculares de 100 ps usando el ensamble canónico (NVT) con el termostato Berendsen y el ensamble isotérmico-isobárico (NPT) con el baróstato Parrinello-Rahman. Finalmente, las simulaciones de 25 ns se llevaron a cabo en los complejos proteína-ligando, usando un arreglo canónico.

Los valores de RMSD y RMSF se analizaron durante la simulación de MD completa y las energías libres de unión de los complejos se calcularon con base en un método de Mecánica Molecular/Área Superficial Poisson-Boltzmann usando el paquete *g_mmpbsa* instalado en GROMACS durante los últimos 5 ns. La metodología aquí descrita se basa en un protocolo de dinámica molecular diseñado y publicado, previamente, por nuestro grupo de investigación con anterioridad.⁹⁰

6.6 Construcción del farmacóforo

Se realizó una estrategia de evaluación consenso de ranqueo por voto (Figuras 9 y 10) para determinar los compuestos con los mejores valores de energía de unión y coeficiente de selectividad con respecto a la diana más prometedora. Para ello se trataron los datos de energía de unión y coeficiente de selectividad de los 25 derivados bencimidazólicos, ligandos de referencia y sustratos endógenos con respecto al blanco molecular más prometedor utilizando el método por ranqueo (ver Sección 2.2.3.4). Para la asignación de votos, los criterios fueron: a) que el compuesto esté dentro de la mitad superior de la clasificación con respecto a los valores de energía de unión de todos los compuestos de la serie, esto es, ser de los 12 compuestos con la energía de unión más baja; b) que tenga una energía de unión más baja que el ligando de referencia; c) que esté dentro de los diez compuestos con el mejor coeficiente de selectividad dentro de la serie evaluada; d) que muestre mejor energía de unión que el sustrato endógeno o un segundo ligando; e) y que posea un número de anillos aromáticos considerado idóneo para

sus propiedades farmacológicas (Figura 19). Esta evaluación se realizó para cada programa por separado y posteriormente se sumaron los votos. De los compuestos que resultaron con la votación más alta, se realizó un segundo filtro, escogiendo aquellos cuyo coeficiente de selectividad se encuentran dentro de los 10 mejores para ambos programas. Los compuestos resultantes se dividieron en dos grupos con base en su subestructura. De éstos, se eligió de cada grupo aquel compuesto que presentó una mayor cercanía entre los valores de energía de unión obtenidos de ambos programas (consenso de datos). Una vez seleccionados los compuestos modelo para el diseño de nuevos compuestos para la diana más prometedor, se visualizaron las interacciones 2D entre éstos y dicho blanco usando BIOVIA Discovery Studio Visualizer⁹¹ y MOE,⁸⁸ se identificaron las interacciones presentes y se construyó el farmacóforo utilizando la herramienta editora de farmacóforo presente en MOE.⁸⁸

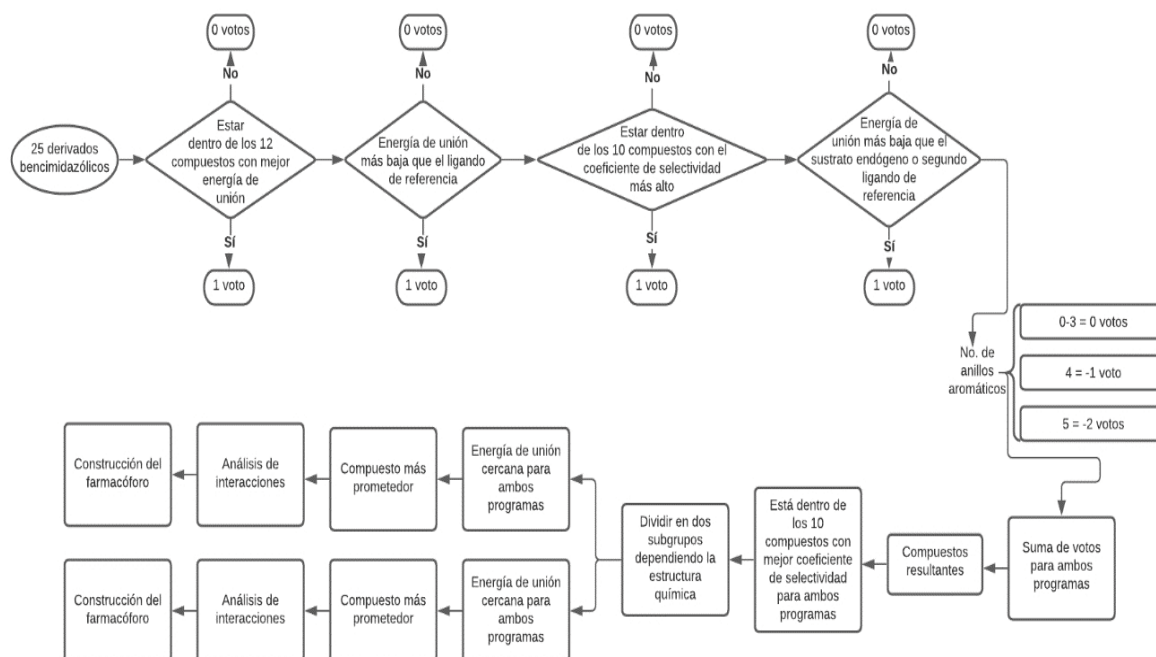


Figura 19. Representación de la estrategia de evaluación consenso utilizada para determinar los compuestos para la construcción del farmacóforo y de la metodología usada para la construcción de éste.

6.7 DIFAC

Se utilizó la herramienta de *MedChem* en MOE⁸⁸ para realizar las transformaciones químicas partiendo de los compuestos seleccionados y el farmacóforo construido (Ver Sección 6.6) para cada caso, como referencia de las características estructurales y electrónicas identificadas en los compuestos para la interacción con el blanco (Figura 20). De los compuestos obtenidos se hizo un cribado utilizando los flujos de trabajo de KNIME⁹² con los siguientes filtros: presencia del núcleo de bencimidazol y cumplimiento de la regla de los cinco de Lipinski (presentar en su estructura ≤ 5 donadores de puente de hidrógeno, ≤ 10 aceptores de puente de hidrógeno, peso molecular ≤ 500 uma y $\text{LogP} \leq 5$). Después del filtro, se realizó un estudio de acoplamiento molecular entre los compuestos obtenidos de este flujo de trabajo, la diana molecular prometedor y su ortóloga en el *Homo sapiens* utilizando el programa MOE como se describe en la Sección 6.4.4.1. Se calculó su coeficiente de selectividad y se trataron ambos valores, energía de unión y coeficiente de selectividad, por ranqueo (ver Sección 6.6). Finalmente, se seleccionaron aquellos que tienen tanto un coeficiente de selectividad como energía de unión en los cinco primeros lugares después del tratamiento por ranqueo. Para este último ranqueo sólo se tomaron en cuenta aquellos compuestos que presentaron una energía de unión más baja que los compuestos de partida (los seleccionados en la Sección 6.6). Se obtuvo y analizó una propuesta de síntesis de los compuestos resultantes utilizando la herramienta IBM RXN.⁹³

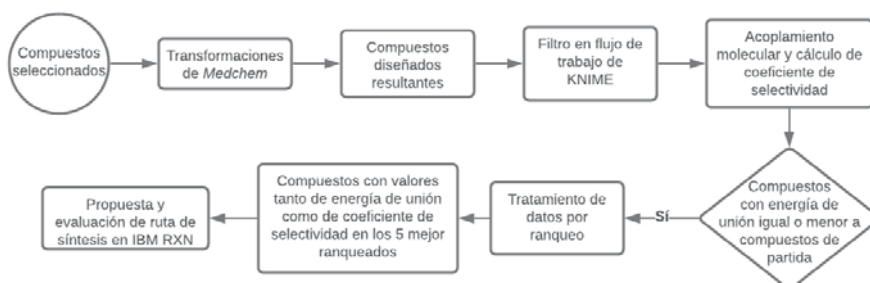


Figura 20. Esquema de la metodología general para la sección de DIFAC.

7.- Resultados y discusión

7.1 Búsqueda por similitud estructural

A partir de la búsqueda por similitud estructural se obtuvieron más de 300 compuestos que presentaron similitudes estructurales con los derivados bencimidazólicos de partida (Ver Figura 17), los cuales, nuevamente, se filtraron con la finalidad de descartar aquellos que no tienen una actividad biológica identificada, potencia reportada y, sobre todo, que no se conoce un blanco molecular sobre el que actúan para llevar a cabo su actividad (dando lugar a 255 compuestos). Este último requisito es clave debido a que dicho conocimiento es crucial en la búsqueda de potenciales blancos terapéuticos.

En la Figura 21, se muestra que los compuestos encontrados en la búsqueda (esferas sólidas rojas) comparten el espacio químico con los compuestos de partida (esferas sólidas azules), indicativo de la gran similitud entre los mismos en términos estructurales y propiedades fisicoquímicas. Por ende, se espera una tendencia similar para los blancos moleculares sobre los que podrían actuar. Esta gran similitud o acercamiento dentro del espacio químico entre ambas series de compuestos refleja la idoneidad del algoritmo de trabajo empleado para la búsqueda por similitud estructural en el presente trabajo y el buen desempeño del motor de búsqueda de ChEBML, contribuyendo a la validación de la presente búsqueda. De igual forma, se aprecia que los compuestos obtenidos de la búsqueda se expanden y distribuyen en una región amplia dentro del mismo espacio químico, lo cual es adecuado ya que indica variedad dentro del mismo conjunto de compuestos que resulta en información más amplia y variada disponible con respecto a actividades reportadas y blancos moleculares sobre los que actúan este cúmulo de compuestos resultado de la búsqueda; esto aumenta la probabilidad de encontrar el blanco o blancos potenciales para *L. mexicana* a partir de los compuestos de partida.

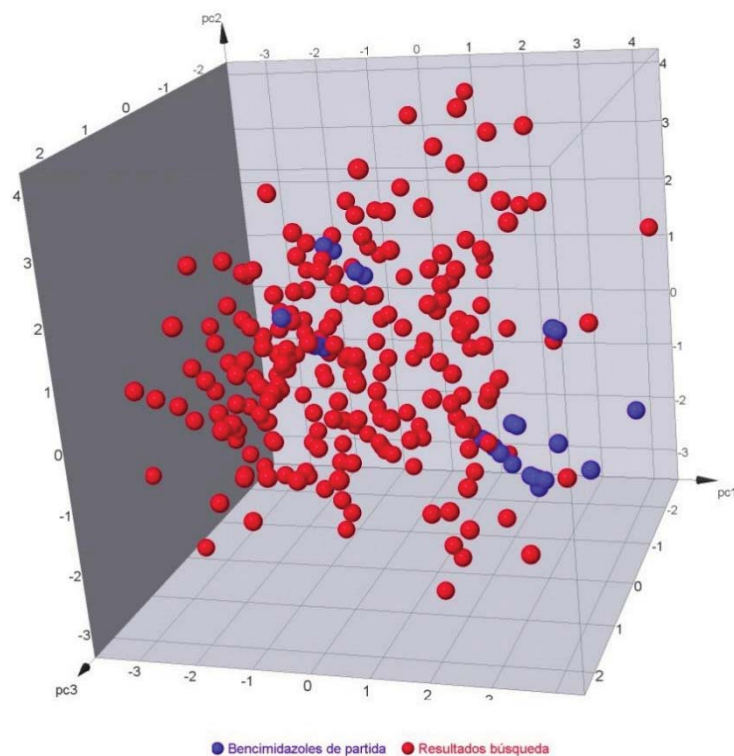


Figura 21. Espacio químico de los derivados bencimidazólicos de partida (esferas azules sólidas) y los compuestos obtenidos como resultado de la búsqueda (esferas rojas sólidas). Diagrama obtenido en DataWarrior.⁹⁴

En la Figura 22 se observa que los derivados bencimidazólicos de partida (esferas sólidas rojas) presentan gran cercanía con respecto a los antiparasitarios aprobados por la FDA (esferas sólidas azules) dentro del espacio químico, lo cual evidencia tanto la similitud estructural y fisicoquímica entre los compuestos de prueba con actividad antiparasitaria demostrada en estudios *in vitro* y algunos de estos antiparasitarios aprobados, así como una probable relación estructura-actividad entre estos compuestos. De manera paralela, los compuestos resultantes de la búsqueda (esferas sólidas verdes) también están concentrados dentro de este espacio químico, lo cual refleja la gran similitud entre los compuestos encontrados y las estructuras de los antiparasitarios, lo que contribuye a la idea de la identificación de potenciales dianas biológicas que puedan estar asociadas con la actividad antiparasitaria de los compuestos de partida.

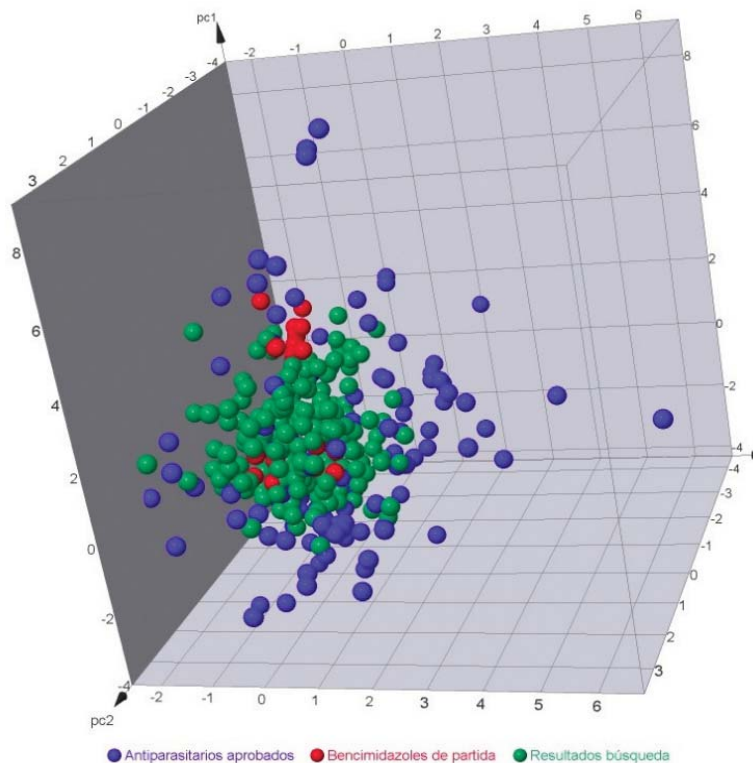


Figura 22. Espacio químico de los antiparasitarios aprobados por la FDA obtenidos de la base de datos ZINC³², derivados bencimidazólicos y compuestos resultados de la búsqueda. Diagrama obtenido en DataWarrior.⁹⁴

En la Figura 23, los derivados bencimidazólicos de partida (esferas sólidas color rojo) se encuentran concentrados en donde la mayoría de los fármacos aprobados por la FDA (esferas sólidas color verde) se encuentran dentro del espacio químico. Esta observación muestra que los compuestos bencimidazólicos de partida en este trabajo poseen propiedades fisicoquímicas y características estructurales similares a estos fármacos aprobados. Esto será de utilidad para estudios y desarrollo posterior de los mismos con objetivos terapéuticos. Por otro lado, se observa que los compuestos generados a partir de la búsqueda (esferas sólidas color amarillo) siguen una tendencia similar, poniendo en evidencia la similitud que poseen estos compuestos con respecto a los de partida y, por lo tanto, valida nuevamente el algoritmo de trabajo y el programa usados en la búsqueda por similitud estructural.

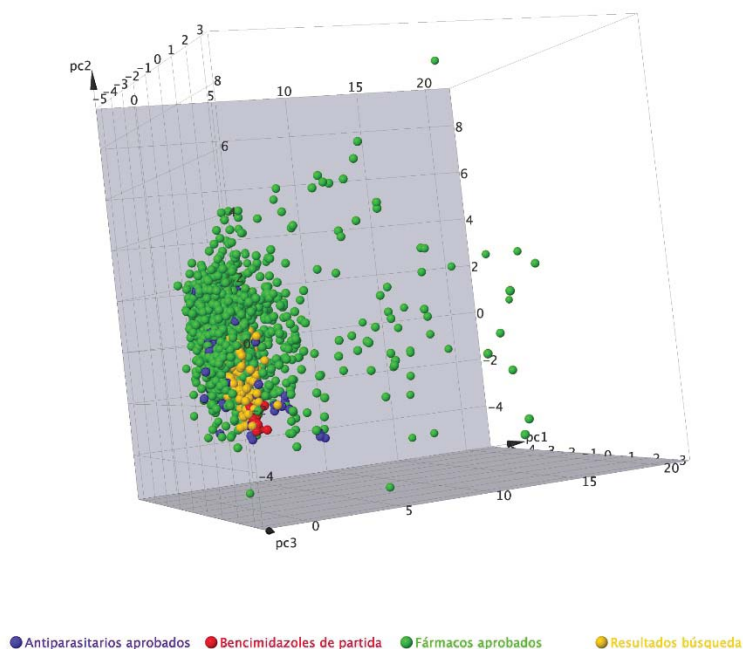


Figura 23. Espacio químico de antiparasitarios aprobados por la FDA, bencimidazoles de partida, fármacos aprobados y compuestos resultantes de la búsqueda. Diagrama obtenido en DataWarrior.⁹⁴

Por otro lado, de los más de 300 blancos identificados para los compuestos obtenidos de la búsqueda, sólo cinco de ellos resultaron estar presentes en *L. mexicana* y ser importantes para la supervivencia del parásito con base en la búsqueda realizada con apoyo en la literatura científica. Los blancos encontrados se muestran en la Tabla 8, junto con los sitios de unión seleccionados para realizar los estudios de acoplamiento molecular. También, se muestran las dianas moleculares ortólogas en el *Homo sapiens* seleccionadas junto con los sitios de unión correspondientes con fines comparativos para el estudio.

Tabla 8. Blancos presentes en *L. mexicana* e identificados como importantes para la supervivencia del parásito, así como sus ortólogos humanos. También se muestran los residuos que forman parte de los sitios de unión seleccionados de interés⁹⁵⁻¹⁰¹

Blanco en <i>L. mexicana</i> (Código PDB)	Residuos clave	Blanco en <i>H. sapiens</i> (Código PDB)	Residuos clave
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (1I32)	Arg92, Met39, Phe46, Ser40, Val206, Leu208, Asp38	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (6IQ6)	Phe102, Val101, Thr99, Arg80, Asn34, Pro36, Phe37, Asp35,

			Ile38, Gly193, Pro191
Piruvato Cinasa (3HQP)	Lys453, His480, Ala489, Leu399, Ser400, Ala481, Ser405, Thr402, Arg404, Asn407, Gly487, Lys486, Gly403, Tyr488, Val485, Ala481, Arg456	Piruvato cinasa (4FXF)	Trp482, Arg489, Arg455, Gly514, Arg516, Gly518, Phe521, Leu431, Thr522, Ser437, Thr432, Arg436, Gly520, Ser434, Ser519, Lys433
Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (2QDH)	Ser45, Ser48, Arg158, Lys239, Gly197, Leu280, Ala314, Tyr311, Ala312, Ser281, Gly283, Gly282, Arg313, Arg52, Ser310, Ala41, Lys156, Asp43, Lys51, Gly44, Lys116	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de músculo humano (5KY6)	Arg303, Arg42, Asp33, Lys107, Lys146, Gly187, Lys229, Ser271, Ser35, Gly272, Gly302, Tyr301
Dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH _{Lm} modelada)	Estabilización del sustrato endógeno y actividad: Ser196, Asn195, Asn68, Asn128 Ser100, Leu72, Lys44, Gly71, Met70, Cys131 Otros residuos que forman parte del sitio de unión: Gly101, Leu102, Asn107, Leu129, Ser130, Val134, Val140, Pro132, Asn133, Pro138, Gln139, Tyr150	Dihidroorotato deshidrogenasa (2FPV)	Thr285, Asn284, Asn212, Ser215, Phe149, Lys100, Gly148, Asn217, Asn145, Cys131
Complejo conjugado de ubiquitina E2 (UBCV2- UEV1) (6ZM3)	Cys85, Asn77 y Pro76	Complejo conjugado de ubiquitina E2 variante 2 (UBE2N-UBE2V2)	Cys87, Asp81, Asn123, Arg85, Leu121, Ala122,

		(1J7D)	Pro125.
--	--	--------	---------

Se puede observar, que tres de estas dianas moleculares están asociadas con la glucólisis: piruvato cinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa. Dicha ruta metabólica es la principal vía por la cual el parásito obtiene su energía en su forma amastigote dentro del ser humano,⁹⁵ por lo que la inhibición de las enzimas que participan en la misma es una excelente estrategia para el tratamiento contra este parásito. Por otro lado, el complejo conjugado de Ubiquitina E2 (UBCV2-UEV1) recientemente ha cobrado mayor importancia como potencial diana molecular para el desarrollo de fármacos leishmanicidas, debido a que estudios recientes han demostrado su importancia para la diferenciación de la forma promastigote a amastigote del parásito. Es importante recordar que esta última forma del parásito es la que se desarrolla y divide dentro del ser humano.⁹⁶ Finalmente, la dihidroorotato deshidrogenasa es una enzima importante para la supervivencia y desarrollo del parásito al participar en la síntesis de pirimidinas *de novo*, los cuales son bloques de construcción indispensables para los ácidos nucleicos.⁹⁷

De los blancos identificados, todos los que participan en la glucólisis ya han sido previamente estudiados y caracterizados como potenciales dianas moleculares para el diseño de distintos potenciales fármacos contra la leishmaniasis.³ El complejo conjugado de ubiquitina E2 (UBCE2Lm) es un blanco cuyo interés para el DIFAC ha crecido recientemente debido a que su utilidad dentro del parásito se está comprendiendo de manera más detallada y completa, además de que, ha sido posible obtener su estructura cristalizada.⁹⁶ De manera paralela, algunos inhibidores han sido diseñados y evaluados para la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODHLm) debido a que ha demostrado grandes diferencias estructurales en comparación con su ortólogo en el *Homo sapiens*.^{15,97}

La ya conocida utilidad en el diseño de fármacos en algunas de las dianas moleculares identificadas, así como la novedad de otras, contribuye al interés en

estudiarlas por medio de acoplamiento molecular utilizando los derivados bencimidazólicos de partida.

En la búsqueda de potenciales sitios de unión en las dianas encontradas para el estudio de acoplamiento molecular, apoyado de la literatura, se centró la búsqueda en aquellos sitios que han demostrado ser potencialmente claves para inhibir a la enzima o blanco, que tienen un papel importante en la actividad de la enzima y/o que difieran significativamente con respecto a las proteínas homólogas en el *Homo sapiens*, lo que los hace sitios de unión atractivos para inhibidores selectivos. En este sentido, los residuos seleccionados para la piruvato cinasa de *L. mexicana* (PYKLM) interaccionan y estabilizan al efector positivo fructosa-2,6-bisfosfato (2,6-FBP). Este último regula alostéricamente la actividad de la PYKLM, por lo que, al unirse a la enzima, esta última se transforma en su forma activa catalíticamente. De manera interesante, estudios de mutagénesis específicos en los residuos Lys453 e His480 mostraron disminución en la actividad de la enzima y el impedimento para unirse a 2,6-FBP. Por otro lado, la piruvato cinasa humana (PYKHs) no es regulada por 2,6-FBP, si no por la fructosa-1,6-bisfosfato (1,6-FBP), en un sitio distinto que involucra diferentes residuos para su estabilización (Tabla 8) por lo que este sitio de unión del efector 2,6-FBP es prometedor para el diseño de inhibidores selectivos de PYKLM.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Para el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *L. mexicana* (GAPDHLm), los residuos identificados forman parte de la cavidad en donde se une la porción adenosil del cofactor NAD⁺ a la enzima. Dicha región de la enzima muestra diferencias notorias en el tipo de residuos, tamaño y conformación con respecto a su homóloga humana (GAPDHHs). De igual forma, la GAPDHLm y GAPDHHs solo comparten 50-53% de su secuencia, por lo que este sitio es atractivo para el estudio de acoplamiento en el presente trabajo.¹⁰¹

Los residuos encontrados en el caso de la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa de *L. mexicana* (1,6-FBPALm), son aquellos que forman parte del sitio catalítico, los cuales difieren de su homóloga humana (1,6-FBPAAHs) en el tamaño y residuos presentes (por ejemplo, Ala 132 en lugar de Gly302 en 1,6-FBPAAHs), lo que lo

hace un sitio adecuado para los estudios de acoplamiento entre esta diana y los compuestos bencimidazólicos.⁹⁵

En el caso del complejo conjugado de ubiquitina E2 de *L. mexicana* (UBCE2Lm), los residuos encontrados también forman parte del sitio catalítico. En la actualidad, algunos de los inhibidores para el ortólogo humano (UBCE2Hs) también han sido inhibidores del UBCE2Lm sin mostrar ningún tipo de selectividad.¹⁰² Por lo que este blanco y sitio no sólo son interesantes para el estudio de acoplamiento con los bencimidazoles de partida, sino también con la finalidad de poder determinar si existe una diferencia con respecto a los inhibidores disponibles actualmente.⁹⁶

Para el caso de la DHODHLm, se sabe por análisis topográficos de la estructura de la DHODH de *L. major* con el servidor CASTp, que ésta cuenta con dos sitios que difieren de la proteína homóloga en el *Homo sapiens* (DHODHs): S1 (sitio catalítico) y S2 (que se encuentra a lado de S1 y que es el único acceso a S1 conectándose al mismo por medio de los residuos Leu72, Asn128 y Cys131) (Figura 24). No existe este último canal, ni región equivalente a S2 en la DHODHs. Por lo que los residuos seleccionados son de gran interés para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular y poder determinar la afinidad y selectividad en términos de energía de unión de los derivados por este sitio.⁹⁷

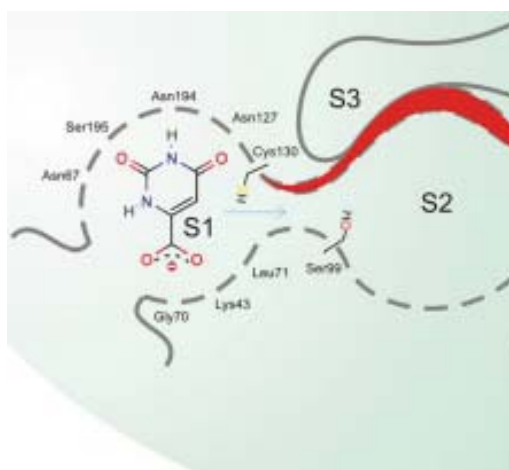


Figura 24. Representación 2D de los sitios S1 (catalítico) y S2 (sitio adyacente y acceso al sitio catalítico) de la DHODHLm en presencia del producto de la reacción (orotato), así como del sitio adyacente nombrado S3.⁹⁷

7.2 Modelado por homología de la DHODHLm

A partir de la secuencia FASTA de la DHODHLm obtenida en Uniprot y la búsqueda de secuencias homólogas en BLAST, la secuencia de la proteína dihidroorotato deshidrogenasa de *L. major* (3MHU) fue la que mostró los mejores parámetros de valor de E, porcentaje de identidad y cobertura de la secuencia problema (Tabla 9). La estructura de 3MHU se encuentra depositada en el PDB y se ha empleado con un enfoque al diseño de fármacos.⁹⁷ El valor de E (*Expect value*) igual a 0 es indicativo de que el alineamiento entre ambas secuencias es significativo y no simplemente por probabilidad. El porcentaje de identidad de 94.87% hace referencia a la gran similitud entre ambas secuencias, con ese porcentaje de residuos idénticos para ambas. Finalmente, el valor de la cobertura de la secuencia problema muestra que el 99 % de la misma es cubierta por la secuencia molde, lo cual indica la utilidad de la proteína molde como base para la construcción y diseño de la proteína de interés DHODHLm en Robetta.

Tabla 9. Proteína elegida como molde y los parámetros de alineamiento obtenidos en BLAST

Proteína	Valor de E	Porcentaje de identidad	Cobertura de la secuencia problema
3MHU (dihidroorotato deshidrogenasa de <i>L. major</i>)	0.00	94.87 %	99 %

En el alineamiento entre ambas secuencias utilizando Clustal Omega, se determinó que la amplia similitud entre las secuencias de ambas proteínas también se ve reflejada en los residuos que forman parte del sitio de unión que se estudia en el acoplamiento (regiones S1 y S2). En este alineamiento (Figura 25), se observa una gran conservación de los residuos que forman parte de estos sitios entre estas dos especies del parásito *Leishmania* (marcadas con una estrella en la Figura 25), lo que contribuye y sustenta la idea de estudiar este sitio en el acoplamiento molecular para la DHODHLm, al ser tan conservado y haber sido utilizado para el diseño de inhibidores en la DHODH de *L. major*, con la que se presenta amplia similitud o alineamiento en la secuencia.⁹⁷

<i>L. major</i>	MSLQVNL LNNTFANPFMNAAGVMCTTTEELVAMTESASGSLVSKSCTPALREGNPTPRYQ	60
<i>L. mexicana</i>	MSLQVNL LNNTFANPFMNAAGVMCTMEDLVAMTESASGSLVSKSCTPALREGNPTPRYR	60
	*****:* *;*****:	
<i>L. major</i>	ALPLGSI NSMGLPNNGDFYLAYAAEQHDYGKPLFLSMSGLSMRENEMCKRLAAVATE	120
<i>L. mexicana</i>	ALPLGSI NSMGLPNNGDFYMAAAEQHDYGKPLFLSMSGLSVRENAEMCKRLAAVATE	120
	*****:* *;*****:* *;*****:	
<i>L. major</i>	KGVILELNLSCP NVPGKPQVAYDFDAMRQCLTAVSEVYPHSGVKMPPYDFAHFDAAAE	180
<i>L. mexicana</i>	KGVILELNLSCP NVPGKPQVAYDFDAMRQCLTAVSEVYPHSGVKMPPYDFAHFDAAAE	180
	*****:	
<i>L. major</i>	ILNEFPKVQFITCINSIGNGLVIDAETESVVIKPKQGFGLGGRYVLPALANINAFYRR	240
<i>L. mexicana</i>	ILNEFPKVQFITCINSIGNGLVIDAETESVVIKPKQGFGLGGHYILPTALANVNAFYRR	240
	*****:* *;*****:*****	
<i>L. major</i>	CPGKLIFGCGGVYTGEDAFHLVLAGASMVQVGTALQEEGPSIFERLTSELLGVMAKKRYQ	300
<i>L. mexicana</i>	CPEKLIFGCGGVYTGEDAFHLVLAGASMVQVGTALQEEGPAIFERLTSELLSVMAKKGYQ	300
	** *****:*****:***** **	
<i>L. major</i>	TLDEFRGKVRTLDGTAESTR	320
<i>L. mexicana</i>	TLDEFRGKVKTLD-----	313
	*****:* **	

Figura 25. Alineamiento de las secuencias de la DHODHLm y la 3MHU en Clustal Omega.

Con base en los resultados de alineamiento entre ambas secuencias presentados con anterioridad, se obtuvo la estructura 3D de la enzima DHODHLm (Figura 26) por modelado por homología en el servidor Robetta, utilizando la secuencia de la DHODHLm y la estructura molde 3MHU como información de partida.

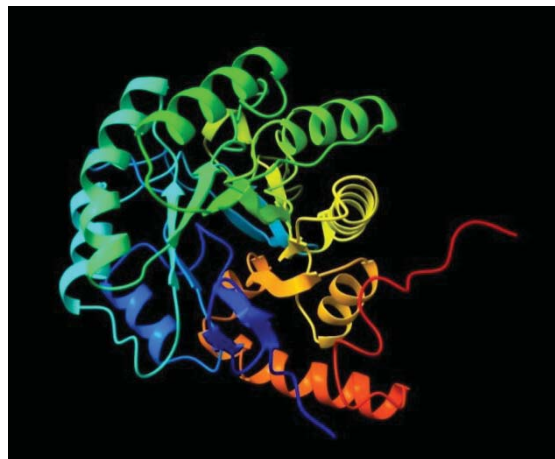


Figura 26. Estructura de la DHODHLm modelada en Robetta.

El alineamiento espacial en PyMOL de la estructura molde (3MHU) y la generada de DHODHLm por homología (Figura 27), muestra que ambas estructuras son

muy similares en su conformación y estructura con un valor de RMSD de sólo 0.280 Å, el cual se encuentra dentro del rango observado para pares de proteínas idénticas en la base de datos de PDB (0-1.2 Å) y por debajo del promedio observado para los pares de proteína reportada-proteína modelada (2.3 Å).¹⁰³ Por lo que dicho valor de RMSD confirma la gran aproximación en espacio, alineamiento tridimensional y similitud entre ambas estructuras. Se puede observar que la desviación del alineamiento entre ambas estructuras se encuentra principalmente en los extremos, zona en la que no se encuentran los sitios S1 y S2, los cuales son de interés para el acoplamiento molecular. Estos resultados validan la decisión de utilizar dicha proteína como molde, considerando el principal objetivo del modelo obtenido y las principales zonas de interés para los estudios de acoplamiento molecular.



Figura 27. Alineamiento estructural de la proteína molde en color morado (3MHU) y la modelada en Robetta en color verde (DHODHDLm).

La evaluación de la calidad de la estructura modelada (Tabla 10) y el diagrama general de Ramachandran (Figura 28), obtenidos en Molprobity, muestran que el 97.11 % de los residuos tienen ángulos de enlace considerados favorecidos por Ramachandran, con el 100 % de los mismos en regiones permitidas y 0 % de *outliers*. Lo que indica que, en general, la combinación de todos los ángulos torsionales ϕ y ψ de los enlaces que forman parte del esqueleto principal de la proteína poseen los valores adecuados para evitar choques o contactos desfavorecidos energéticamente entre los átomos de la cadena principal o entre la cadena principal y las cadenas laterales.⁶⁹ Esta bondad del modelo también se ve reflejada en el *clashscore*, el cual muestra que la estructura es mejor que el 99 % de un conjunto de proteínas depositadas en PDB con las que se comparó en términos de contactos y choques estéricos. Estos valores, de manera general, ponen en evidencia la adecuada conformación, ángulos de torsión y posicionamiento de átomos dentro de la cadena principal o esqueleto para evitar contactos no favorecidos energéticamente o superposiciones mayores a 0.4 Å entre los átomos de la proteína.⁷⁰

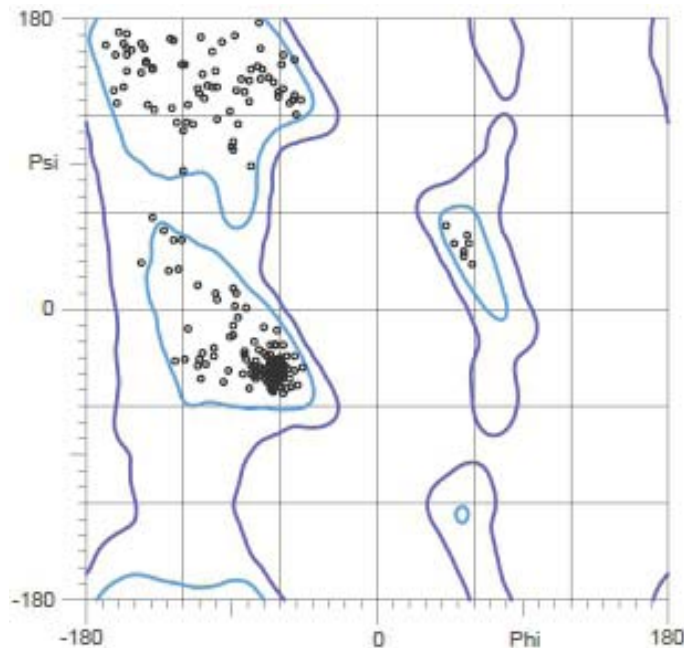


Figura 28. Diagrama de Ramachandran general de la proteína DHODHlm modelada generado en Molprobity. Región delimitada en azul claro = zona favorecida; región delimitada en azul fuerte= zona permitida.

Por otro lado, los rotámeros son las conformaciones energética (superposiciones desfavorecidas, energía potencial, etc.) y geométricamente (ángulos de torsión χ , contactos desfavorecidos, etc.) permitidas de las cadenas laterales de los residuos de la proteína. De acuerdo con la evaluación de MolProbity (Tabla 10), hay cero rotámeros pobres, con 99.64 % de los mismos favorecidos desde el punto geométrico y energético. Estos valores indican que las cadenas laterales de los residuos de la proteína respetan los valores de ángulos y espacio estérico para evitar malos contactos o choques que impidan el alcance de mínimos locales de la estructura de la proteína.¹⁰⁴

Las desviaciones $C\beta$ son una medida que permite combinar todas las desviaciones que surgen con respecto al $C\alpha$. Para el caso de la proteína modelada, esta desviación se encuentra ligeramente fuera dentro del valor objetivo para un modelo ideal. Sin embargo, el porcentaje de ángulos y enlaces malos es muy cercano al valor objetivo de un modelo ideal.

Tabla 10. Resultados principales de la evaluación del modelo utilizando MolProbity

Contactos de todos los átomos	<i>Clashscore, todos los átomos</i>	1.480		Percentil 99 % (N= 1784, todas las resoluciones)
	<i>Clashscore es el número de traslapes estéricos serios (> 0.4 Å)</i>			
Geometría proteica	Rotámeros pobres	0	0.00%	Objetivo: < 0.3 %
	Rotámeros favorecidos	254	99.64 %	Objetivo: > 98 %
	<i>Outliers</i> de Ramachandran	0	0.00 %	Objetivo: < 0.05 %
	Favorecidos por Ramachandran	302	97.11 %	Objetivo: > 98 %
	Z-Score de distribución Ramachandran	-0.70 ±0.44		Objetivo: abs(Z score) < 2
	Puntaje(score) Molprobity	0.97		Percentil 100 (N= 27675, 0Å-0.99Å)
	Desviaciones $C\beta$ >0.25 Å	1	0.35 %	Objetivo: 0
	Malos enlaces	5/2421	0.21 %	Objetivo: 0 %
	Malos ángulos	12/3280	0.37 %	Objetivo: < 0.1 %

De manera general, tanto los valores de *Z-score* como el de Molprobit (el cual toma en cuenta los valores de los diagramas de Ramachandran, *clashscore*, etc.) indican la buena calidad del modelo de manera global, resumiendo los resultados de validación y evaluación de calidad ya descritos anteriormente. El *score* de Molprobit coloca, con base en la información de calidad de la proteína evaluada, a dicha proteína en un percentil de 100 % comparado con una muestra de 27675 proteínas reportadas con una resolución similar.

De manera paralela, la evaluación en el servidor de QMEAN4 y ModFOLD6 mostraron un puntaje de calidad global del modelo de 0.92 y 0.5680 (con un valor de $p= 9.34 \times 10^{-5}$), respectivamente. Para el caso del valor de QMEAN4, este es considerado como un puntaje obtenido a partir de la calidad local y global de un modelo que va de 0 a 1. Por lo que el valor de 0.92 es un indicador de la buena calidad del modelo de manera global. El puntaje de ModFOLD6 va de 0 a 1 de igual forma, y de acuerdo con su estimador de calidad: aquellos modelos con un puntaje mayor a 0.4 hacen referencia a modelos más confiables y completos, los cuales son altamente probables de ser muy similares a la estructura nativa. En este sentido, la Figura 29a (obtenida del servidor QMEAN de SWISS) y 29b (obtenida del servidor ModFOLD6) permiten observar la buena calidad general alrededor del modelo (color azul) en contraste a las pocas zonas que presentan desviaciones notorias en la calidad de este (color rojo), principalmente localizadas en el extremo de la cadena. Ambos servidores muestran una misma tendencia, lo que permite validar la evaluación de la calidad del modelo utilizando dos estimadores distintos.

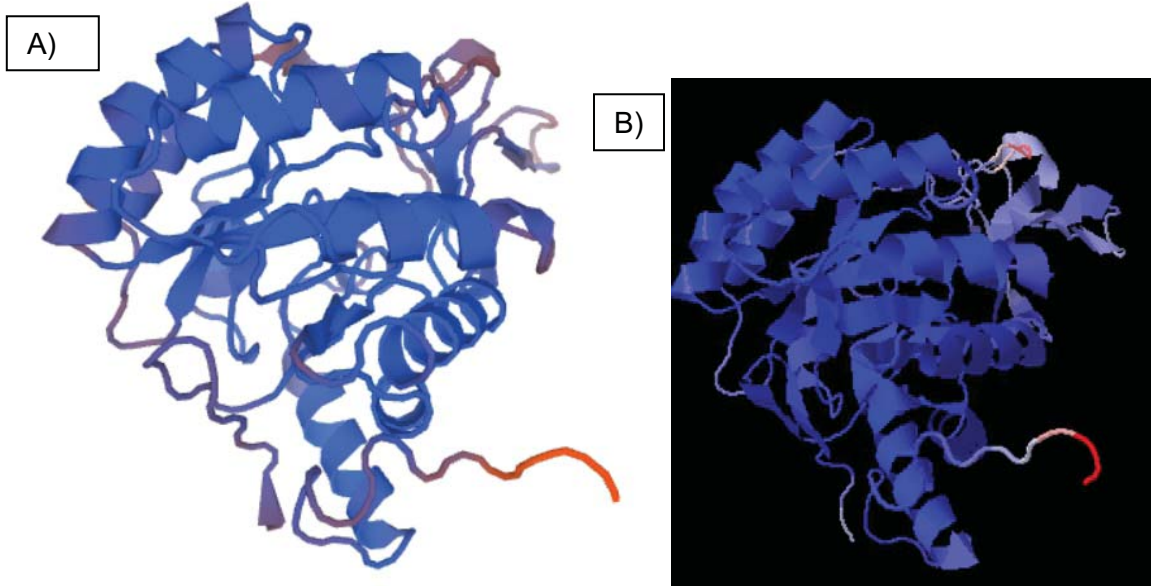


Figura 29. Representación gráfica de la calidad de la estructura de la DHODHLM modelada generada por A) QMEAN y B) ModFOLD6.

De manera complementaria, una observación más detallada en la calidad local de los diferentes residuos (Figuras 30, 31 y 32), permite determinar que los residuos de interés para el estudio de acoplamiento molecular (residuos de los sitios S1 y S2 que se encuentran en la región 44-196) cuentan con una buena calidad, mientras que la región en el extremo de la cadena muestra una mayor desviación de la calidad para el modelo (Figuras 29a y 29b). Esto se puede deber, principalmente, a que en el extremo terminal es en dónde el alineamiento entre la secuencia de la proteína molde (3MHU) y la objetivo (DHODHLM) son diferentes (Figura 25), por lo que el programa realiza el modelado de estos residuos por un método *de novo* que puede contribuir a una mayor variación dentro del modelo.



Figura 30. Calidad local del modelo DHODHLm por el servidor QMEAN.

La Figura 30, obtenida en el servidor QMEAN, por un lado muestra la desviación de la similitud predicha con respecto a la proteína objetivo por residuo de ésta, en donde 1 representa el valor máximo de similitud (idénticos). Mientras que en la Figura 31 se muestra el error asociado por residuo en Å. En ambos casos, se observa que los residuos de interés que se encuentran en la región 68-196 presentan una buena calidad en general, siendo los residuos en el extremo los que presentan una mayor desviación en el valor de similitud (Figura 30) y error asociado (Figura 31), lo cual se puede deber a la razón antes discutida. Se observa que para los residuos de interés (Lys44, Asn68, Met70, Gly71, Leu72, Ser100, Asn128, Asn195 y Ser196) la mayor desviación en la similitud predicha es de 0.4 unidades con respecto al valor máximo de 1 (Figura 30), y que el error asociado máximo no supera los 4 Å (Figura 31). Esto contribuye a los resultados positivos sobre la calidad general global y local del modelo obtenido discutidos a lo largo de la presente sección.

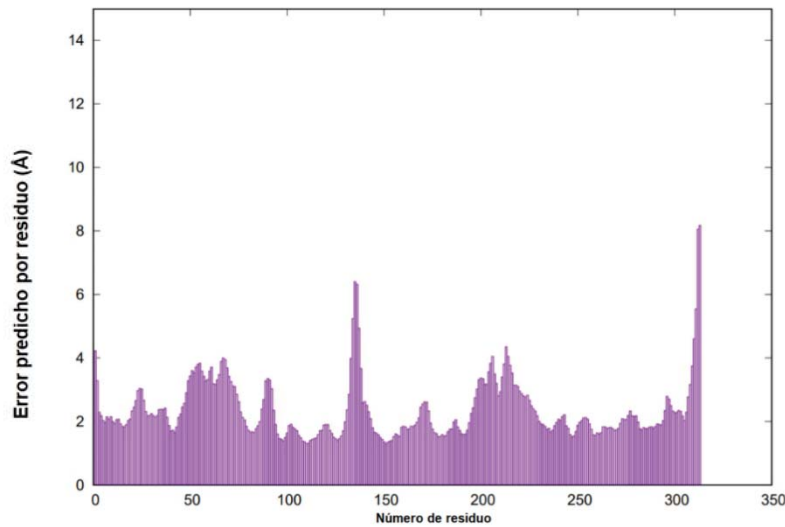


Figura 31. Evaluación local del modelo DHODHm obtenida usando el servicio MolFOLD6. La Figura 32 muestra, de manera puntal, que los residuos que forman parte de los sitios de interés para el acoplamiento molecular (Lys44, Asn68, Met70, Gly71, Leu72, Ser100, Asn128, Cys131, Asn195, y Ser196) presentan una calidad idónea (color azul), lo que refleja lo observado anteriormente. Esto es indicativo que dichos residuos poseen los valores de ángulos de torsión, longitud de enlace, rotámeros favorecidos, contactos o superposiciones, adecuados para obtener su conformación con la mínima energética local.

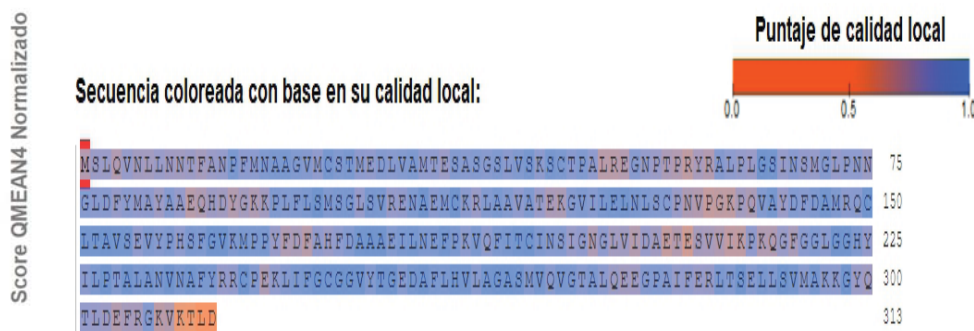


Figura 32. Calidad local por residuo y código de colores con base en los valores de QMEAN4 locales [0,1].

En este sentido, estos resultados junto con los observados en las Figuras 31, 30 y 29 nos permiten ver la idoneidad del modelo con respecto a este sitio para los

estudios de acoplamiento molecular. Con base en los resultados presentados con respecto a la calidad local de las regiones de interés (Figuras 29, 30 y 31) y a lo observado con respecto a la calidad global del modelo por medio de distintas herramientas y servidores (Tabla 10 y Figuras 27, 28 y 29), se determinó que el modelo cuenta con la calidad idónea para realizar los trabajos de acoplamiento molecular utilizando los sitios de unión de interés en el presente trabajo.

7.3 Acoplamiento molecular

7.3.1 Validación

Para la validación del acoplamiento molecular se siguió la metodología descrita en la Sección 6.4.5 para ambos programas utilizados (Autodock 4.2.6 y MOE). Los ligandos de referencia y/o sustratos endógenos que se encuentran cristalizados y que fueron empleados para la validación del acoplamiento molecular se muestran en las Tablas 11 y 12 junto con el papel que juegan dentro del blanco molecular al que están asociados. Para el caso de UBCE2Lm y UBCE2Hs, al no tener algún ligando cocrystalizado de referencia, se determinó el RMSD asociado a los resultados del acoplamiento de los 25 derivados (ver Sección 6.4.5).

Tabla 11. Ligandos cristalizados de referencia para las dianas en *L. mexicana*^{95–97,99–101,105}

Blanco molecular	Ligando de referencia y/o sustrato endógeno	Función/importancia
PYKLM	Fructosa-2,6-bisfosfato (2,6-FBP)	Regulador alostérico y positivo de la actividad de la PYKLM
GAPDHLM	NMD TND NAD ⁺	Tanto el NMD como TND son inhibidores reportados sobre GAPDHLM NAD ⁺ es el cofactor de la enzima.
1,6-FBPALM	Manitol-1,6-bisfosfato (1,6-MBP) Fructosa-1,6-bisfosfato (1,6-FBP)	La 1,6-FBP es sustrato endógeno de la enzima, mientras que el 1,6-MBP es un inhibidor reportado.
DHODHLM	Orotato* Ácido 4-aminoorótico (L27)*	El orotato es el producto de la reacción de la DHODHLM. Este se encuentra unido y estabilizado por los mismos residuos que el sustrato endógeno

		(dihidroorotato). El compuesto L27 es un inhibidor de la DHODHLm reportado que se une al mismo sitio que el sustrato endógeno.
--	--	--

*Ligandos que no se encuentran cocrystalizados en la misma proteína con la que se realizó el acoplamiento molecular

Estos ligandos tienen el propósito de servir como punto de referencia para los valores de energía de unión y coeficiente de selectividad obtenidos para los derivados estudiados, al tratarse de sustratos endógenos o inhibidores cuya actividad se encuentra descrita en la literatura. Adicionalmente, para el caso de los sustratos endógenos, la comparación entre dichos valores predice si la interacción es energéticamente más favorable entre un blanco dado y alguno de los derivados estudiados con respecto al sustrato endógeno, lo que permitiría predecir si los compuestos bajo estudio previenen la unión de los sustratos en el sitio de unión catalítico y con ello si inhiben la actividad de la enzima.

Tabla 12. Ligandos cristalizados de referencia para las dianas en *H. sapiens*^{95-97,101,105}

Blanco molecular	Ligando de referencia y/o sustrato endógeno	Función/importancia
PYKHs	Fuctosa-1,6-bisfosfato (1,6-FBP)	Regulador alostérico y positivo de la actividad de la PYKHs.
GAPDHHs	NAD ⁺	NAD ⁺ es el cofactor de la enzima.
1,6-FPBAHs	Manitol-1,6-bisfosfato (1,6-MBP) Fructosa-1,6-bisfosfato (1,6-FBP)	La 1,6-FBP es sustrato endógeno de la enzima, mientras que el 1,6-MBP es un inhibidor reportado.
DHODHHs	Orotato Ácido 4-aminoorótico (L27)*	El orotato es el producto de la reacción de la DHODHLm. Este se encuentra unido y estabilizado por los mismos residuos que el sustrato

		<p>endógeno (dihidroorotato). El compuesto L27 es un inhibidor de la DHODH de <i>L. major</i> reportado que se une al mismo sitio que el sustrato endógeno. Estos últimos han demostrado selectividad sobre DHODH de <i>L. major</i> con respecto a la DHODHs.</p>
--	--	--

*Ligandos que no se encuentran cocrystalizados en la misma proteína con la que se realizó el acoplamiento molecular.

La Tabla 13 enlista el valor de RMSD obtenido a partir del alineamiento entre el ligando de referencia o sustrato endógeno cristalizado, con la mejor conformación generada del mismo en el acoplamiento molecular por cada programa, respectivamente. El RMSD determina la variación en la conformación que existe entre ambas representaciones o modos de unión. Se observa en dicha tabla que los valores de RMSD se encuentran por debajo del límite establecido de 2 Å para la validación del acoplamiento.⁴⁸ Lo que demuestra que ambos programas tienen la capacidad de generar modos de unión y predecir energías de unión confiables, es decir, que son cercanos a los valores nativos de los ligandos estudiados. Los valores de RMSD para UBCE2Lm y UBCE2Hs se refieren a la tendencia encontrada para los 25 derivados bencimidazólicos. Para el caso de aquellos ligandos que no se encuentran cocrystalizados en la misma proteína con la que se realizó el acoplamiento molecular (marcados con asteriscos en Tablas 11 y 12), esta capacidad del programa es aún más notoria. De particular interés, es el caso de la proteína obtenida por modelado por homología (DHODHLm) en donde se logró obtener una conformación muy similar a la reportada por el ligando cocrystalizado en la proteína homóloga en *L. major*, con un valor de RMSD de 0.00.

Las diferencias observadas en los valores de RMSD entre ambos programas utilizados se debe a que en cada programa se utilizó una diferente función de evaluación y algoritmo de búsqueda para el acoplamiento (ver Secciones 6.4.4 y 6.4.5). A pesar de estas diferencias, ambos muestran la misma tendencia positiva

sobre los valores de RMSD, es decir, que se encuentran dentro del límite de 2 Å. Lo cual enriquece y contribuye a la validación del acoplamiento molecular al tratarse de dos métodos distintos (ATD4 y MOE) para obtener dichas conformaciones para los ligandos.

Tabla 13. Valores de RMSD obtenidos para la validación del acoplamiento molecular en MOE y ATD4

Ligando de referencia o sustrato endógeno (<i>L. mexicana</i>)	RMSD en Å (ATD4)	RMSD en Å (MOE)	Ligando de referencia o sustrato endógeno (<i>H. sapiens</i>)	RMSD en Å (ATD4)	RMSD en Å (MOE)
2,6-FBP	0.144	1.177	1,6-FBP	1.703	1.617
NMD	1.42	1.35	NAD ⁺	0.00	0.00
TND	1.38	1.745			
NAD ⁺	0.00	1.624			
1,6-MBP	0.913	1.686	1,6-MBP	1.645	1.524
1,6-FBP	1.163	1.544	1,6-FBP	2.644	1.264
UBCE2Lm	Menor a 2	Menor a 2	UBCE2Hs	Menor a 2	Menor a 2
L27	0.00	0.227	L27	0.00	0.487
L28	0.00	0.082	L28	0.00	0.239
Orotato	0.00	0.049	Orotato	0.00	0.073

7.3.2 Resultados globales de energía de unión y coeficiente de selectividad en la energía de unión

Las Tablas 14 y 15 presentan los valores promedio de energía de unión y coeficiente de selectividad en términos de energía de unión obtenidos de los derivados bencimidazólicos (primeras 5 filas), así como de los ligandos de referencia. Los coeficientes de selectividad fueron calculados para cada blanco molecular en *L. mexicana* en relación con su correspondiente blanco ortólogo en el *Homo sapiens* a partir de los resultados de energía de unión de MOE y ATD4, respectivamente. Tanto el promedio de energía de unión y coeficiente de

selectividad mostrados en las Tablas 14 y 15 son representativos de los valores individuales para cada derivado. (Ver anexo 11.3)

Tabla 14. Valores de energía de unión promedio y coeficiente de selectividad en energía de unión obtenidos en MOE para los 25 derivados bencimidazólicos y los ligandos de referencia. Todos los valores de energía están en kJ/mol

Parámetro	Gliceraldehído -3-fosfato- deshidrogenasa (GAPDHLm y GAPDHHs)	Fructosa- 1,6- bisfosfato aldolasa (1,6- FBPALm y 1,6- FBPAHs)	Piruvato cinasa (PYKLM y PYKHs)	Complejo de Ubiquitina E2 (UBCE2Lm y UBCE2Hs)	Dihidroorotato Deshidrogenasa (DHODHLm y DHODHHs)
Promedio de coeficiente de selectividad en energía de unión sobre el blanco en <i>L. mexicana</i> (bencimidazoles)	1.27	0.86	1.01	1.04	1.85
Mejor energía de unión en <i>L. mexicana</i> . (bencimidazoles)	22	3	13	17	25
Mejor energía de unión en <i>H. sapiens</i> . (bencimidazoles)	3	22	12	8	0
Promedio de energía de unión en <i>L. mexicana</i> . (bencimidazoles)	- 9.64	- 9.16	- 9.07	- 10.07	- 14.68
Promedio de energía de unión en <i>H. sapiens</i> . (bencimidazoles)	- 7.72	- 10.79	- 9.05	-9.66	-8.02

Coefficiente de selectividad de energía de unión de ligandos de referencia sobre <i>L. mexicana</i>.	NMD: 1.12 TND: 1.28	1,6-MBP: 0.89	L29: 1.16	NSC697923: 1.14 BAY11-7082 0.99	L27: 0.79
Energía de unión de ligandos de referencia y/o sustratos endógenos en <i>L. mexicana</i>.	NMD: - 10.26 TND: - 10.53 NAD ⁺ - 11.25	1,6-MBP: - 15.27 1,6-FBP: - 15.26	L29: - 8.61 2,6-FBP: - 20.33	NSC697923 : - 8.77 BAY 11-7082: - 6.78	L27: - 10.79 Orotato - 10.44 Dho: - 8.45
Energía de unión de ligandos de referencia y/o sustratos endógenos en <i>H. sapiens</i>.	NMD: - 9.18 TND: - 8.24 NAD ⁺ : - 12.00	1,6-MBP: - 17.08 1,6-FBP: - 17.60	L29: - 7.42 1,6-FBP: - 12.40	NSC697923 : - 7.68 BAY 11-7082: - 6.83	L27: - 13.63 Orotato: - 12.83 Dho: - 9.42

7.3.2.1 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDHLm y GAPDHHs)

Se observa en ambas tablas (Tablas 14 y 15) que el promedio de las energías de unión entre los derivados y la GAPDHLm es mayor que el valor de energía de unión entre los inhibidores de referencia (NMD y TND) y el cofactor NAD⁺ con la misma enzima respectivamente. Lo anterior indica que los derivados en general no muestran una mayor afinidad (en términos de energía de unión) hacia este blanco en el sitio de unión del cofactor en relación con los inhibidores reportados y al mismo cofactor. Por otro lado, la energía de unión promedio entre los derivados bencimidazólicos y la GAPDHHs es menor en comparación con el valor mostrado por los inhibidores reportados con la misma enzima. Lo cual se ve reflejado en que la mayoría de los derivados bencimidazólicos muestran una mejor energía de

unión hacia GAPDHLm que a GAPDHHs (22 de 25 y 16 de 9 derivados en MOE y ATD, respectivamente). Sin embargo, el coeficiente de selectividad promedio que presentan los derivados sobre la GAPDHLm es, en general, comparable o igual que los inhibidores de referencia, con sólo unas décimas de diferencia, en especial con respecto al inhibidor NMD.

7.3.2.2 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (1,6-FBPALm y 1,6-FBPAHs)

El promedio de las energías de unión entre los derivados bencimidazólicos y la 1,6-FBPALm es mucho mayor que el valor obtenido para el inhibidor de referencia (1,6-MBP) y el sustrato endógeno (1,6-FBP) con la misma enzima, respectivamente. De manera paralela, el promedio del coeficiente de selectividad de los derivados sobre 1,6-FBPALm es muy similar (diferencia en centésimas) al del valor del inhibidor de referencia 1,6-MBP. Lo anterior refleja una pobre selectividad en términos de energía de unión, ya que 1,6-MBP es un inhibidor competitivo conocido por ser poco selectivo sobre esta enzima.

Finalmente, al comparar el promedio de los valores de energía de unión entre los derivados y 1,6-FBPALm con la 1,6-FBPAHs, en el caso de MOE, el valor para el ortólogo en *H. sapiens* es mayor (lo cual coincide con su pobre coeficiente de selectividad), mientras que estos dos valores varían únicamente por centésimas en el caso de ATD4. Sin embargo, en ambos programas la mayoría de los derivados bencimidazólicos presentan una mejor energía de unión para 1,6-FBPAHs en contraste con 1,6-FBPALm. Por lo cual, en general estos valores no colocan a esta proteína como una diana prometedoras para este estudio.

Tabla 15. Valores de energía de unión promedio y coeficiente de selectividad en energía de unión obtenidos en ATD4 para los 25 derivados bencimidazólicos y los ligandos de referencia. Todos los valores de energía están en kJ/mol

Parámetro	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDHLm y GAPDHHs)	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (1,6-FBPALm Y 1,6-FBPAHs)	Piruvato cinasa (PYKLM y PYKHs)	Complejo de Ubiquitina E2 (UBCE2Lm y UBCE2Hs)	Dihidroorotato Deshidrogenasa (DHODHLm y DHODHHs)
Promedio de coeficiente de selectividad en energía de unión. (bencimidazoles)	1.03	1.02	0.98	1.11	1.28
Mejor energía de unión en <i>L. mexicana</i> . (bencimidazoles)	16	12	10	22	25
Mejor energía de unión en <i>H. sapiens</i> . (bencimidazoles)	9	13	15	3	0
Promedio de energía de unión en <i>L. mexicana</i> . (bencimidazoles)	- 5.38	- 5.00	- 4.23	-6.24	-6.90
Promedio de energía de unión en <i>H. sapiens</i> . (bencimidazoles)	- 5.33	- 4.96	- 4.36	-5.64	-5.51
Coeficiente de selectividad de energía de unión	NMD: 0.93 TND:	1,6-MBP: 0.95	L29: 0.89	NSC697923: 0.86 BAY 11-	L27: 1.13

de ligandos de referencia sobre <i>L. mexicana</i> .	1.02			7082: 1.06	
Energía de unión de ligandos de referencia y/o sustratos endógenos en <i>L. mexicana</i> .	NMD: - 8.22 TND: - 8.44 NAD ⁺ : - 9.30	1,6-MBP: - 7.27 1,6-FBP: - 7.37	L29: - 3.8 2,6-FBP: - 8.76	NSC697923: - 3.26 BAY 11- 7082: - 3.14	L27: - 5.98 Orotato: - 5.87 Dho: - 2.77
Energía de unión de ligandos de referencia y/o sustratos endógenos en <i>H. Sapiens</i>	NMD: - 8.86 TND: - 8.29 NAD ⁺ : - 7.7	1,6-MBP: - 7.67 1,6-FBP: - 9.04	L29: - 4.26 1,6-FBP: - 8.65	NSC697923: - 3.78 BAY 11- 7082: -2.95	L27: - 5.30 Orotato: - 5.31 Dho: - 2.84

7.3.2.3 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la piruvato cinasa (PYKLm y PYKHs)

Continuando ahora con la PYKLm, el promedio de energía de unión entre la proteína y los derivados bencimidazólicos es más bajo que con el inhibidor de referencia (L29), pero mucho mayor que con el ligando endógeno de referencia (el efector alostérico 2,6-FBP) en ambos programas. En este sentido, los valores de energía de unión promedio entre los derivados y la PYKLm, así como con la PYKHs son muy similares entre sí, con sólo una ligera diferencia en centésimas entre ambos programas. Esto último se ve reflejado en su bajo coeficiente de selectividad promedio, siendo uno de los más bajos entre los blancos evaluados, y en que la mayoría de los derivados presentan un mejor valor de energía de unión para el blanco en *H. sapiens* que en *L. mexicana*.

7.3.2.4 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad del complejo conjugado de ubiquitina E2 (UBCE2Lm y UBCE2Hs)

El valor promedio de la energía de unión entre los derivados bencimidazólicos y la diana UBCE2Lm es menor con respecto al mostrado por los inhibidores de referencia (NSC697923 y BAY-117082). En este sentido, el valor promedio de energía de unión entre los derivados y la UBCE2Lm también es menor con respecto al que existe entre estos compuestos y el blanco UBCE2Hs. En contraste, el promedio del coeficiente de selectividad es muy similar a los inhibidores ya reportados, los cuales se sabe actúan sobre dicha diana tanto en *L. mexicana* como en *H. sapiens* sin mostrar una selectividad clara.⁹⁶

7.3.2.5 Análisis de resultados de energía de unión y coeficiente de selectividad de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODHLm y DHODHs)

De manera notable, y con una tendencia no vista para los anteriores blancos en ambos programas, el promedio de los valores de energía de unión entre los derivados bencimidazólicos y la DHODHLm es mucho más bajo que el mostrado por el inhibidor de referencia y los ligandos endógenos. Este valor también es mucho más bajo con respecto al promedio entre estos derivados y la proteína ortóloga en *H. sapiens*. En este mismo sentido, el promedio del coeficiente de selectividad es notablemente más alto que el del inhibidor de referencia, siendo el más alto de todos los blancos evaluados. Mientras que la energía de unión promedio es la más baja entre todos los blancos evaluados. De igual manera, todos los derivados bencimidazólicos poseen un valor de energía de unión mejor para DHODHLm con respecto a la ortóloga humana DHODHs, lo cual no es el caso con ningún otro blanco evaluado. Las observaciones antes descritas para la DHODHLm están presentes, claramente, en ambos programas utilizados.

Debido a estos resultados (resumidos en la Tabla 16), se determinó a la DHODHLm como la diana molecular más prometedora en este trabajo y, por ende, la ideal para los siguientes estudios del presente trabajo. Es importante destacar

que el resto de los blancos moleculares podrán ser útiles con propósitos de optimización y propuesta de nuevas series de compuestos. Por ejemplo, para el caso de la UBCE2Lm (la segunda mejor diana), los derivados pueden ser optimizados para incrementar el coeficiente de selectividad con respecto a los inhibidores ya reportados (lo cuales se sabe no son selectivos y actúan sobre dicha diana molecular tanto en *L. mexicana* como en *H. sapiens*). Esto podrá ser estudiado y evaluado en trabajos posteriores de nuestro grupo de investigación.

Tabla 16. Resumen de resultados de acoplamiento molecular entre los derivados bencimidazólicos y dianas estudiadas

	GAPDHLm	1,6-FBPALm	PYKLM	UBCE2Lm	DHODHLm
Resultado de acoplamiento molecular de los derivados bencimidazólicos con respecto a cada diana molecular estudiada.	Mayor energía de unión que los inhibidores de referencia y sustrato endógeno. Bajo coeficiente de selectividad.	Mayor energía de unión que los ligandos de referencia. Bajo coeficiente de selectividad. Mejor energía de unión sobre 1,6-FPBAHs.	Mayor energía de unión que el sustrato endógeno. La mayoría de los derivados presenta una mejor energía de unión sobre PYKHs. Bajo/pobre coeficiente de selectividad.	Coeficiente de selectividad bajo, muy similar a los inhibidores pocos selectivos reportados.	Notablemente mejor energía de unión sobre la DHODHLm que sobre DHODHs. Coeficiente de selectividad marcadamente alto (El mejor entre todos los blancos). Menor energía de unión que el inhibidor de referencia y/o sustrato endógeno.

7.3.3 Resultados individuales de energía de unión y coeficiente de selectividad en la energía de unión sobre DHODHLM

La alta selectividad en la energía de unión y la notable baja energía de unión de los derivados bencimidazólicos hacia DHODHLM, en contraste con la ortóloga humana y el resto de los blancos evaluados, se puede visualizar de manera individual para cada derivado al comparar la energía de unión entre ambas proteínas (DHODHLM y DHODHs), los derivados bencimidazólicos y los ligandos de referencia, así como los coeficientes de selectividad en términos de energía asociados a los mismos (Tabla 17).

Tabla 17. Valores de energía de unión entre DHODHLM, DHODHs, los derivados bencimidazólicos y ligandos de referencia, así como los coeficientes de selectividad correspondientes. Todos los valores de energía están en kJ/mol

Blanco	DHODHLM		DHODHs		Coeficiente de selectividad (energía de unión)	
	MOE	ATD4	MOE	ATD4	MOE	ATD4
Ligando						
1	- 14.27	- 8.90	- 10.70	- 7.43	1.33	1.20
2	- 11.97	- 6.72	- 6.80	- 3.93	1.76	1.71
3	- 14.62	- 9.45	- 9.43	- 7.73	1.55	1.22
4	- 12.48	- 7.30	- 7.87	- 4.22	1.59	1.73
5	- 13.80	- 9.13	- 10.73	- 7.39	1.29	1.23
6	- 13.10	- 5.17	- 7.08	- 4.48	1.85	1.15
7	- 13.31	- 8.19	- 9.58	- 7.36	1.39	1.11
8	- 12.73	- 5.86	- 7.03	- 4.57	1.81	1.28
9	- 14.48	- 5.30	- 6.79	- 4.72	2.13	1.12
10	- 15.28	- 6.42	- 7.58	- 4.90	2.02	1.31
11	- 15.84	- 6.18	- 7.76	- 4.71	2.04	1.31
12	- 15.42	- 5.80	- 7.47	- 4.73	2.06	1.23
13	- 16.25	- 6.35	- 7.59	- 4.84	2.14	1.32
14	- 14.75	- 6.01	- 7.66	- 4.33	1.92	1.39
15	- 15.22	- 6.65	- 8.11	- 4.70	1.88	1.41
16	- 15.05	- 6.42	- 7.63	- 4.47	1.97	1.44
17	- 15.56	- 5.84	- 8.01	- 4.44	1.94	1.32
18	- 16.72	- 6.26	- 8.34	- 5.82	2.01	1.08
19	- 18.34	- 7.26	- 7.91	- 5.82	2.32	1.25
20	- 15.59	- 6.79	- 8.26	- 5.81	1.89	1.17
21	- 15.60	- 6.48	- 7.86	- 5.19	1.99	1.25
22	- 15.07	- 6.05	- 7.58	- 4.26	1.99	1.42

23	- 13.90	- 8.21	- 7.23	- 7.02	1.92	1.17
24	- 14.73	- 8.50	- 7.80	- 7.55	1.89	1.13
25	- 12.90	- 7.37	- 7.78	- 7.36	1.66	1.00
L27	- 10.79	- 5.98	- 13.63	- 5.30	0.79	1.13
Orotato	- 10.44	- 5.87	- 12.83	- 5.31	NA	NA
Dho	- 8.45	- 2.77	- 9.42	- 2.84	NA	NA

La Figura 33 muestra que el ligando 1 interacciona con residuos que forman parte de las regiones S1 y S2, sitio catalítico y región adyacente para ingresar al sitio catalítico, respectivamente. Estos sitios son clave para la estabilización del sustrato endógeno y actividad catalítica de la enzima DHODHLM. Estos residuos se refieren a la Cys131, Leu72 y Met70 por mencionar algunos. De especial interés, es su interacción con Cys131, que funge como base catalítica para sustraer un hidrógeno del dihidroorotato durante su transformación al orotato.^{97,106}

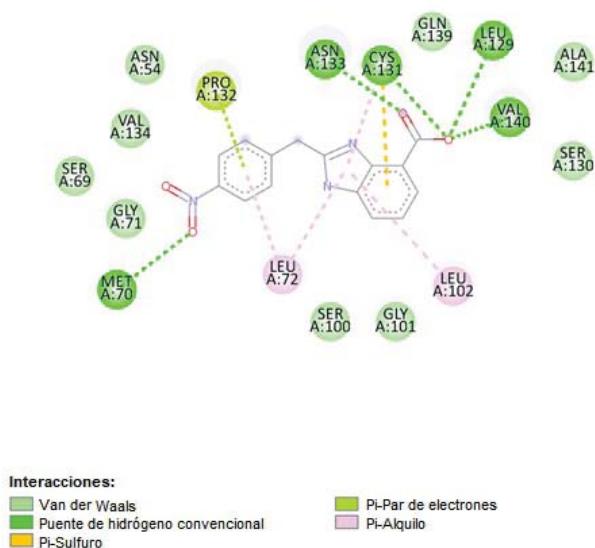


Figura 33. Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLM y el ligando 1.

El ligando 1 también presenta interacción con los residuos Leu102, Leu129, Pro132, Asn133 y Val140, los cuales forman parte de las zonas S1 y S2. Aunado a esta observación, el ligando se localiza de manera cercana a otros residuos importantes para la estabilización del sustrato endógeno, tales como Gly71, Ser100, Gly101, Ser130, Val134 y Gln139. Dichas observaciones reflejan la adecuada localización del ligando 1 en el sitio de interés. En este sentido, la

Figura 34 muestra que el ligando 1 se encuentra posicionado dentro del sitio de unión de interés, con la parte del bencimidazol en la zona S2 que hace referencia a la zona adyacente al sitio catalítico y la parte del nitrobenzilo dentro del canal de la cavidad referente al sitio catalítico (zona S1). Esta conformación permite observar la importancia del metileno entre el bencimidazol y el benceno de la molécula, para que este último fragmento pueda ingresar al sitio catalítico debido a la flexibilidad del carbono alifático que une estas dos subestructuras. Con base en la localización en la entrada de la cavidad catalítica y la energía de unión más baja del ligando 1 con respecto al sustrato endógeno (Tabla 17), se podría inferir un bloqueo en la entrada e interacción del sustrato con el sitio catalítico.

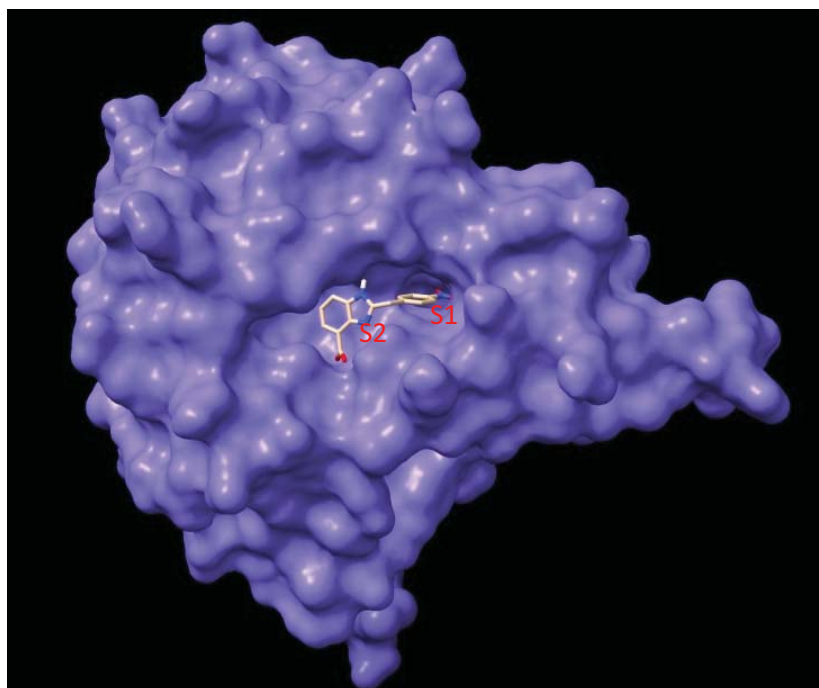


Figura 34. Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 1.

Una visualización más cercana en el sitio de unión (Figura 35), permite observar que, efectivamente, el ligando se encuentra interaccionando con residuos importantes (Cys131, Leu72, Gly71, Leu129, Leu102, etc.) dentro del sitio de interés. Es importante destacar que las interacciones entre el ligando 1 y la DHODHLM son representativas de las presentes entre los 8 derivados bencimidazólicos de tamaño pequeño estudiados (serie ARM en la Tabla 4),

variando sólo algunos pocos de los residuos involucrados que forman parte de las zonas de interés (S1 y S2). Por ejemplo, Met70 en lugar de Leu72, etc.

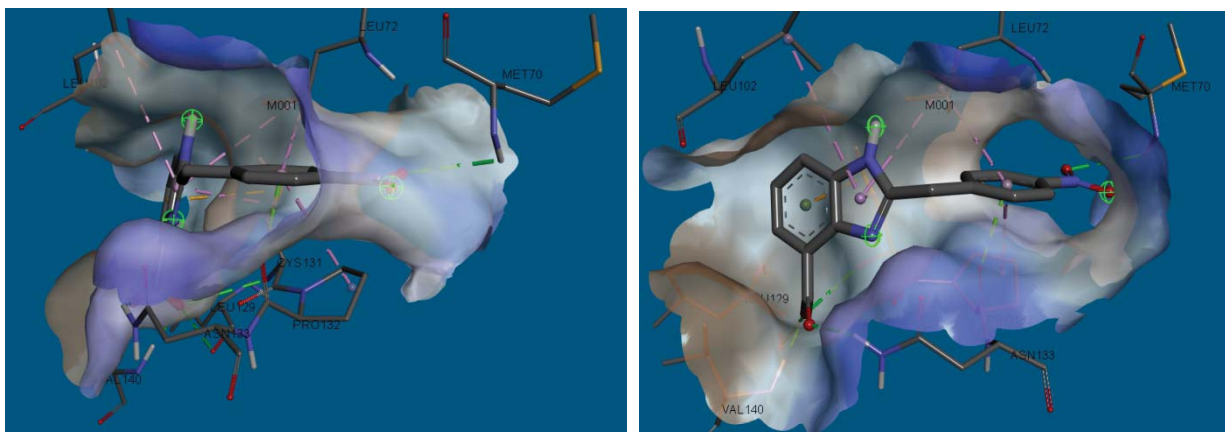


Figura 35. Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 1 en el sitio de unión.

Por otro lado, la Figura 36 muestra las interacciones presentes entre el ligando 16 y la DHODHLM, en donde el ligando es capaz de interactuar con diferentes residuos que forman parte de la región S1 y S2, incluyendo Lys44, Leu72 y Met70. De igual forma, se observa que el ligando se posiciona cerca de otros ligandos importantes, tales como Asn68, Gly71, Asn128 y Pro132, que confirma su posicionamiento adecuado dentro de los sitios de interés.

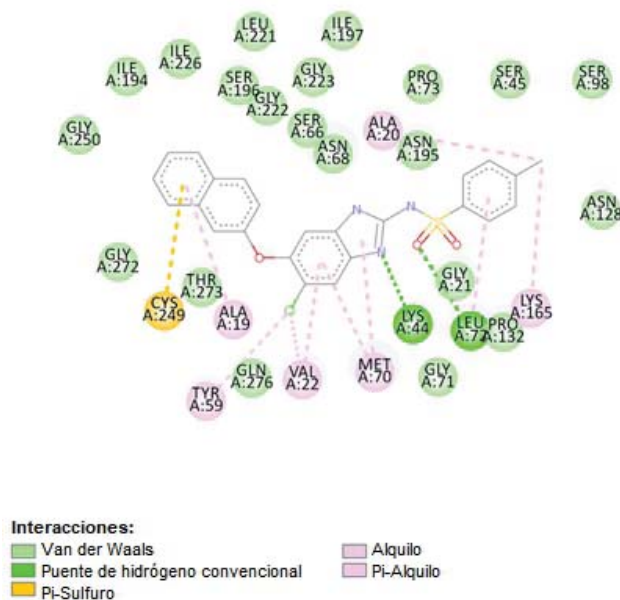


Figura 36. Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLM y el ligando 16.

De manera general, esta tendencia se presenta con todos los compuestos de mayor tamaño (series MolA, MolB y MolC en la Tabla 4).

Las representaciones 3D obtenidas para el complejo ligando16-DHODHLm, a partir de MOE y ATD4 (Figuras 37 y 38 respectivamente), posicionan al ligando unido en la zona de interés (S1 y S2). Sin embargo, en el caso de ATD4 (Figura 38), la porción del bencensulfonilo del ligando se coloca por arriba de la cavidad catalítica, mientras que, en el caso de MOE (Figura 37), el ligando se encuentra totalmente dentro de la cavidad. Estas diferencias se pueden deber a los diferentes métodos seguidos por cada programa (ver Sección 6.4.4), y se observan con algunos de los compuestos de mayor tamaño incluyendo el ligando 16. Por lo tanto, la dinámica molecular nos permitirá tener una mejor idea del comportamiento de este tipo de derivados en el sitio de unión de interés en la DHODHLm.

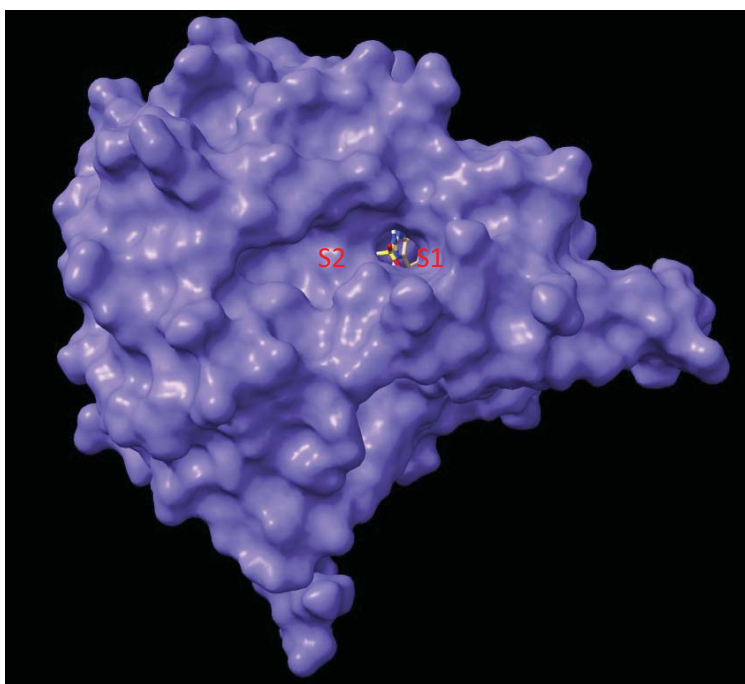


Figura 37. Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 16 obtenido en MOE.

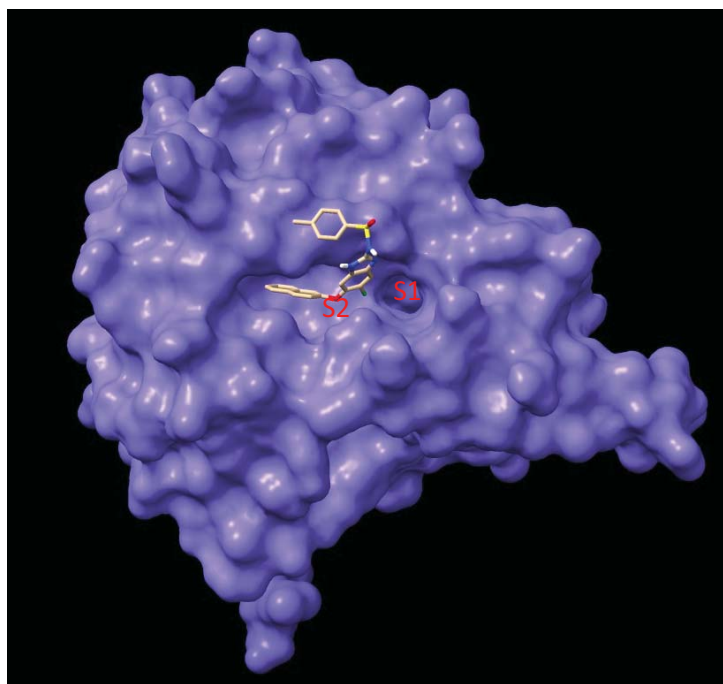


Figura 38. Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 16 obtenido en ATD4.

Con la finalidad de entender con mayor detalle la alta selectividad en energía de unión presentada por los derivados bencimidazólicos sobre la DHODHLm, se comparan las interacciones entre uno de los ligandos con el coeficiente de selectividad más alto en ambos programas (ligando 10, ver Tabla 17) y la DHODHLm y DHODHHs (Figuras 39 y 40, respectivamente).

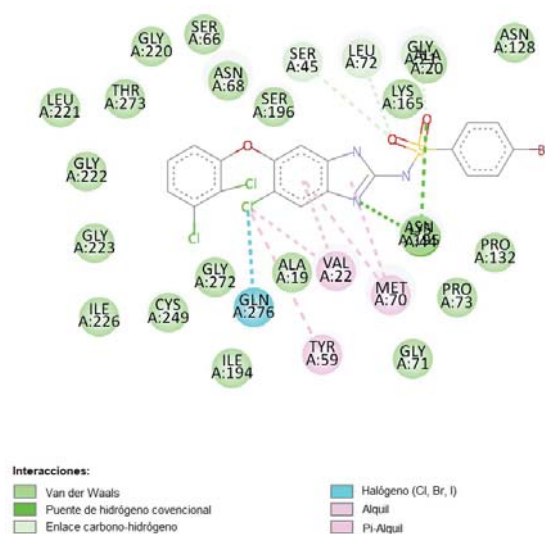


Figura 39. Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLm y el ligando 10.

La Figura 39 demuestra nuevamente que los derivados bencimidazólicos son capaces de interactuar con diferentes residuos que forman parte del sitio de unión de interés en DHODHLm (S1 y S2) y que participan en la estabilización del sustrato endógeno y en la actividad catalítica (Leu72, Met70, etc.). Mientras que la Figura 40 pone en evidencia que, por un lado, los derivados bencimidazólicos sólo interactúan con algunos pocos residuos dentro del sitio de unión en la DHODHs, y por el otro que estos residuos con los que interactúan no son los reportados clave para la estabilización del sustrato y actividad catalítica en la DHODHs.⁹⁷ De especial interés es el núcleo de bencimidazol presente en los compuestos estudiados, el cual forma interacciones con un número considerable de residuos dentro del sitio de interés en la DHODHLm, incluyendo aquellos clave para la estabilización del sustrato endógeno y actividad catalítica (Met70, Asn68, Cys131, etc.), fenómeno que no sucede con la DHODHs.

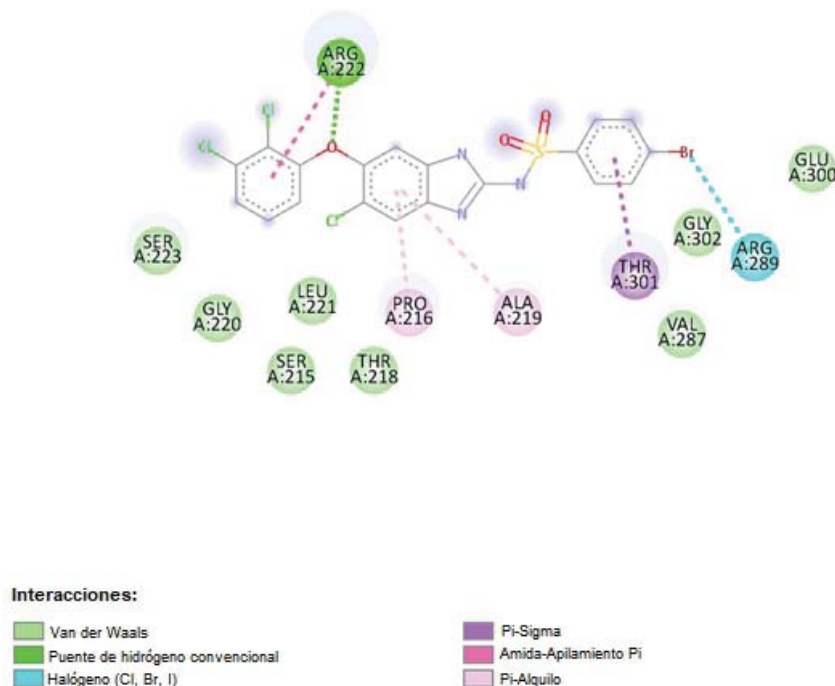


Figura 40. Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHs y el ligando 10.

De manera complementaria, las Figuras 41 y 42 reflejan la gran diferencia en el sitio de unión entre ambos blancos, lo que permite explicar mejor la selectividad en energía de unión mostrada por los derivados bencimidazólicos sobre la DHODHLm. Para empezar, la Figura 41 presenta al ligando 10 dentro de la

cavidad catalítica en DHODHLm, por lo que podría inferirse que su posición aquí impida la entrada del sustrato endógeno, al igual que cualquier coactivador de la enzima, como el FMN.

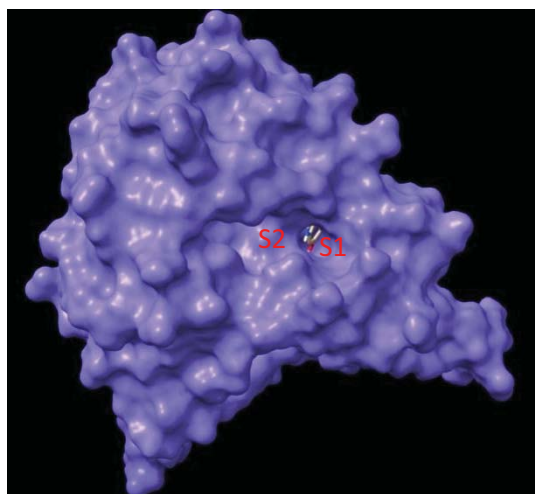


Figura 41. Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 10.

Por otro lado, la Figura 42 muestra que sólo la parte del diclorofenilo del ligando 10 se posiciona cerca del sitio de interés en DHODHs.

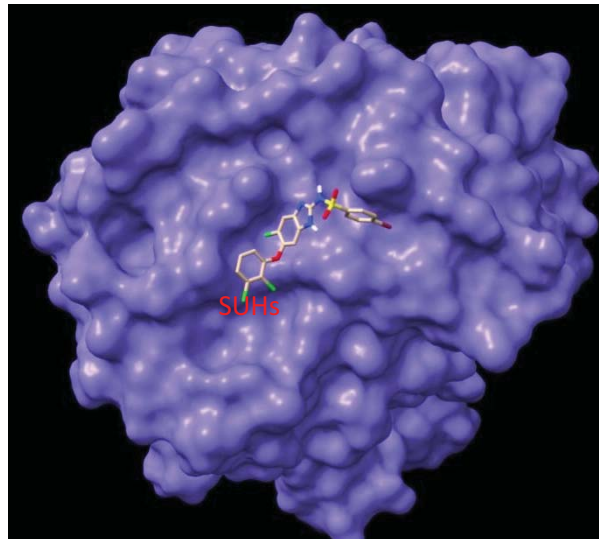


Figura 42. Representación 3D del complejo DHODHs-ligando 10.

La Figura 43 muestra de manera más detallada cómo el ligando 10 se encuentra en el sitio catalítico de la DHODHLm, y cómo éste se encuentra interaccionando con residuos que permiten la estabilización del sustrato endógeno (Met70, etc.).

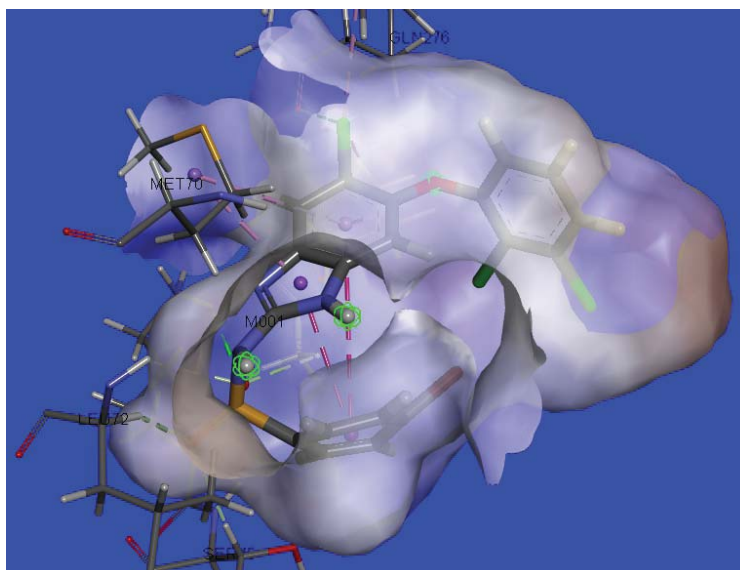


Figura 43. Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando 10 en el sitio de unión. Finalmente, las Figura 43 y 44 muestran la gran diferencia entre la DHODHs y la DHODHLm en el sitio de unión, así como en la localización del ligando 10. Lo que permite ver a más detalle el porqué de la selectividad en energía de unión presentada por los derivados bencimidazólicos sobre la DHODHLm.

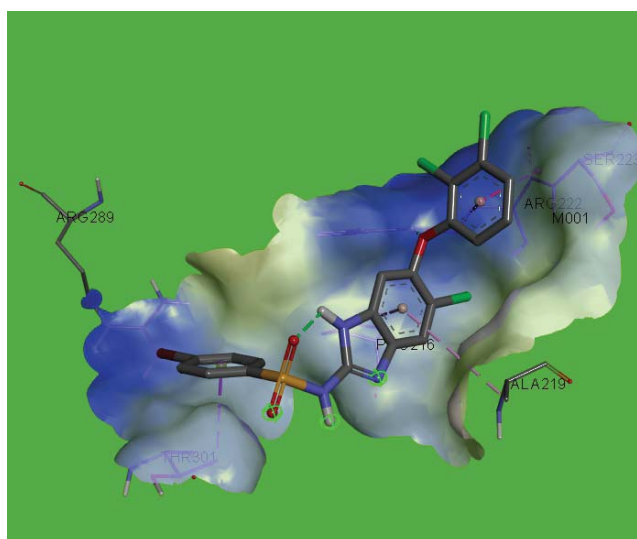


Figura 44. Representación 3D del complejo DHODHs-ligando 10 en el sitio de unión.

7.4 Dinámica molecular

La dinámica se realizó con dos derivados bencimidazólicos distintos, uno de tamaño pequeño (ligando 3, representando la serie ARM) y uno de mayor tamaño (ligando 19, representando las series MoIA, MoIb y MoIC), con la finalidad de

observar el compartimiento de ambos subgrupos de compuestos de la serie de bencimidazoles en el sitio de unión de interés en la DHODHLm. (Ver Sección 6.5)

7.4.1 Resultados del ligando 3

El estudio de dinámica molecular se corrió durante 25 ns. El movimiento del ligando 3 a lo largo de la dinámica se encuentra representado en la Figura 45 en términos de RMSD (nm).

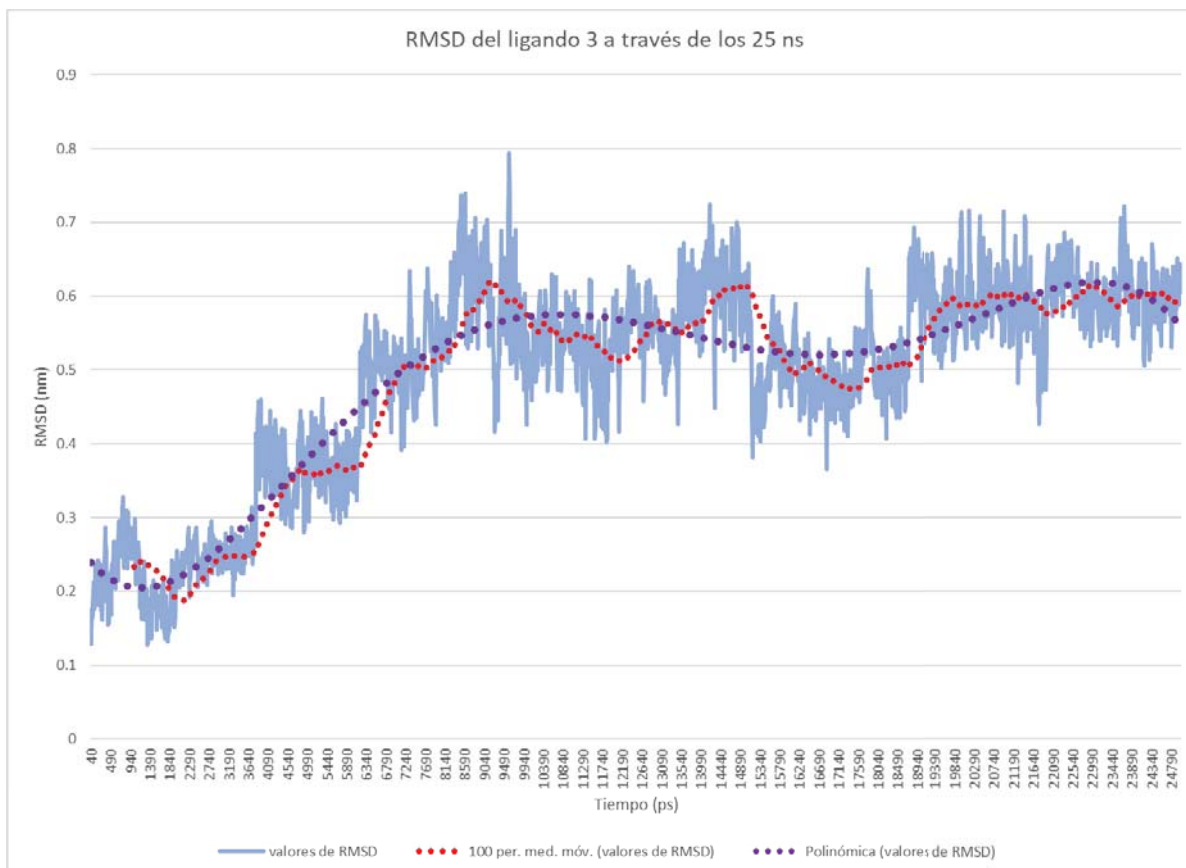


Figura 45. Valores de RMSD del ligando 3 en el lapso de la MD (25 ns).

El RMSD del ligando 3 en el tiempo cero se refiere al valor que presenta la mejor conformación obtenida en ATD4 para este ligando (ver sección 6.5), y cuyo valor aumenta conforme transcurre la dinámica hasta alcanzar un máximo alrededor de los 8100 ps, a partir del cual se mantiene constante, observándose una ligera disminución en el valor de RMSD en el rango de tiempo 15340-18940 ps. Después de este lapso, el valor de RMSD sube y vuelve a la tendencia previa, manteniéndose relativamente constante (fluctuando en un máximo de 0.2 nm) por

el resto de la dinámica, indicando que, probablemente, en este lapso el ligando posee la conformación correspondiente al modo de unión a DHODHLM más estable. Este valor constante de RMSD relativo entre 8100 a 25000, concuerda con la alta similitud entre los distintos complejos ligando 3-DHODHLM que corresponden a este lapso de la dinámica. (Figuras 48 y 49)

En ningún momento de la dinámica (Figura 45) ocurre un cambio considerable en el valor de RMSD que demuestre que el ligando se separa del sitio de unión de interés o bien que deje de formar el complejo ligando-receptor. Esta observación junto con el valor relativamente constante de RMSD demuestran que la unión del ligando a la DHODHLM es estable y favorable durante todo el tiempo de la dinámica. Tiempo en el cual de manera hipotética el ligando podría inhibir el blanco.

Las Figuras 46-49 representan al complejo ligando 3-receptor en diferentes puntos a lo largo de la dinámica. En la Figura 46, el ligando presenta la conformación obtenida por el acoplamiento molecular y representa al tiempo cero de la dinámica. De manera similar a lo descrito anteriormente en los resultados de acoplamiento molecular (sección 7.3.3), el ligando 3 se encuentra interactuando con residuos en la zona de interés, S1 y S2. Con la parte del bencimidazol interactuando con ambas partes, y la parte del bencilo posicionada en la cavidad catalítica dónde se une el sustrato endógeno, lo que podría implicar el bloqueo de la entrada del sustrato y, por lo tanto, la inhibición de la enzima.

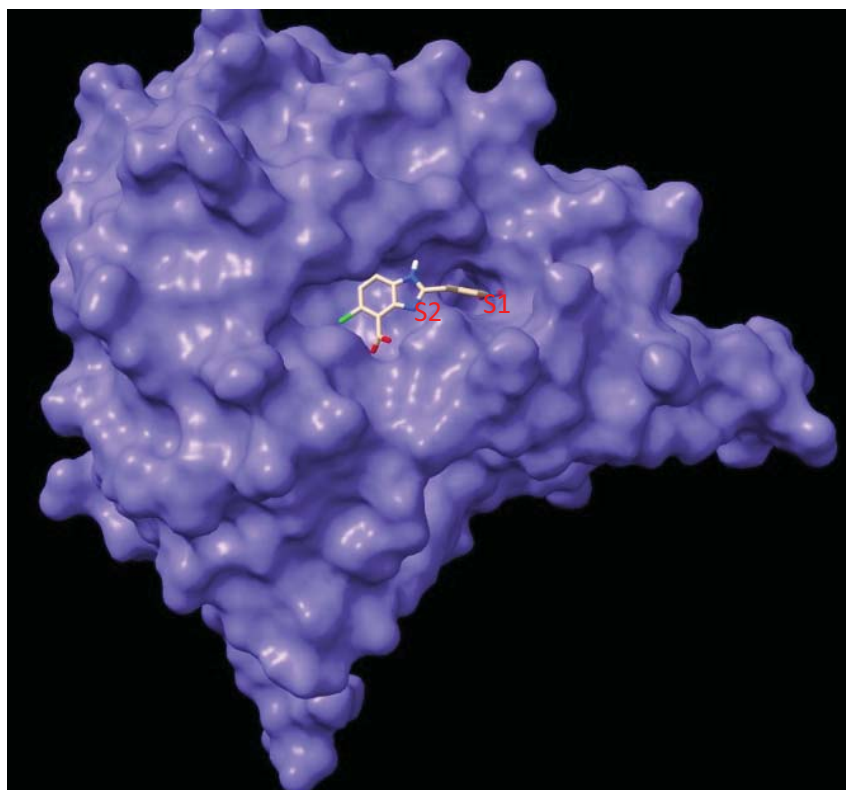


Figura 46. Representación del complejo DHODHm-ligando 3 inicial de la MD.

Conforme la dinámica transcurre, el ligando comienza a moverse dentro del sitio de unión buscando un nuevo mínimo local de energía sin despegarse bruscamente del mismo, reflejando su gran afinidad sobre éste. Mientras que los sitios sufren cambios conformacionales en donde comienzan a envolver cierta porción del ligando y permiten su entrada a la zona hidrofóbica de la misma proteína. (Figura 47).

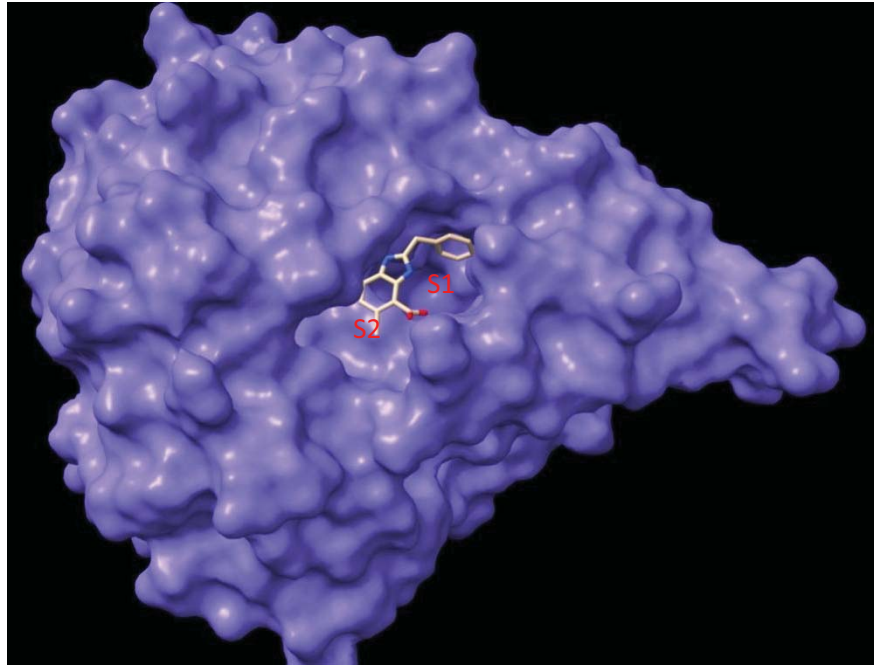


Figura 47. Representación del complejo DHODHm-ligando 3 a los 5000 ps de la MD.

En el tiempo de 8500 ps, en donde se observa que se alcanza un máximo de RMSD que se mantiene relativamente constante hasta el final de la dinámica (Figura 45), el ligando se encuentra envuelto por residuos que forman parte del sitio adyacente (S2), mientras que ambos sitios (S1 y S2) han sufrido cambios notables en su conformación que podría afectar la unión y estabilización del sustrato endógeno para que la enzima lleve a cabo su actividad catalítica (Figura 48).

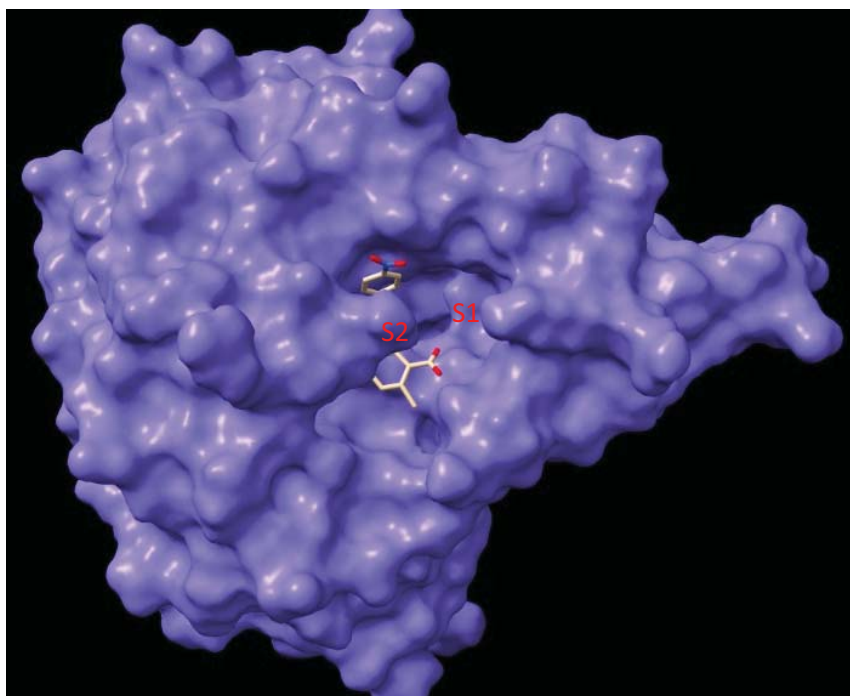


Figura 48. Complejo 3D Ligando 3-DHODHLM a los 8500 ps de la MD.

La Figura 49 (complejo ligando-receptor al final de la MD) muestra que el ligando no ha cambiado mucho en su posición con respecto a la Figura 48, demostrando que el ligando alcanzó una conformación estable indicado por la constante en los valores de RMSD mostrados en la Figura 45. De igual forma, el ligando se encuentra posicionado en el sitio S2 y el sitio de catalítico (S1), los cuales han sufrido cambios conformacionales espacialmente importantes. Estos dos fenómenos podrían prevenir la unión del sustrato endógeno, tanto por la alta energía de unión del derivado bencimidazólico hacia el sitio de unión y bloqueo estérico, como por los cambios conformacionales del sitio de unión que podrían no favorecer la interacción con el sustrato endógeno.

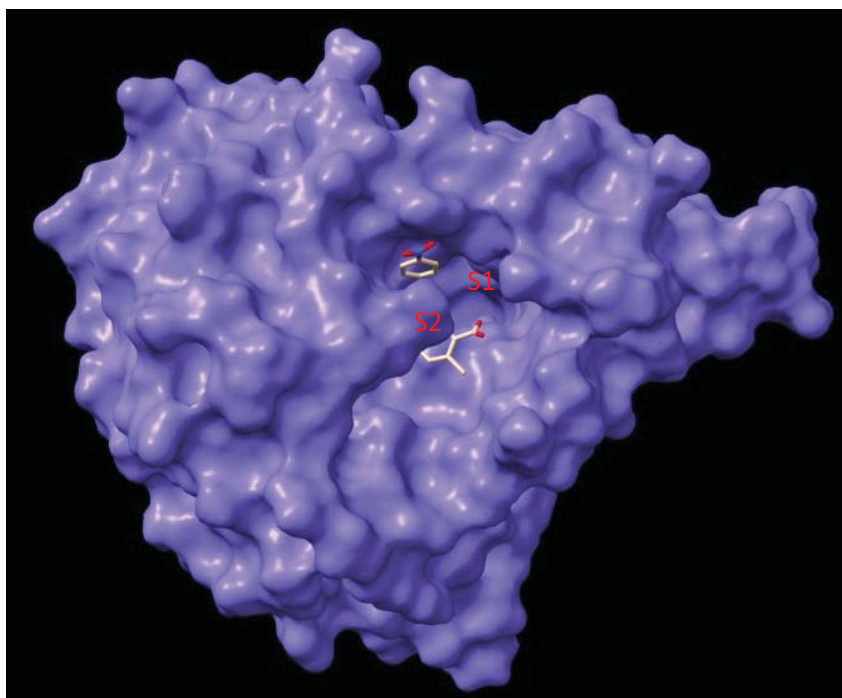


Figura 49. Representación del complejo DHODHLM-ligando 3 al final de la dinámica.

En este sentido, el ligando 3 interacciona con residuos que son clave para la unión y estabilización del sustrato durante toda la dinámica (Tabla 18). De principal interés es su interacción con la Cys131 y los diferentes tiempos discutidos aquí (Tabla 18). Esta observación, junto con la mejor energía de unión del ligando 3 con respecto al sustrato endógeno, podrían sugerir un impedimento en la interacción entre la Cys131 (residuo catalítico) y el sustrato endógeno por parte del ligando 3.

Tabla 18. Residuos de la proteína DHODHLM con los que interactúa el ligando 3 durante la MD

Figura (tiempo)	Residuos que estabilizan el sustrato endógeno o participan en la actividad catalítica	Otros residuos que forman parte de las zonas S1 y S2	Otros Residuos con los que interacciona
46 (inicio de la dinámica)	Met70, Leu72 y Cys131	Pro132, Val134, Val140, Gln139, Leu129, Leu102 y Asn133	Ser69 y Asn54
47 (5000 ps)	Gly71, Leu72 y Cys131	Leu 102 y Asn 133.	Ser69 y Lys215

48 (8500 ps)	Ser100 y Cys131	Leu102	Arg51, Lys215
49 (final de la dinámica)	Cys131, Ser100 y Leu72	Leu102, Asn133, Gly101	Arg51

En la Figura 50, se grafican los valores de RMSF para la cadena principal y la cadena lateral de la DHODHLm. El valor de RMSF, en la Figura 50, representa el promedio de la desviación en el espacio (RMSD) para los residuos de la DHODHLm durante la dinámica. El gráfico ilustra que los residuos importantes y principales para la estabilización del sustrato endógeno y actividad de la enzima (Lys44, Asn68, Met70, Gly71, Leu72, Ser100, Asn128, Asn195 y Se196) no muestran una gran variación en el valor de RMSF, tanto en la cadena lateral como en la principal, lo cual indica que, efectivamente, están interaccionando fuertemente con el ligando 3 y siendo estabilizados por el mismo, previniendo su libre movimiento. Cabe notar que, el RMSF de la cadena lateral alcanza valores más altos con respecto al RMSF de la cadena principal. Esto se puede deber al mayor número de grados de libertad asociados con las cadenas laterales de los residuos (sustituyentes) en comparación con la cadena principal, constituida principalmente por los fragmentos de la proteína que participan en enlaces peptídicos y que además forman la estructura secundaria.

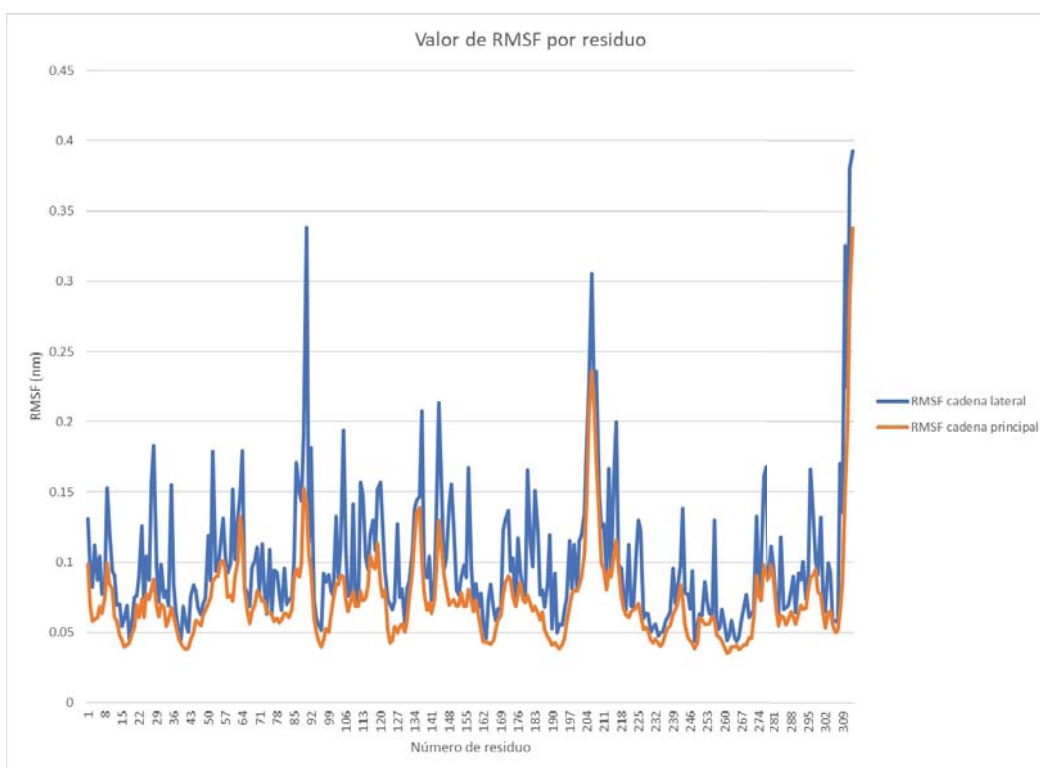


Figura 50. RMSF de la cadena principal y lateral de los residuos de la DHODHLM en presencia del ligando 3.

Por otro lado, los puentes de hidrógeno formados a lo largo de la dinámica entre el ligando y el receptor (DHODHLM) se encuentran graficados en la Figura 51. En la misma, se observa que se comienza con un número de cuatro puentes de hidrógeno, los cuales están asociados con la mejor conformación generada por el estudio de acoplamiento. Conforme el tiempo de la dinámica transcurre, el número de puentes de H comienza a fluctuar considerablemente, alcanzando un valor máximo de 6. Este tiempo coincide con el cambio acelerado del RMSD en el tiempo de 40-8100 ps. Después de este tiempo, el número de puentes de hidrógeno se mantiene relativamente constante, fluctuando entre 0/1 a 4. Este comportamiento puede ser explicado a que se parte de la conformación generada por el acoplamiento molecular con un número de puentes de hidrógeno asociados, los cuales comienzan a fluctuar conforme el ligando busca nuevos mínimos locales energéticos de su interacción con la DHODHLM, hasta que encuentra una conformación estable (energéticamente favorecida) en donde el número de puentes de hidrógeno se mantiene relativamente constante al igual que los valores de RMSD (Figura 45).

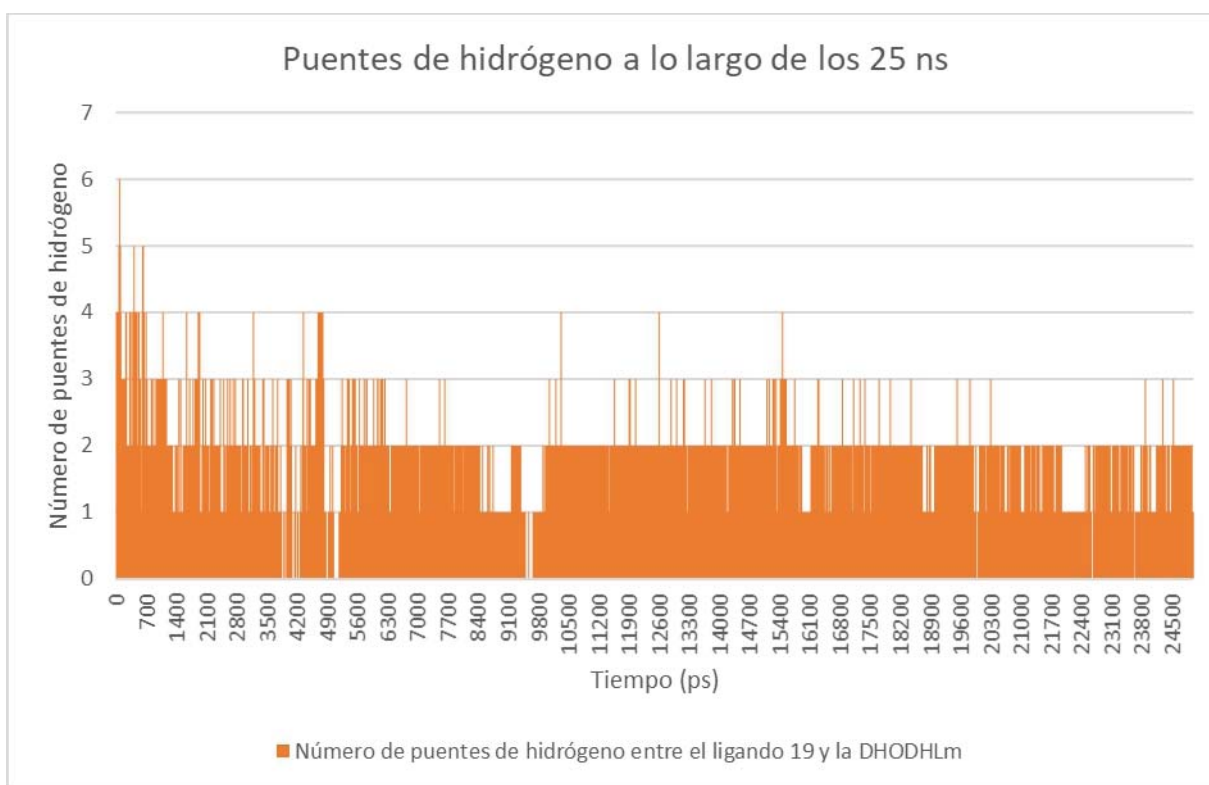


Figura 51. Puentes de hidrógeno presentes entre la DHODHLm y el ligando 3 durante la MD.

Finalmente, la Figura 52 complementa los resultados antes discutidos con respecto a los valores de RMSD y número de puentes de hidrógenos presentes. En esta figura, se representa al número de pares de átomos entre la proteína y ligando que se encuentran con una aproximación de 0.35 nm. De manera simple, esto se asocia con una mayor probabilidad de formación de interacciones ligando-proteína. Aunque es importante aclarar que no forzosamente todas las aproximaciones son favorables.

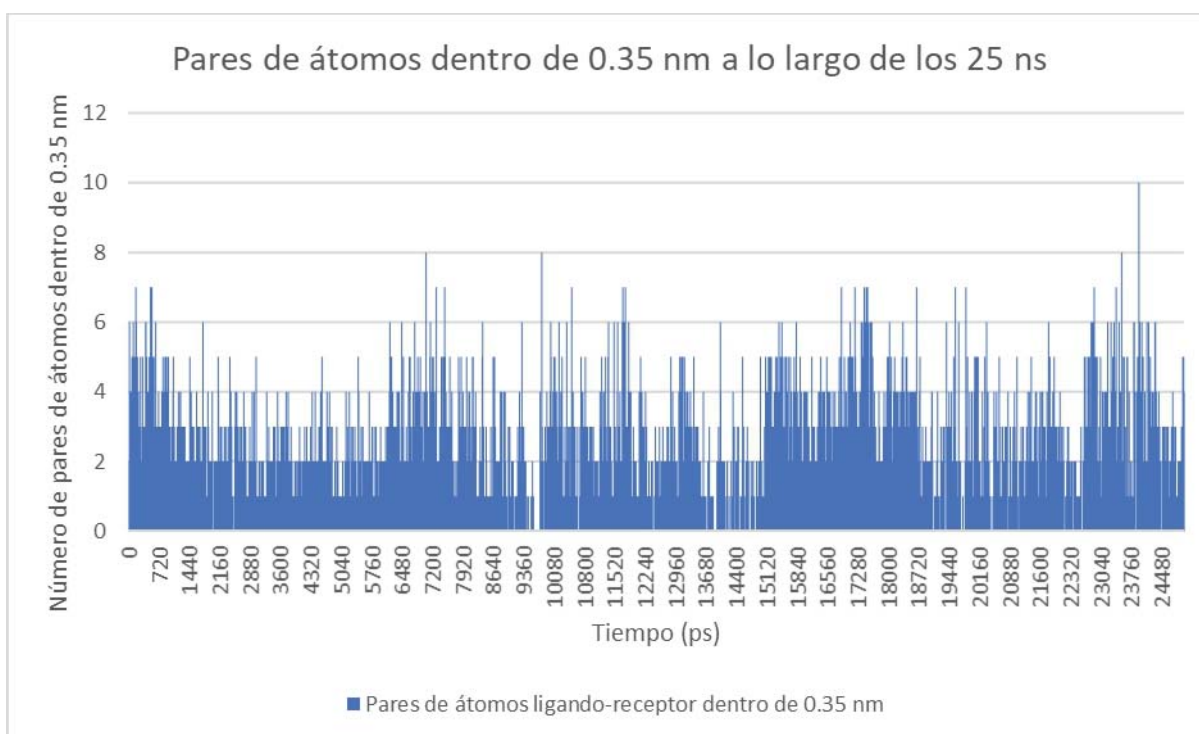


Figura 52. Pares de átomos ligando 3-receptor dentro de 0.35 nm durante la MD.

En este sentido, al principio el número de pares de átomos ligando-receptor dentro de 0.35 nm tiene un buen valor ya que se trata de la mejor conformación generada para el ligando, después este número comienza a fluctuar debido a que el ligando busca otro mínimo local y al encontrar el modo de unión más estable en el tiempo de la dinámica, éste se mantiene constante, de manera general, durante el resto de la dinámica. (Ver Figura 52)

7.4.2 Resultados del ligando 19

De manera análoga al ligando 3, la Figura 53 presenta los valores de RMSD del ligando a lo largo de los 25 ns de la dinámica. Para este caso, el valor de RMSD es relativamente constante desde un principio de la MD, fluctuando dentro de un rango de 0.2 unidades de manera cíclica. Esto es indicativo de que la conformación del ligando inicial, la cual fue generada por el programa de acoplamiento, refleja muy probablemente el modo de unión más estable y cercano al nativo del ligando hacia la DHODHLM, contribuyendo a la validación de los modos generados en el acoplamiento.

Los valores de RMSF para la cadena lateral y cadena principal de la DHODHLM en presencia del ligando 19 (Figura 54) siguen la misma tendencia observada con el ligando 3; es decir, que los residuos que participan de manera directa en la estabilización del sustrato endógeno presentan un bajo valor de RMSF, indicando un menor movimiento en el lapso de la dinámica resultado de su fuerte interacción y estabilización con el ligando 19.

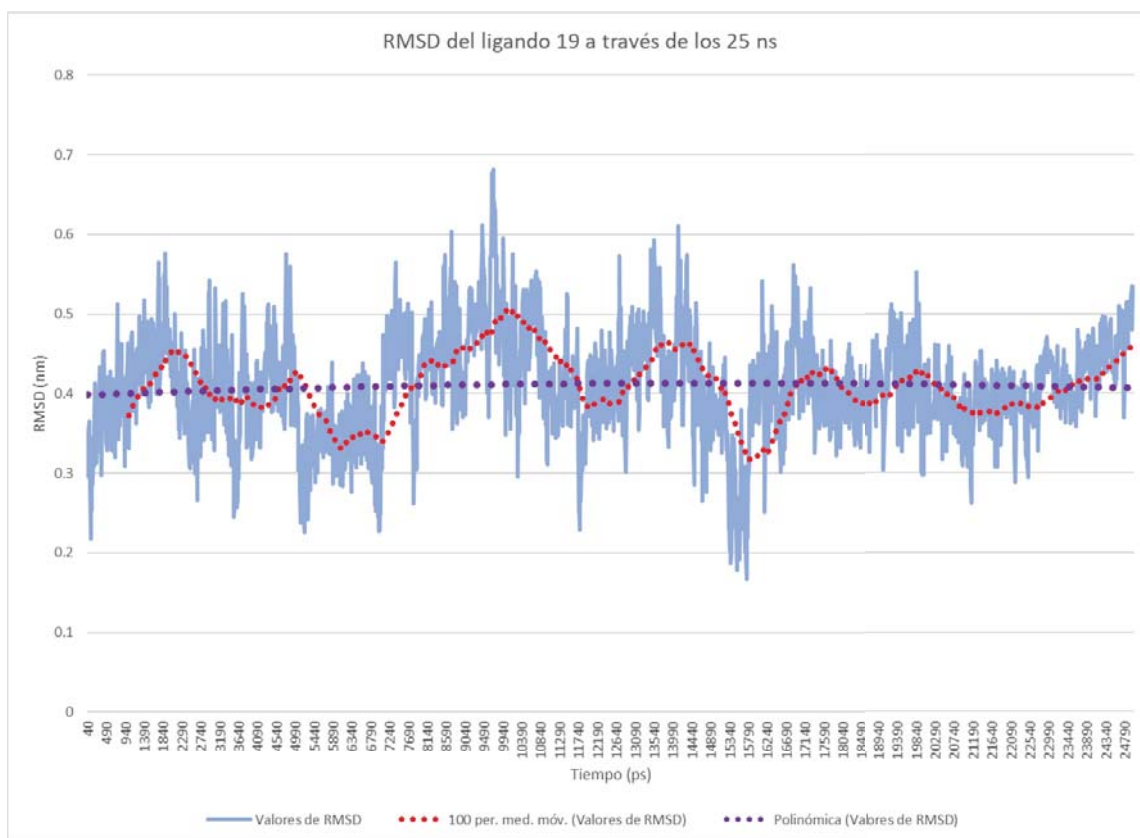


Figura 53. Valores de RMSD del ligando 19 en el lapso de la MD (25 ns).

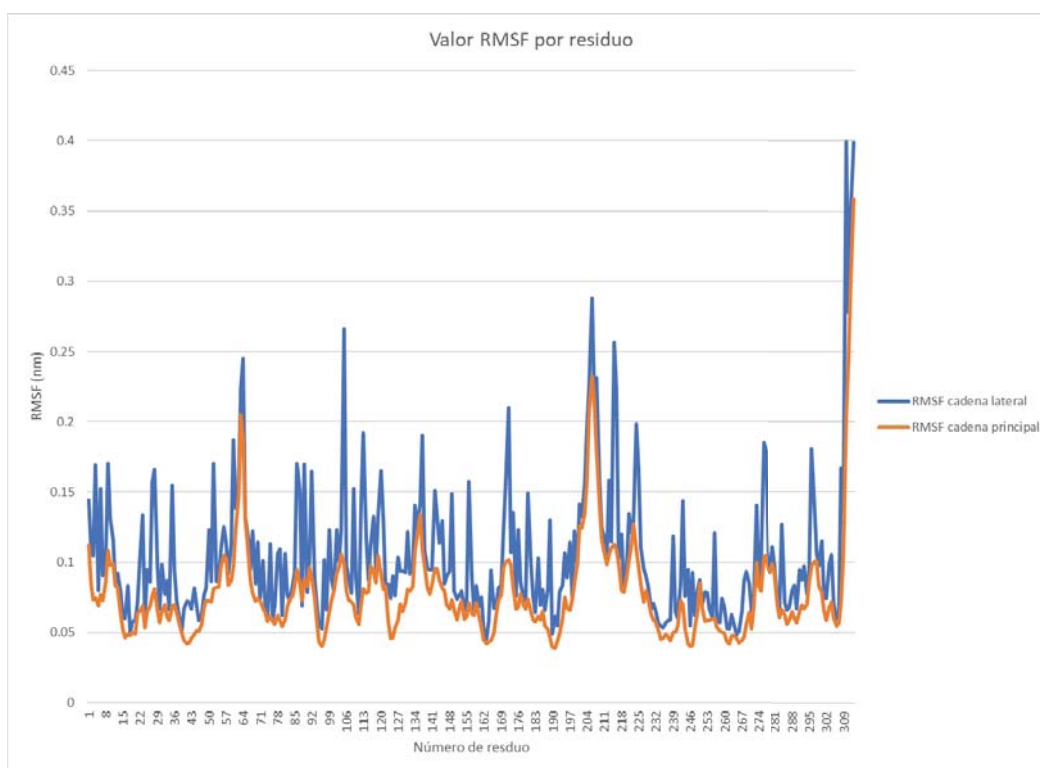


Figura 54. RMSF de la cadena lateral y principal de los residuos de la DHODHLm en presencia del ligando 19.

El número de puentes de hidrógenos a lo largo de los 25 ns de la MD, graficados en la Figura 55, converge con los resultados de RMSD mostrados en la Figura 52, ya que, prácticamente, el número de puentes de hidrógeno no cambia a lo largo del tiempo. Esto muestra una constante en el número de puentes de hidrógeno presentes entre el ligando y el receptor (DHODHLm), lo cual prueba, nuevamente, la estabilidad asociada al modo de unión generado y presentado por el acoplamiento molecular en un inicio.

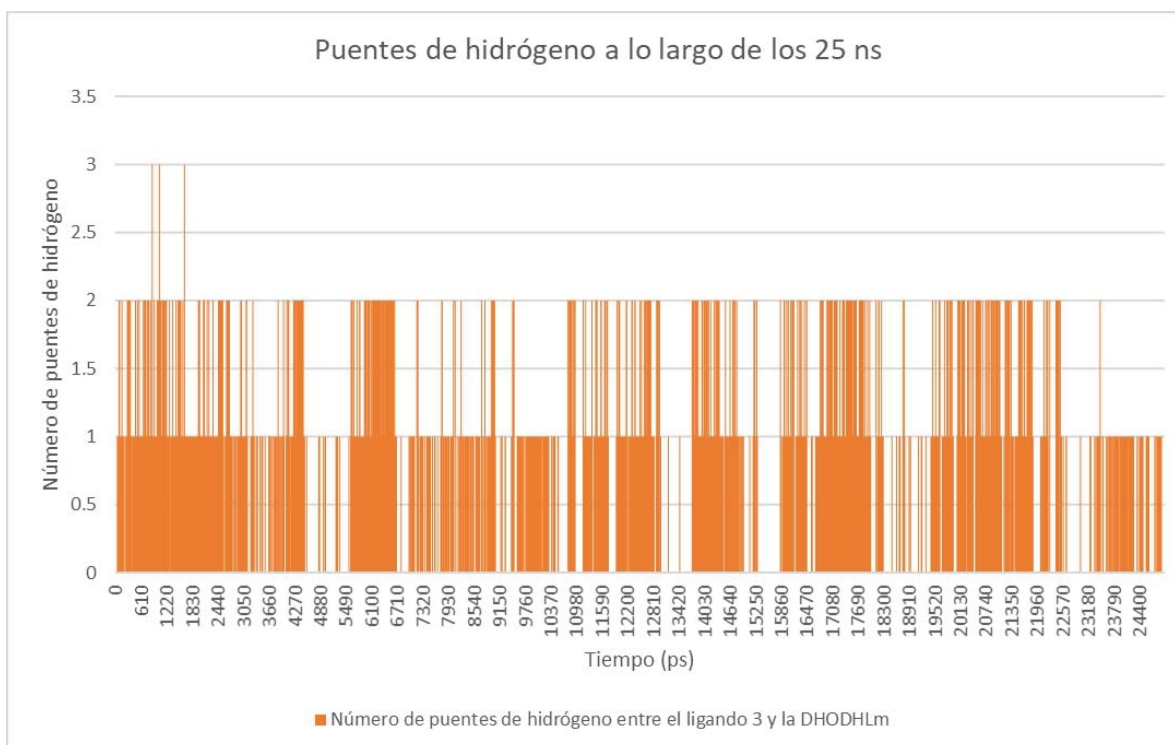


Figura 55. Puentes de hidrógeno presentes entre la DHODHLm y el ligando 19 durante la MD.

Para el caso de los pares de átomos ligando-receptor dentro de 0.35 nm (Figura 56), estos tienen una tendencia similar a la observada para los parámetros anteriores. En general, se trata de una variación cíclica asociada a los valores de RMSD constantes que oscilan dentro de un mismo rango a lo largo de la dinámica (Figura 53) y se ve reflejado en el número, relativamente constante, de puentes de hidrógeno presentes entre el ligando y el receptor en el lapso de la dinámica (Figura 55). Esto se debe a que el número de aproximaciones entre estos pares de átomos, de manera simple, se asocia con una mayor probabilidad en la formación de interacciones intermoleculares, incluyendo puentes de hidrógeno. Las diferencias entre estos dos parámetros (Figuras 54 y 55) se deben a que no todas las aproximaciones son favorables o involucran puentes de hidrógeno, si no otro tipo de interacciones, lo cual refleja la importancia de otras interacciones (hidrofóbicas, etc.) para la estabilización del complejo ligando-receptor.¹⁰⁶

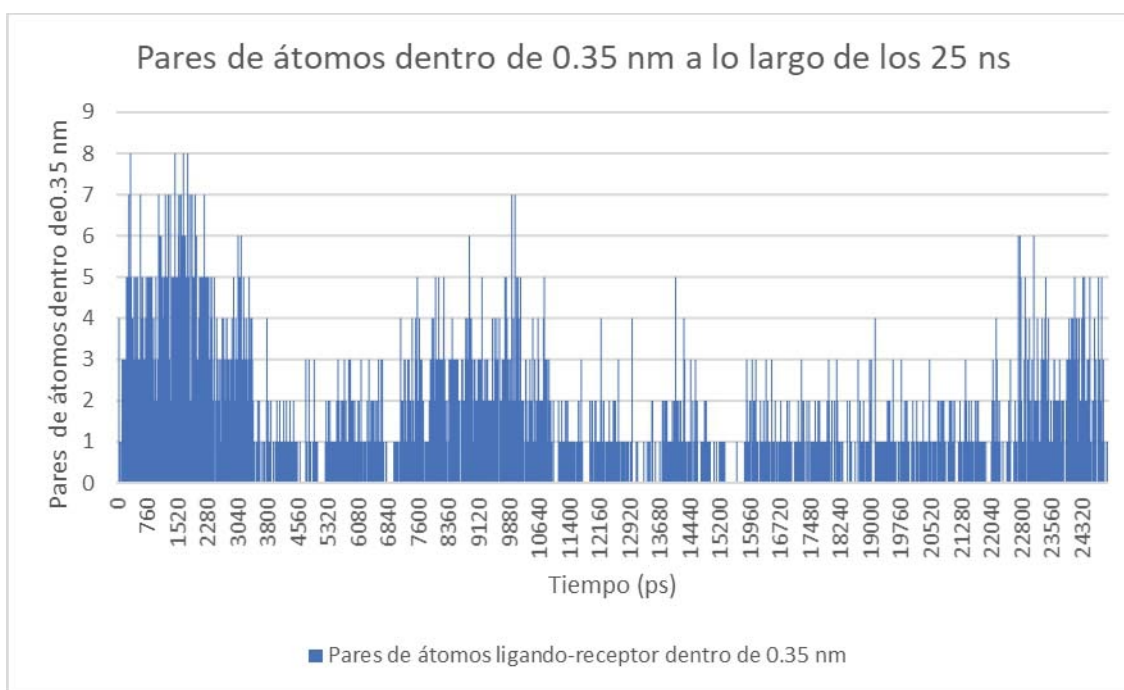


Figura 56. Pares de átomos ligando 19-receptor dentro de 0.35 nm durante la MD.

Las Figuras 57-60 representan al complejo ligando 19-receptor en distintos tiempos a lo largo de los 25 ns de simulación. El complejo en la Figura 57 muestra el primer punto en la dinámica y corresponde al modo de unión del ligando generado por acoplamiento. La posición del ligando en el sitio de unión en las diferentes figuras coincide con el comportamiento descrito para el RMSD en la Figura 53, en donde los valores de RMSD mantienen una fluctuación constante dentro de un rango. En este sentido, el ligando en las Figuras 57 y 59, correspondientes a los tiempos inicial y 20,000 ps, respectivamente, se encuentra por encima o a lado del sitio de unión.

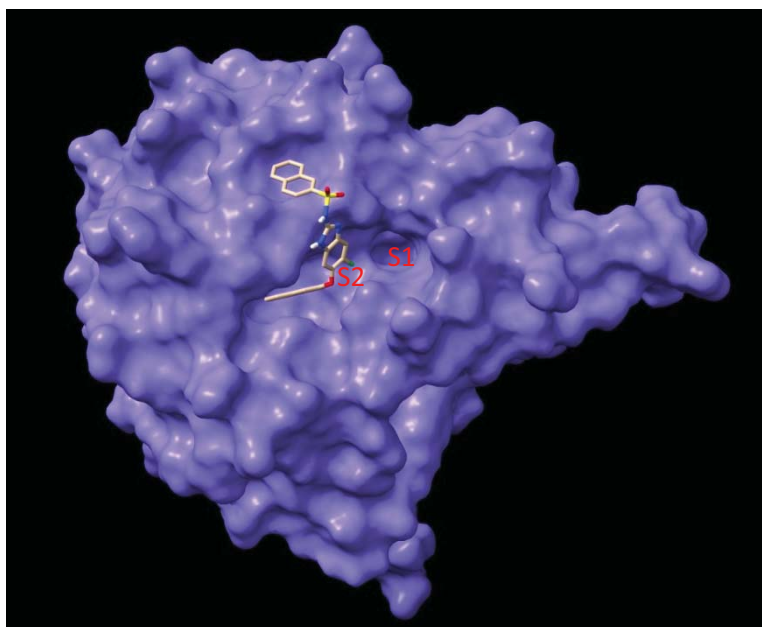


Figura 57. Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 19 en el punto inicial de la MD.

Mientras que en las Figuras 58 y 60, que corresponden a los tiempos 10000 y 25000 ps, respectivamente, el ligando se encuentra justo por delante del sitio de unión, bloqueando su acceso lo que, hipotéticamente, impediría la unión del sustrato endógeno.

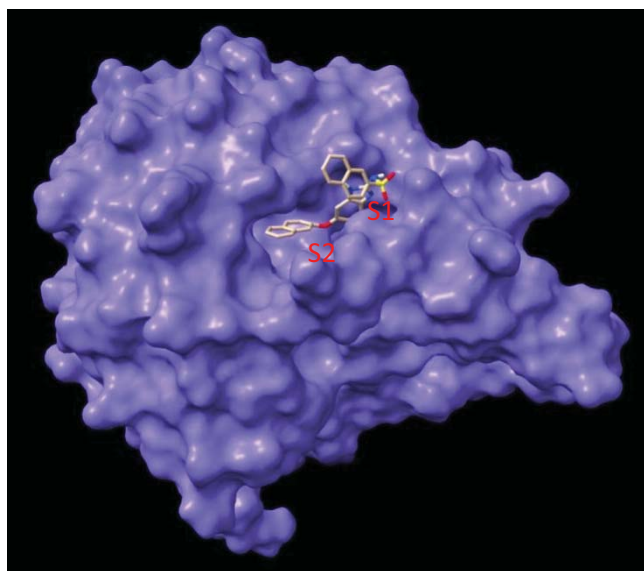


Figura 58. Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 19 a los 10000 ps de la MD.

El comportamiento descrito en las Figuras 56-59, demuestra la gran afinidad del ligando 19 por el sitio de interés a lo largo del estudio de MD.

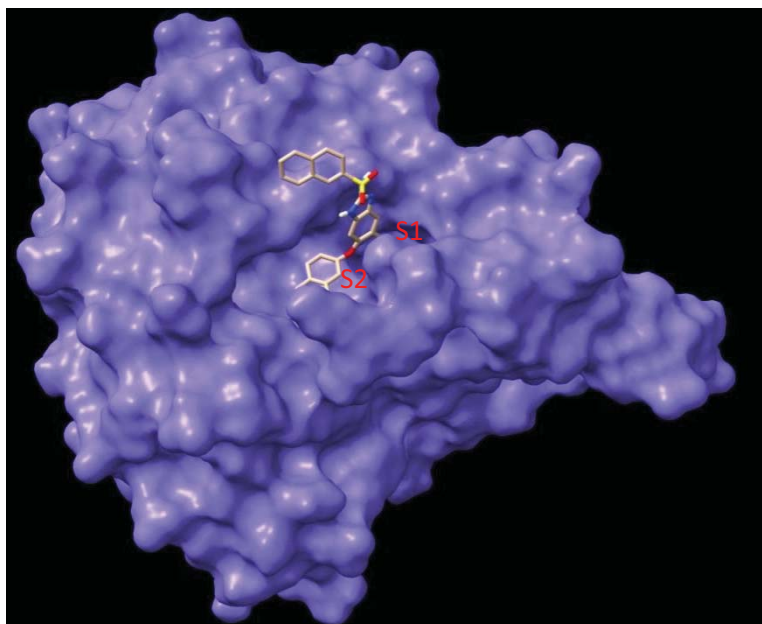


Figura 59. Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 19 a los 20000 ps de la MD.

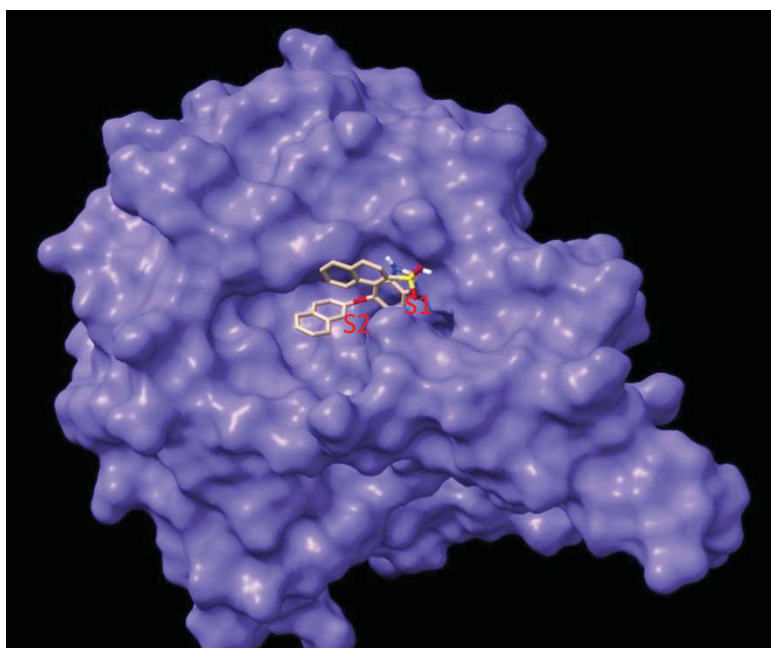


Figura 60. Representación 3D del complejo DHODHLM-ligando 19 a los 25000 ps de la MD.

Durante los diferentes tiempos de la dinámica, representados en las Figuras 57-60, el ligando es capaz de interactuar con diferentes residuos que forman parte de las zonas de interés (Tabla 19), incluyendo aquellos que estabilizan el sustrato endógeno (Leu72, etc.) y que participan en la actividad catalítica de la enzima (Cys131). Lo que al igual que el ligando 3, podría impedir la actividad de la enzima sobre el sustrato endógeno, ya sea por bloqueo directo/estérico de su paso al sitio catalítico o su alta interacción con los residuos necesarios para la estabilización y unión con el sustrato endógeno.

Tabla 19. Residuos de DHODHLM que interactúan con el ligando 19 durante la MD

Figura (tiempo)	Residuos que estabilizan el sustrato endógeno o participan en la actividad catalítica	Otros residuos que forman parte de las zonas S1 y S2	Otros residuos con los que interacciona
57 (inicial)	Cys131	Leu102, Gly101, Val140	Ala49, Pro48, Arg51, Cys150
58 (10000)	Cys131, Leu72	Asn133	Ly215
59 (20000 ps)	Leu72, Cys131	Leu102, Val140	Arg51
60 (25000 ps)	Cys131, Leu72	Leu102, Asn133	Arg51

Los valores de energía de unión entre la DHODHLM y los ligandos 3 y 19 (Tabla 20), determinados en la MD, demuestran que ambos ligandos tienen una afinidad similar hacia la DHODHLM a pesar de las ligeras diferencias existentes entre los modos de unión de ambos ligandos, con una T-student en donde no se encontró diferencia significativa. Además, ambos interactúan con los residuos clave para la unión y estabilización del sustrato endógeno, así como para la actividad de la enzima (Lys44, Asn68, Met70, Gly71, Leu72, Ser100, Asn128, Asn195 y Ser196). Con base en estos resultados y a la tendencia mostrada en el acoplamiento, en general, se espera que los 25 derivados bencimidazólicos tengan un comportamiento similar.

Tabla 20. Energía de unión de los ligandos 3 y 19 obtenida en MD durante los últimos 5 ns

Ligando	Energía de unión promedio más la desviación estándar
Ligando 3	-115.876 ± 21.057 kJ/mol
Ligando 19	-84.766 ± 19.474 kJ/mol

7.5 Construcción del farmacóforo

Esta sección del trabajo tiene como finalidad identificar las características electrónicas, estéricas y estructurales requeridas en los bencimidazoles estudiados para su adecuada interacción con la DHODHLm. Para la construcción del farmacóforo se siguió la metodología descrita en la Sección 6.6. En primera instancia, se eligieron los compuestos más prometedores para la DHODHLm y de los cuales se obtendrán las características farmacofóricas. Para ello, se utilizaron los valores de energía de unión y coeficiente de selectividad asociado de los 25 derivados bencimidazólicos y ligandos de referencia con respecto a la DHODHLm (Tabla 17). Para elegir dichos compuestos, se realizaron dos acciones distintas: un tratamiento de datos por ranqueo y una estrategia de evaluación consenso de ranqueo por voto, respectivamente. La Tabla 21 presenta los resultados del tratamiento por ranqueo de las energías de unión entre los derivados bencimidazólicos y la DHODHLm. Mientras que en la Tabla 22, se encuentran los resultados del tratamiento por ranqueo de los coeficientes de selectividad sobre la DHODHLm, en términos de energía de unión, de los 25 derivados bencimidazólicos.

Tabla 21. Tratamiento de los valores de energía entre los derivados benicimidazólicos, ligandos de referencia y la DHODHLm

Ligando	ATD4		MOE	
	Energía de unión (kJ/mol)	Ranking	Energía de unión (kJ/mol)	Ranking
1	-8.90	3	-14.27	17
2	-6.72	11	-11.97	25
3	-9.45	1	-14.62	15
4	-7.30	8	-12.48	24
5	-9.13	2	-13.80	19
6	-5.17	27	-13.10	21
7	-8.19	6	-13.31	20
8	-5.86	23	-12.73	23
9	-5.30	26	-14.48	16
10	-6.42	14	-15.28	9
11	-6.18	18	-15.84	4
12	-5.80	25	-15.42	8
13	-6.35	16	-16.24	3
14	-6.01	20	-14.75	13
15	-6.65	12	-15.22	10
16	-6.42	15	-15.05	12
17	-5.84	24	-15.56	7
18	-6.26	17	-16.72	2
19	-7.26	9	-18.34	1
20	-6.79	10	-15.59	6
21	-6.48	13	-15.60	5
22	-6.05	19	-15.07	11
23	-8.21	5	-13.90	18
24	-8.50	4	-14.73	14
25	-7.37	7	-12.90	22
L27	-5.98	21	-10.79	26
27 (Orotato)	-5.87	22	-10.44	27
Dho	-2.77	28	-8.45	28

Tabla 22. Tratamiento de los valores de coeficiente de selectividad sobre la DHODHLm, en términos de energía, de los derivados bencimidazólicos

Ligando	Ranking MOE	Ranking ATD4
1	24	17
2	19	2
3	22	16
4	21	1
5	25	14
6	17	20
7	23	24
8	18	11
9	3	23
10	6	10
11	5	8
12	4	15
13	2	9
14	12	6
15	16	5
16	10	3
17	11	7
18	7	25
19	1	13
20	15	19
21	9	12
22	8	4
23	13	18
24	14	22
25	20	26

La segunda parte de la metodología (Sección 6.6), la estrategia de ranqueo por voto, permite tomar en cuenta un consenso en ambos programas (Tabla 23). Ésta se realizó para la identificación de los compuestos más prometedores para la unión con la DHODHLm. Dicha estrategia se encuentra descrita a detalle en la Sección 6.6. Los criterios para la asignación de votos a los distintos

bencimidazoles estudiados fueron que su energía de unión se encuentre en la mitad superior del ranqueo (S50%), que dicho ranqueo de energía sea mejor con respecto al ligando de referencia (MLR), que el ranqueo del coeficiente de selectividad en energía de unión se encuentre dentro de los 10 mejores (10 MCS), que la energía de unión sea mejor que la del sustrato endógeno (MSE) y que el número de anillos aromáticos (NAR) sea igual o menor a 3.

Tabla 23. Resultados de la estrategia de ranqueo por voto para los derivados bencimidazólicos. Cada voto asignado en cada criterio se hizo por programa (2 máximo, 1 por programa respectivamente)

Ligando	Ranking Energía de unión MOE	Ranking Energía de unión ATD4	S50 %	MLR	10 MCS	MSE	NAR	Conteo de votos
1	17	3	1	2	0	2	0	5
2	25	11	1	2	1	2	0	6
3	15	1	1	2	0	2	0	5
4	24	8	1	2	1	2	0	6
5	19	2	1	2	0	2	0	5
6	21	27	0	1	0	2	0	3
7	20	6	1	2	0	2	0	5
8	23	23	0	1	0	2	0	3
9	16	26	0	1	1	2	-1	3
10	9	14	1	2	2	2	-1	6
11	4	18	1	2	2	2	-1	6
12	8	25	1	1	1	2	-1	4
13	3	16	1	2	2	2	-1	6
14	13	20	0	2	1	2	-1	4
15	10	12	2	2	1	2	-1	6
16	12	15	1	2	2	2	-1	6
17	7	24	1	1	1	2	-1	4
18	2	17	1	2	1	2	-1	5
19	1	9	2	2	1	2	-2	5
20	6	10	2	2	0	2	-1	5
21	5	13	1	2	1	2	-1	5
22	11	19	1	2	2	2	-1	6
23	18	5	1	2	0	2	-2	3
24	14	4	1	2	0	2	-2	3
25	22	7	1	2	0	2	-2	3

Se consideró el número de anillos aromáticos (NAR, en la Tabla 23) presentes en la molécula, ya que esta característica ha demostrado estar asociada con propiedades fisicoquímicas (LogP, solubilidad, toxicidad hERG, unión a proteínas, etc.) que afectan su desarrollo, biodisponibilidad, evaluación *in vitro* e *in vivo*, formulación, etc. del compuesto, es decir, su potencial de emerger como un fármaco para el tratamiento de la enfermedad objetivo (*druglikeness*). En este sentido, la mayoría de los fármacos aprobados presentan de 0 a 3 anillos aromáticos y se ha demostrado, a partir de distintos estudios, que al aumentar este número de anillos aromáticos decremента las propiedades antes mencionadas, haciéndolas inadecuadas para el desarrollo del producto.^{107,108}

En la Tabla 23, 7 compuestos de los 25 derivados bencimidazólicos alcanzaron un alto puntaje (6 votos). Considerando el hecho de que si un compuesto presenta valores similares de modos de unión y energía de unión en dos programas (consenso), es mucho más probable que estos valores sean los más cercanos a la forma nativa del mismo.⁶⁰ Por lo tanto, se buscó sólo aquellos compuestos de estos 7 derivados que tuvieran un coeficiente de selectividad dentro de los 10 mejores valores para ambos programas (2 votos bajo el criterio de 10 MCS en la Tabla 23). Con este enfoque, sólo los compuestos 10, 11, 13, 16 y 22 cumplen con este criterio. De éstos, los compuestos 10, 11 y 13 forman parte del subgrupo de compuestos MolA, mientras que los compuestos 16 y 22 representan al subgrupo Molb (Ver Tabla 4 para los subgrupos). Por lo cual, con base en la premisa anterior respecto al consenso, se identificó aquel compuesto de cada grupo en el que la energía de unión es la más cercana en ambos programas (Ver Tablas 21 y 23). A partir de este último enfoque, se obtuvo el compuesto 10 del subgrupo MolA y el compuesto 16 del subgrupo MolB (Ver Tabla 4 para los subgrupos).

Las características electrónicas y estructurales que están presentes en ambos compuestos, ligandos 10 y 16, y que son necesarios para la interacción con la DHODHLm se muestran en las Figuras 61 y 63, respectivamente. Estas características farmacofóricas fueron obtenidas utilizando la herramienta de MOE.

Para ambos compuestos, estas características corresponden a tres componentes de aceptores de puentes de hidrógeno (representado con Acc, color azul), 2 componentes aromáticos (representado con Aro, color naranja) y un componente hidrofóbico (representado con Hyd, color verde) (Ver Figuras 61 y 63).

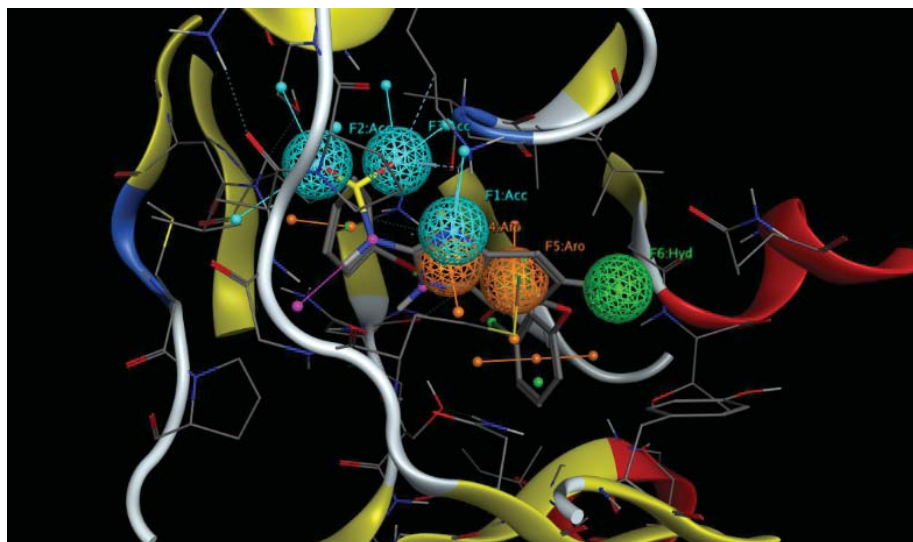


Figura 61. Farmacóforo del ligando 10. Esferas color azul: componente aceptor de puentes de hidrógeno; Esferas color naranja: componente aromático; Esferas color verde: componente de interacciones hidrofóbicas.

Uno de los componentes de Acc es el nitrógeno de la posición 3 del bencimidazol, cuyo par de electrones no está comprometido en la aromaticidad del anillo. Mientras que los otros dos componentes Acc hacen referencia a los oxígenos de la sulfonamida (Figuras 61-64). El nitrógeno en la posición 3 del bencimidazol en el ligando 10 interactúa con la Asn195 (residuo importante para la estabilización del sustrato endógeno) por puente de hidrógeno (Figura 62), mientras que en el ligando 16 este mismo nitrógeno forma un puente de hidrógeno con la Lys44 (Figura 64), otro residuo importante para la estabilización del sustrato endógeno. En el caso de los oxígenos de la sulfonamida, éstos participan por medio de puentes de hidrógeno con distintos residuos, incluyendo la Asn195 y la Leu72 en el ligando 10 y 16, respectivamente (Figuras 62 y 64), los cuales son residuos importantes en la estabilización del sustrato endógeno de la enzima.

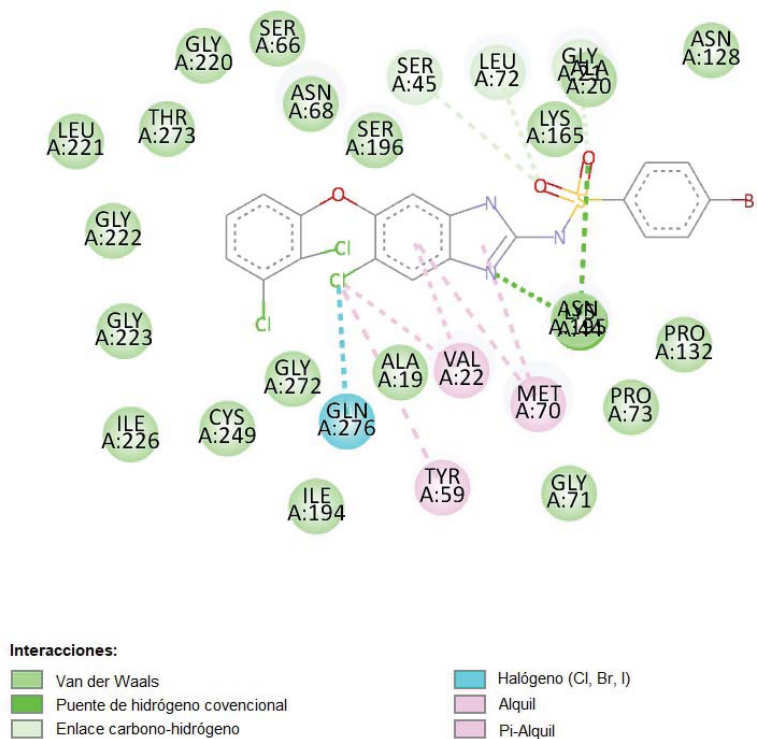


Figura 62. Diagrama 2D de interacciones entre la DHODHLM y el ligando 10.

Para el caso de los componentes aromáticos (Aro, color naranja en Figuras 61 y 63), estos se refieren al núcleo aromático del bencimidazol en ambos ligandos: 10 y 16. Éste interacciona con distintos residuos del sitio de unión de la enzima por medio de diferentes tipos de interacciones. De particular interés, es la interacción de estos anillos aromáticos tanto en el ligando 10 como 16, con la Met70 por medio de la interacción π -alquí (Figura 62 y 64 respectivamente), el cual es un residuo que contribuye a la estabilización del sustrato endógeno.

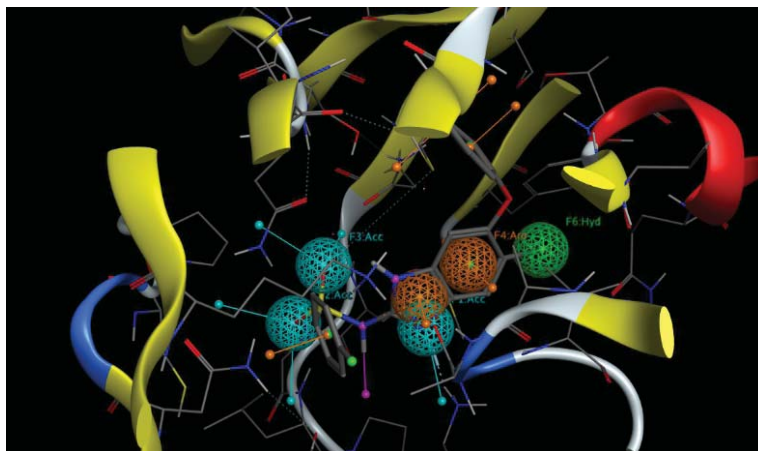


Figura 63. Farmacóforo del ligando 16. Esferas color azul: componente aceptor de puentes de hidrógeno; Esferas color naranja: componente aromático; Esferas color verde: componente de interacciones hidrofóbicas.

El componente del farmacóforo hidrofóbico para ambos ligandos (Hyd, color verde en Figuras 60 y 62) hace referencia al átomo de cloro unido al núcleo de bencimidazol y que interactúa con diferentes residuos adyacentes al sitio de unión que contribuyen a la estabilización de la unión entre ambos ligandos y la DHODHLm (Figuras 61 y 63).

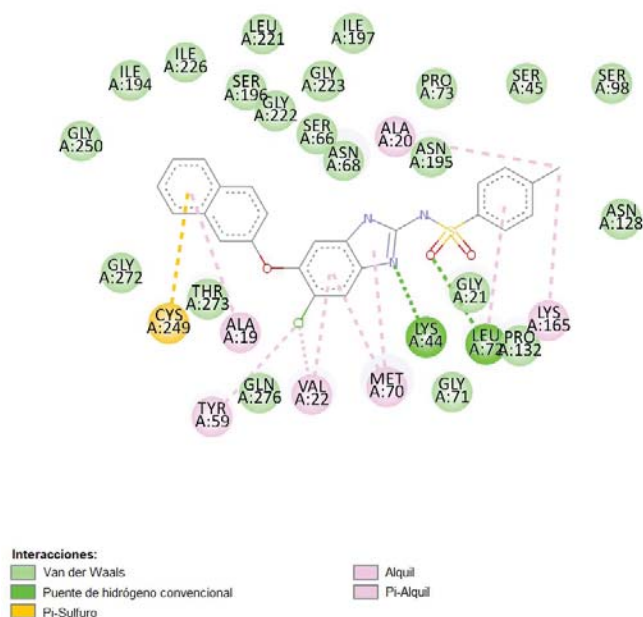


Figura 64. Diagrama 2D de las interacciones entre la DHODHLm y el ligando 16.

Las interacciones presentes entre los componentes farmacofóricos y residuos clave en el sitio de unión de interés, demuestran la importancia de la presencia del núcleo de bencimidazol clorado y la sulfonamida para favorecer la unión e interacción entre los derivados bencimidazólicos y la DHODHLm en el sitio de unión de interés. Por lo anteriormente descrito, estas características farmacofóricas se usan como base en las transformaciones químicas propuestas realizadas a los derivados bencimidazólicos de partida en la sección correspondiente al DIFAC.

7.6 DIFAC (propuestas y diseño)

Se diseñaron otros compuestos bencimidazólicos siguiendo la metodología descrita en la Sección 6.7, partiendo de los ligandos 10 y 16 como esqueleto base, así como de sus características farmacofóricas (ver Sección 7.5) como criterios requeridos para la construcción de los compuestos. Esto con el fin de proponer otros compuestos basados en la información de energía de unión y selectividad en términos de la misma energía de los derivados bencimidazólicos estudiados en el presente trabajo, incluyendo los ligandos 10 y 16, sobre la DHODHLm. Se espera que éstos tengan actividad antiparasitaria y propiedades de energía de unión y selectividad similares o mejores a las presentadas por los 25 derivados bencimidazólicos.

Se obtuvieron 735 compuestos empleando la herramienta Medchem, en el programa MOE, la cual permite cambiar diferentes fragmentos de la molécula a partir de un base de datos de química farmacéutica, respetando los criterios establecidos por el farmacóforo. Los compuestos se filtraron, seleccionando aquellos que cumplen con la regla de los cinco de Lipinski, que presentan el núcleo de bencimidazol deseado y una energía de unión hacia la DHODHLm igual o menor que los ligandos de partida: ligandos 10 y 16. (Ver Figura 65)



Figura 65. Esquema de los resultados de las transformaciones en Medchem y los filtros para el DIFAC.

En la Figura 66, observamos a los 71 compuestos bencimidazólicos obtenidos (esferas color rojo), los cuales se encuentran distribuidos en un sitio dentro del espacio químico relativamente cercano a los derivados bencimidazólicos de partida (esferas color azul), pero el cual no es explorado por estos últimos. Por lo cual, las transformaciones químicas en Medchem permitieron explorar y obtener distintos compuestos a los de partida que poseen algunas propiedades fisicoquímicas o estructurales distintas que podrían resultar en una mejor unión hacia DHODHLM, mientras mantienen las propiedades farmacofóricas deseadas para la misma unión.

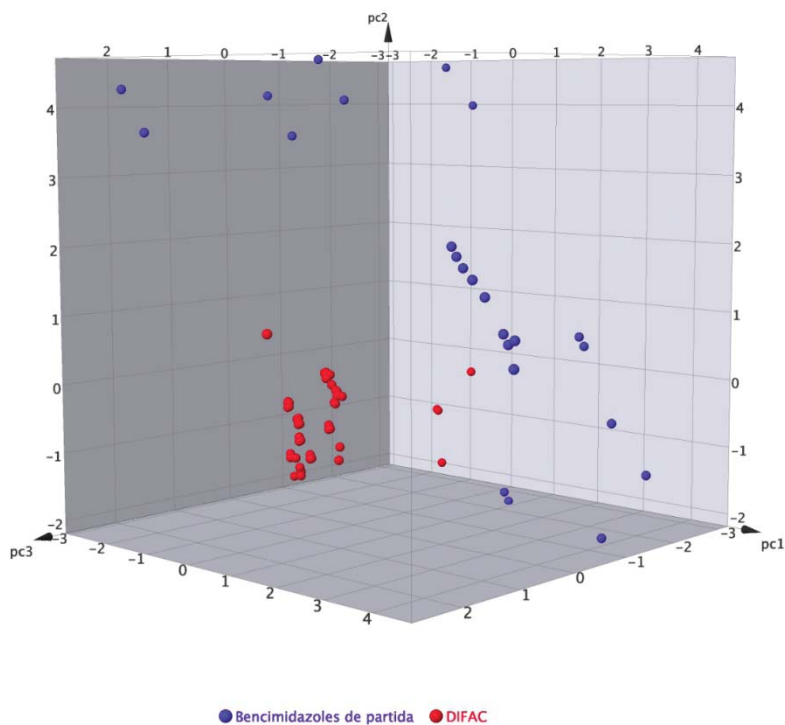


Figura 66. Espacio químico de los 25 derivados bencimidazólicos de partida y los 71 compuestos obtenidos en DIFAC. Diagrama obtenido en DataWarrior.⁹⁴

A pesar de la exploración en la diversidad de compuestos en el espacio químico permitida por las transformaciones en Medchem, los 71 compuestos generados están situados cerca de los fármacos aprobados y antiparasitarios dentro del espacio químico (Figura 67), por lo cual se espera que esos compuestos obtenidos por DIFAC continúen teniendo propiedades fisicoquímicas y biológicas similares a los fármacos aprobados y antiparasitarios reportados. En caso de encontrarse biológicamente activos, estos compuestos, en un futuro, puedan ser desarrollados como posibles fármacos.

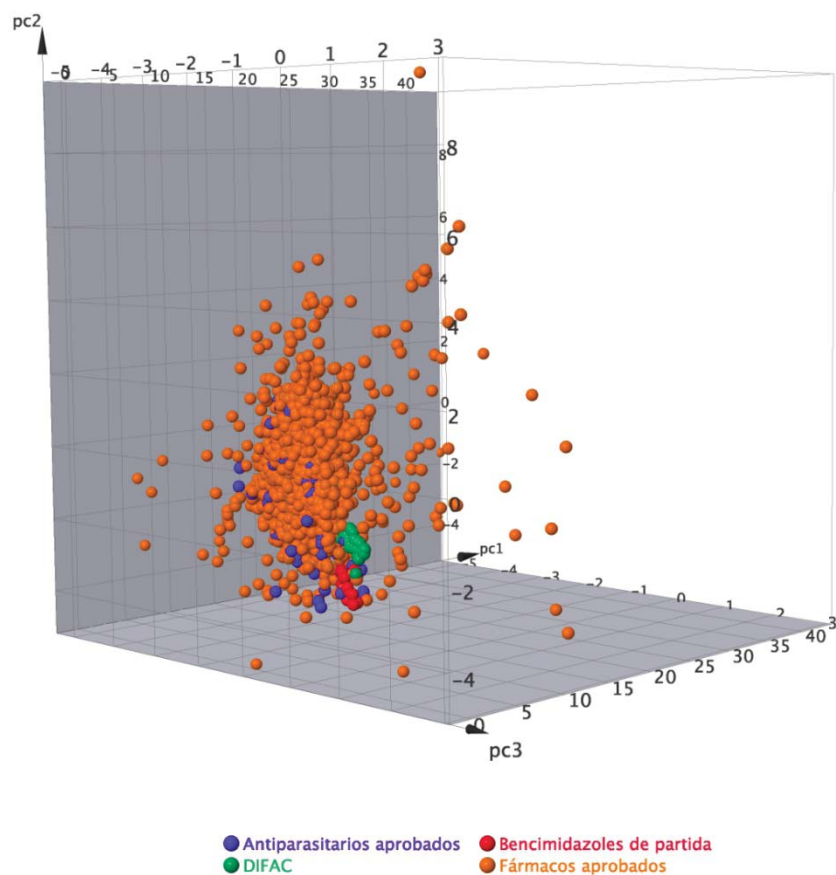
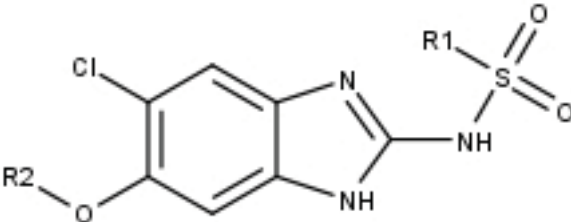
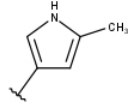
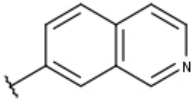
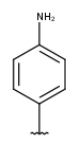
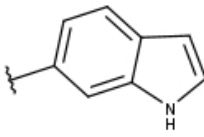
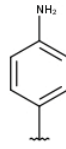
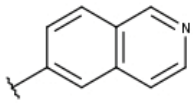


Figura 67. Espacio químico de los compuestos obtenidos por DIFAC, antiparasitarios aprobados, bencimidazoles de partida y fármacos aprobados por la FDA. Diagrama obtenido en DataWarrior.⁹⁴

De los 71 compuestos que resultaron a partir del filtro realizado a las estructuras obtenidas por DIFAC, se obtuvieron los valores de energía de unión a DHODHHs y se calcularon los coeficientes de selectividad. Tanto los valores de energía de unión a DHODHLM, como los de coeficiente de selectividad asociado se trataron usando una estrategia de ranqueo por voto (Sección 6.5). Se escogieron aquellos compuestos que obtuvieron un ranking dentro de los 5 mejores para ambos criterios en el tratamiento (ser de los primeros 5 en el ranking para baja energía de unión a DHODHLM y alto coeficiente de selectividad en términos de energía de unión sobre la DHODHLM). En el Anexo 11.5 se encuentran los valores de energía unión hacia DHODHLM y DHODHHs y coeficientes de selectividad para los 71 compuestos, así como el tratamiento de éstos por ranqueo por voto.

Tres compuestos, de estos 71, cumplieron con el criterio de ranqueo descrito anteriormente y presentan las estructuras farmacofóricas encontradas adecuadas para la interacción con la DHODHLM (Sección 7.5). Estos compuestos son nombrados ligandos 32, 49 y 60 con motivos de discusión en el presente trabajo (Tabla 24).

Tabla 24. Compuestos obtenidos del DIFAC con los mejores valores de energía de unión y coeficiente de selectividad

 <p>Estructura general de los ligandos 32, 49 y 60</p>				
Ligando	R1	R2	Ranking de energía de unión (Energía de unión kJ/mol)	Ranking de coeficiente de selectividad
32			5 (-17.69)	5 (1.85)
49			3 (-17.88)	4 (1.85)
60			2 (-18.12)	1 (1.88)

En el estudio de acoplamiento molecular entre los ligandos 32, 49 y 60 y la DHODHLm (sección 6.7), éstos presentan su mejor modo de unión y/o conformación interaccionando con el sitio catalítico S1 y adyacente S2 en la parte interior de la enzima, los cuales forman el sitio de unión de interés en donde se une y es estabilizado el sustrato endógeno. (Figuras 68a, 68b y 68c); resultados similares a los observados para los derivados bencimidazólicos de partida (Sección 7.3), incluyendo mejor energía de unión que el sustrato endógeno. Con base en estos hallazgos, se espera que estos 3 compuestos impidan la unión del sustrato endógeno por impedimento estérico o cambios conformacionales en el sitio de unión (Ver Sección 7.4).

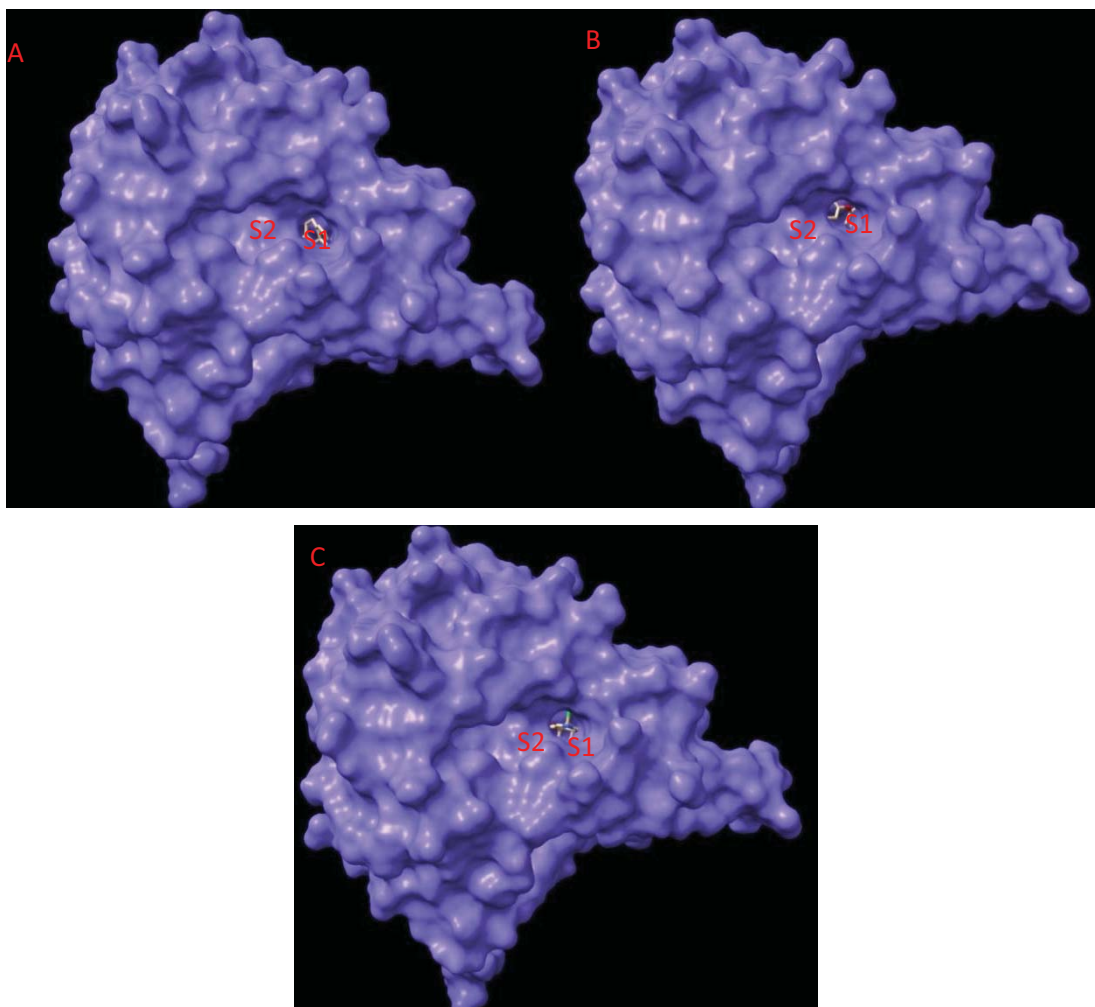


Figura 68. Representación 3D del complejo DHODHLm-ligando. A) receptor- ligando 32; B) receptor- ligando 49; C) receptor- ligando 60.

En este mismo sentido, los diferentes fragmentos o subestructuras de los ligandos 32, 49 y 60 interactúan con distintos residuos que forman parte del sitio de unión (regiones S1 y S2) y residuos de sitios adyacentes (Figuras 69-71). De manera particular, el ligando 32 (Figura 69) interactúa con los residuos Asn68, Met70, Gly71, Leu72, Asn195 y Ser196, que se unen y estabilizan de manera directa al sustrato endógeno, es decir, con 6 de los 9 residuos principales para la estabilización del sustrato endógeno.¹⁰⁶ Un mayor número de residuos que aquellos con los que logran interactuar de manera individual cada derivado bencimidazólico estudiado (Ver Figuras 33, 36 y 39, Sección 7.3.3). La presencia del núcleo de bencimidazol y los fragmentos de isoquinolina y pirrol, en el ligando 32, promueve la interacción de este ligando con estos residuos en el sitio de unión (Figura 69).

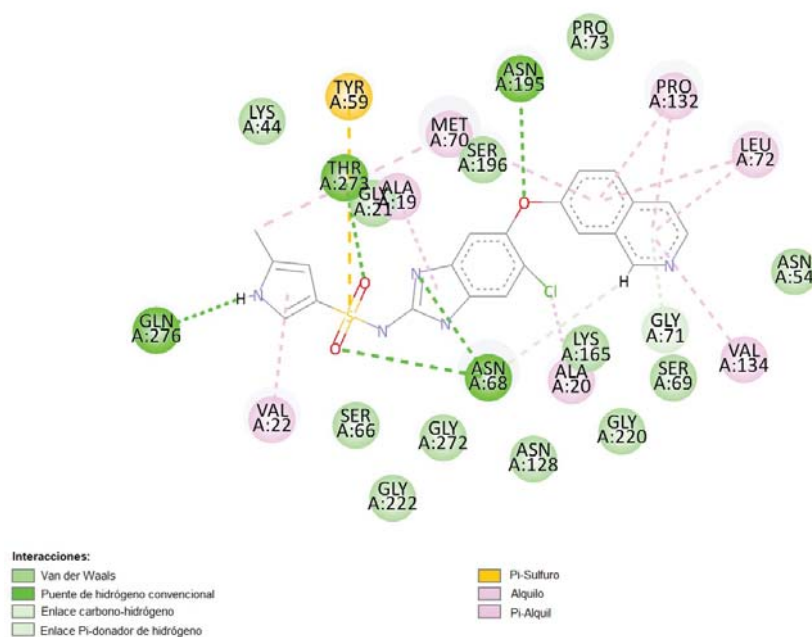


Figura 69. Diagrama 2D de interacciones entre la DHODHLM y el ligando 32.

De manera similar al ligando 32, el ligando 49 presenta interacciones con distintos residuos que forman parte de las regiones S1 y S2 del sitio de unión de interés, y otros que forman parte de las zonas adyacentes (Figura 70). Entre los residuos con los que interactúa en el sitio de unión y que estabilizan al sustrato endógeno,

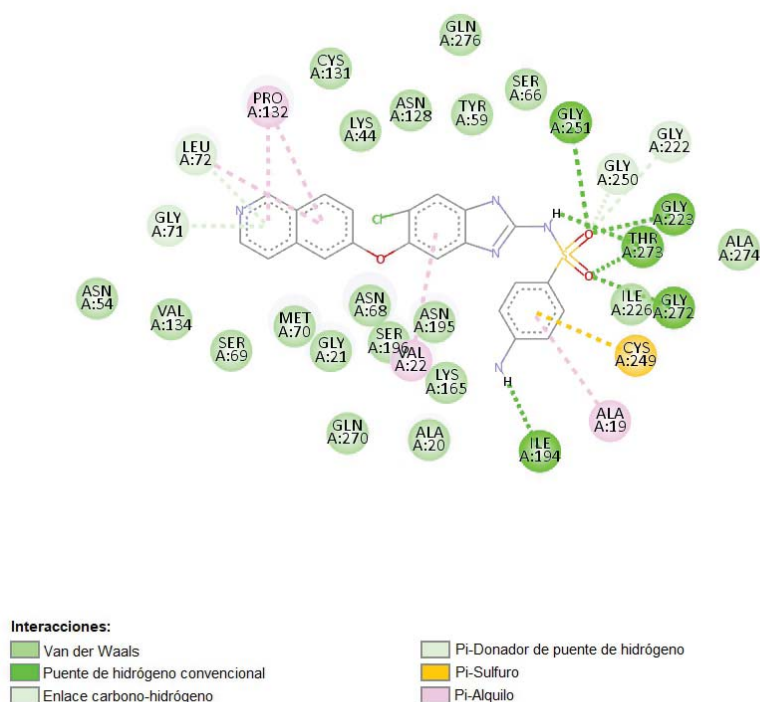
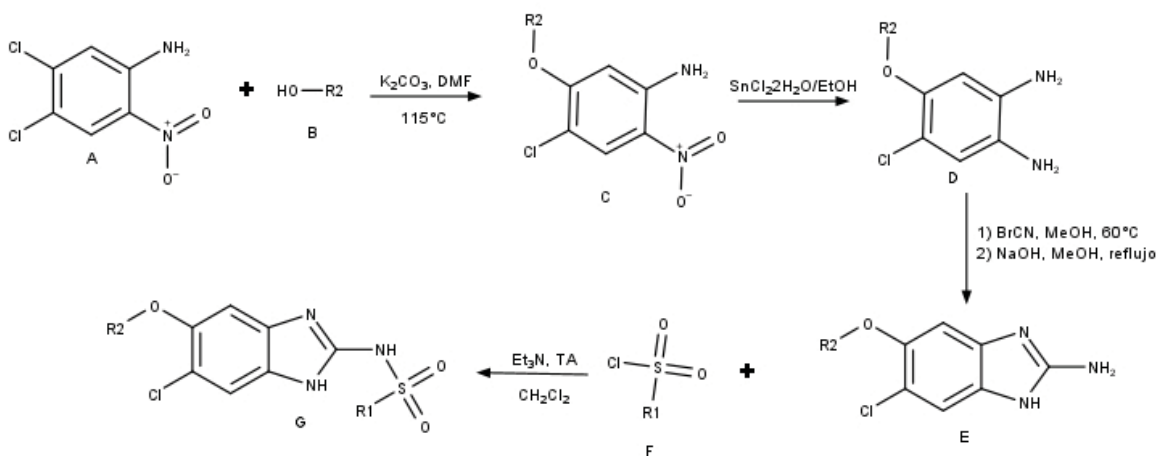


Figura 71. Diagrama 2D de interacciones entre la DHODH y el ligando 60.

Los resultados de energía de unión, modos de unión (interacciones intermoleculares con residuos importantes para la estabilización del sustrato endógeno y actividad catalítica) y coeficiente de selectividad, los cuales son similares a los derivados bencimidazólicos (base para el desarrollo del DIFAC), en conjunto con los resultados del espacio químico, validan la estrategia empleada en el presente trabajo para obtener compuestos que, potencialmente, presenten las propiedades biológicas (antiparasitaria) y computacionales observadas para los bencimidazoles de partida.

Con la finalidad de plantear una ruta para acceder a los compuestos obtenidos por DIFAC (ligandos 32, 49 y 60) y que éstos puedan ser evaluados biológicamente a futuro, se diseñó una estrategia de síntesis (Figura 72). Esta estrategia se obtuvo utilizando la herramienta de IBM RXN, que permite planificar rutas de síntesis confiables, así como a partir de métodos desarrollados y publicados por nuestro grupo de investigación.^{22,109–112}

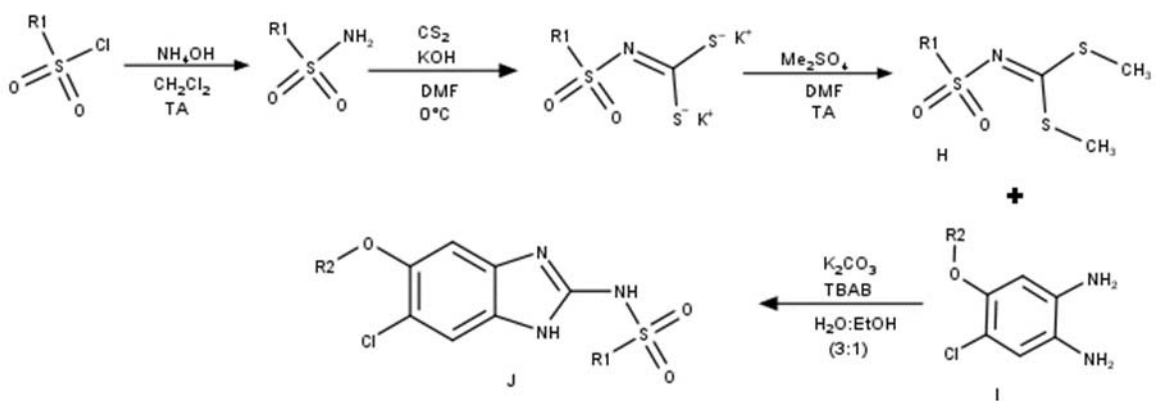
Esta metodología sintética involucra cuatro pasos principales y parte de materias comercialmente disponibles (compuestos A, F y B con los sustituyentes R1 y R2 respectivos en la Figura 72). Esta ruta comienza con una S_NAr entre el alcohol aromático, con el sustituyente R2 correspondiente para cada ligando (Ver Figura 72), y el compuesto A (4,5-dicloro-2-nitroanilina) para promover la formación del éter correspondiente (compuesto C, Figura 72). Este último sufre una reducción en condiciones suaves para dar lugar a la *o*-fenilendiamina respectiva (compuesto D, Figura 72). Para este caso, nuestro grupo de investigación también ha planteado el uso de Ni-Raney.¹¹² Es importante que la diamina (compuesto D) se forme en este punto y no se parta de la misma para evitar reacciones de S_NAr no deseadas entre una de las aminas y el alcohol aromático, así como su descomposición. Esta reducción es seguida por la reacción de la diamina con BrCN con la finalidad de formar el núcleo de 2-aminobencimidazol (compuesto E), el cual reacciona con el cloruro de bencensulfonilo correspondiente (compuesto F) para dar, finalmente, la sulfonamida bencimidazólica objetivo (compuesto G). Esta propuesta aprovecha el poder nucleofílico del grupo amino en la posición 2 del bencimidazol, así como el buen centro electrofílico en el azufre del cloruro de sulfonilo con el sustituyente R1 correspondiente (Figura 72), para llevar a cabo una reacción sencilla de sustitución nucleofílica. Sin embargo, este último paso ha sido optimizado ya que el uso de algunos cloruros de sulfonilo no ha permitido llevar a cabo la reacción con el 2-aminobencimidazol de manera exitosa, dando lugar a subproductos no deseados. Por lo que en nuestro grupo de trabajo se desarrolló una estrategia utilizando (Fenilsulfonil)carbonoditioimidatos de dimetilo (compuesto H, Figura 73), los cuales reaccionan con la *o*-fenilendiamina (compuesto I, Figura 73) en presencia de K_2CO_3 y TBAB para dar lugar a las sulfonamidas bencimidazólicas correspondientes (compuesto J, Figura 73). Una ventaja importante de esta reacción es que se asegura que la posición de la sulfonamida en el anillo del bencimidazol sea en la posición 2, evitando que los nitrógenos en las posiciones 1,3 del anillo de bencimidazol sean los que formen la sulfonamida.¹¹² Alternativa que se planeta usar en caso de que se presente algún problema en el uso de los cloruros correspondientes (Figura 72).



Ligando	R1	R2
32		
49		
60		

Figura 72. Estrategia de síntesis para los ligandos 32, 49 y 60.

Nuestro grupo de investigación ha implementado esta síntesis y variantes de ésta en diferentes ocasiones para acceder de manera exitosa a distintos bencimidazoles, incluyendo los 25 de partida en este trabajo.^{22,109–112} Por lo que se espera que esta estrategia permita el acceso exitoso a los ligandos 32, 49 y 60 para estudios futuros.



Ligando	R1	R2
32		
49		
60		

Figura 73. Estrategia alternativa utilizando (Fenilsulfonyl)carbonoditioimidatos de dimetil

8.- Conclusiones

Se identificaron cinco potenciales dianas moleculares en *L. mexicana* para los 25 derivados bencimidazólicos de partida a través de la búsqueda por similitud estructural: la piruvato cinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, el complejo conjugado de ubiquitina E2 y la dihidroorotato deshidrogenasa.

Se determinó a la dihidroorotato deshidrogenasa como el blanco molecular más prometedor en *L. mexicana* para los derivados de partida, debido a que las energías de unión y coeficientes de selectividad de éstos últimos sobre la dihidroorotato fueron mejores en comparación con otras dianas evaluadas.

Se encontró, en los estudios de acoplamiento molecular, que los derivados bencimidazólicos interactúan con los residuos Lys44, Asn68, Met70, Gly71, Leu72, Ser100, Asn128, Asn195 y Ser196 en la dihidroorotato deshidrogenasa. Residuos clave para la estabilización del sustrato endógeno (dihidroorotato) y la actividad catalítica de la enzima.

Se estableció en la dinámica molecular que los derivados bencimidazólicos (ligandos 1 y 19) se unen, de manera estable, en el sitio de unión del sustrato endógeno y sitio catalítico de la dihidroorotato deshidrogenasa, los cuales forman la única cavidad en la que el sustrato ingresa e interactúa con la diana.

Con los estudios de acoplamiento molecular y construcción del farmacóforo, se determinó que el núcleo de bencimidazol monoclorado y la sulfonamida son características electrónicas y estructurales que deben poseer los derivados para la interacción con la dihidroorotato deshidrogenasa por medio de los residuos clave.

Se diseñaron tres compuestos bencimidazólicos (Tabla 24) a partir de los derivados bencimidazólicos más prometedores (ligandos 10 y 16) y características farmacofóricas deseadas. Estos compuestos presentaron propiedades de energía de unión y selectividad sobre DHODHLM similares a los bencimidazoles de partida e interaccionan con los residuos clave para la actividad de la enzima (estabilización del sustrato y catálisis).

9.- Perspectivas

Modificar estructuralmente los derivados bencimidazólicos de partida con la finalidad de generar una nueva serie de compuestos que tenga como diana molecular objetivo al Complejo de Ubiquitina E2 en *L. mexicana* al ser esta la segunda diana más prometedora, mejorando el coeficiente de selectividad con respecto a los inhibidores de referencia y los derivados de partida.

Elucidar la estructura cristalográfica de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa de *L. mexicana*.

Establecer el modo de unión nativo de los ligandos de menor tamaño (ligando 3) y mayor tamaño (ligando 19) y contrastarlo con los datos de la dinámica molecular preparando las estructuras cristalográficas de los complejos de la dihidroorotato deshidrogenasa de *L. mexicana* con los ligandos 3 y 19, respectivamente.

Preparar el cristal del complejo de la dihidroorotato *deshidrogenasa de L. mexicana* con los ligandos más prometedores: 10 y 16, con la finalidad de evaluar el modo de unión nativo y validar los estudios de acoplamiento molecular de manera experimental.

Obtener la estructura cristalográfica del complejo dihidroorotato deshidrogenasa de *Homo sapiens* y el ligando 10 para confirmar las diferencias de selectividad establecidas en el presente trabajo, al ser el ligando con el mejor coeficiente de selectividad en términos de energía de unión sobre la DHODHLM.

Realizar la dinámica molecular entre los derivados bencimidazólicos restantes (principalmente de los ligandos más prometedores: 10 y 16) y la dihidroorotato deshidrogenasa de *L. mexicana* y *H. sapiens*.

Identificar el comportamiento de los ligandos 32, 49 y 60 con la dihidroorotato deshidrogenasa de *L. mexicana* y *H. sapiens* por medio de estudios de dinámica molecular.

Sintetizar los ligandos 32, 49 y 60 siguiendo la estrategia sintética planteada en el presente trabajo.

Evaluar la inhibición enzimática de la DHODHs en presencia de los 25 derivados bencimidazólicos y los ligandos 32, 49 y 60, por un método calorimétrico.¹¹³

Determinar la inhibición enzimática de la DHODHLm en presencia de los 25 derivados bencimidazólicos y los ligandos 32, 49 y 60, por el ensayo de inyección múltiple.⁹⁷

10.- Referencias bibliográficas

- (1) Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (consultado Abril 3, 2021).
- (2) Okwor, I.; Uzonna, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *94* (3), 489–493. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408>.
- (3) Nagle, A. S.; Khare, S.; Kumar, A. B.; Supek, F.; Buchynskyy, A.; Mathison, C. J. N.; Chennamaneni, N. K.; Pendem, N.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H.; Molteni, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (22), 11305–11347. <https://doi.org/10.1021/cr500365f>.
- (4) Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: Complexity at the Host-Pathogen Interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9* (8), 604–615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>.
- (5) Taslimi, Y.; Zahedifard, F.; Rafati, S. Leishmaniasis and Various Immunotherapeutic Approaches. *Parasitology* **2018**, *145* (4), 497–507. <https://doi.org/10.1017/S003118201600216X>.
- (6) Organización Mundial de la Salud. WHO. Epidemiological situation. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (consultado Abril 4, 2021).
- (7) Secretaría de Salud. Gobierno de México. LEISHMANIASIS. Secretaría de Salud. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/leishmaniasis> (consultado Abril 4, 2021).
- (8) Pereira, Á.; Pérez, M. Leishmaniosis. *Parasitol. Offarm* **2002**, *21* (9), 116–124.
- (9) Gamboa Arend R. Leishmaniasis Cutánea. *Rev. Médica Costa Rica y Centroamérica* **2009**, *LXVI* (588), 169–172.

- (10) Centro de Control y Prevención de Enfermedades. USA. CDC - DPDx - Leishmaniasis <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> (consultado Abril 4, 2021).
- (11) Burza, S.; Croft, S. L.; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **2018**, 392 (10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
- (12) Ghorbani, M.; Farhoudi, R. Leishmaniasis in Humans: Drug or Vaccine Therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* **2018**, 12, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>.
- (13) Lauletta Lindoso, J. A.; Lopes Costa, J. M.; Queiroz, J. T.; Goto, H. Review of the Current Treatments for Leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.* **2012**, 3, 77. <https://doi.org/10.2147/rrtm.s24764>.
- (14) Bakunova, S. M.; Bakunov, S. A.; Patrick, D. A.; Kumar, E. V. K. S.; Ohemeng, K. A.; Bridges, A. S.; Wenzler, T.; Barszcz, T.; Jones, S. K.; Werbovetz, K. A.; Brun, R.; Tidwell, R. R. Structure-Activity Study of Pentamidine Analogues as Antiprotozoal Agents. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (7), 2016–2035. <https://doi.org/10.1021/jm801547t>.
- (15) Chibli, L. A.; Schmidt, T. J.; Nonato, M. C.; Calil, F. A.; Da Costa, F. B. Natural Products as Inhibitors of Leishmania Major Dihydroorotate Dehydrogenase. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 157, 852–866. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.033>.
- (16) Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Drier-Jonas, S.; Jiménez-Arellanes, M. A. Natural Compounds and Extracts from Mexican Medicinal Plants with Anti-Leishmaniasis Activity: An Update. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, 10 (12), 1105–1110. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.016>.
- (17) Tipparaju, S. K.; Joyasawal, S.; Pieroni, M.; Kaiser, M.; Brun, R.; Kozikowski, A. P. In Pursuit of Natural Product Leads: Synthesis and Biological Evaluation of 2-[3-Hydroxy-2-[(3-Hydroxypyridine-2-Carbonyl)Amino]Phenyl]Benzoxazole-4- Carboxylic Acid (A-33853) and Its Analogues: Discovery of N-(2-Benzoxazol-2- Ylphenyl)Benzamides as Novel

- Antileishmanial Chemotypes. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (23), 7344–7347. <https://doi.org/10.1021/jm801241n>.
- (18) Martínez, A.; Carreon, T.; Iniguez, E.; Anzellotti, A.; Sánchez, A.; Tyan, M.; Sattler, A.; Herrera, L.; Maldonado, R. A.; Sánchez-Delgado, R. A. Searching for New Chemotherapies for Tropical Diseases: Ruthenium-Clotrimazole Complexes Display High in Vitro Activity against *Leishmania Major* and *Trypanosoma Cruzi* and Low Toxicity toward Normal Mammalian Cells. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (8), 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm300070h>.
- (19) Aponte, J. C.; Castillo, D.; Estevez, Y.; Gonzalez, G.; Arevalo, J.; Hammond, G. B.; Sauvain, M. In Vitro and in Vivo Anti-*Leishmania* Activity of Polysubstituted Synthetic Chalcones. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (1), 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.033>.
- (20) Foroumadi, A.; Emami, S.; Sorkhi, M.; Nakhjiri, M.; Nazarian, Z.; Heydari, S.; Ardestani, S. K.; Poorrajab, F.; Shafiee, A. Chromene-Based Synthetic Chalcones as Potent Antileishmanial Agents: Synthesis and Biological Activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75* (6), 590–596. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.00959.x>.
- (21) Reynolds, K. A.; Loughlin, W. A.; Young, D. J. Quinolines as Chemotherapeutic Agents for Leishmaniasis. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2013**, *13* (5), 730–743. <https://doi.org/10.2174/1389557511313050010>.
- (22) Nieto-Meneses, R.; Castillo, R.; Hernández-Campos, A.; Maldonado-Rangel, A.; Matius-Ruiz, J. B.; Trejo-Soto, P. J.; Noguera-Torres, B.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F.; Méndez-Cuesta, C.; Yépez-Mulia, L. In Vitro Activity of New N-Benzyl-1H-Benzimidazol-2-Amine Derivatives against Cutaneous, Mucocutaneous and Visceral *Leishmania* Species. *Exp. Parasitol.* **2018**, *184*, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.11.009>.
- (23) Sánchez-Salgado, J. C.; Bilbao-Ramos, P.; Dea-Ayuela, M. A.; Hernández-Luis, F.; Bolás-Fernández, F.; Medina-Franco, J. L.; Rojas-Aguirre, Y. Systematic Search for Benzimidazole Compounds and Derivatives with

- Antileishmanial Effects. *Mol. Divers.* **2018**, 22 (4), 779–790. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9830-7>.
- (24) Hernández-Luis, F.; Hernández-Campos, A.; Castillo, R.; Navarrete-Vázquez, G.; Soria-Arteche, O.; Hernández-Hernández, M.; Yépez-Mulia, L. Synthesis and Biological Activity of 2-(Trifluoromethyl)-1H-Benzimidazole Derivatives against Some Protozoa and *Trichinella Spiralis*. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (7), 3135–3141. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.050>.
- (25) Sundar, S.; Singh, B. Emerging Therapeutic Targets for Treatment of Leishmaniasis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2018**, 22 (6), 467–486. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472241>.
- (26) Raj, S.; Sasidharan, S.; Balaji, S. N.; Saudagar, P. An Overview of Biochemically Characterized Drug Targets in Metabolic Pathways of *Leishmania* Parasite. *Parasitol. Res.* **2020**, 119 (7), 2025–2037. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06736-x>.
- (27) Jain, V.; Jain, K. Molecular Targets and Pathways for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Drug Discov. Today* **2018**, 23 (1), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.006>.
- (28) Raj, S.; Saha, G.; Sasidharan, S.; Dubey, V. K.; Saudagar, P. Biochemical Characterization and Chemical Validation of *Leishmania* MAP Kinase-3 as a Potential Drug Target. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52774-6>.
- (29) Das, P.; Alam, N.; Paik, D.; Karmakar, K.; De, T.; Chakraborti, T. Protease Inhibitors in Potential Drug Development for Leishmaniasis. *Indian J. Biochem. Biophys.* **2013**, 50, 363–376.
- (30) Naveja, J. J.; Medina-Franco, J. L. Finding Constellations in Chemical Space Through Core Analysis. *Front. Chem.* **2019**, 7 (510). <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00510>.
- (31) Reymond, J. L.; Van Deursen, R.; Blum, L. C.; Ruddigkeit, L. Chemical

- Space as a Source for New Drugs. *Medchemcomm* **2010**, *1* (1), 30–38. <https://doi.org/10.1039/c0md00020e>.
- (32) Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45* (1), 177–182. <https://doi.org/10.1021/CI049714+>.
- (33) Liu, T.; Lin, Y.; Wen, X.; Jorissen, R. N.; Gilson, M. K. BindingDB: A Web-Accessible Database of Experimentally Determined Protein-Ligand Binding Affinities. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (1), D198–D201. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl999>.
- (34) Warr, W. A. ChEMBL. An Interview with John Overington, Team Leader, Chemogenomics at the European Bioinformatics Institute Outstation of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI). *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2009**, *23* (4), 195–198. <https://doi.org/10.1007/s10822-009-9260-9>.
- (35) Bolton, E. E.; Wang, Y.; Thiessen, P. A.; Bryant, S. H. Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. En *Annual Reports in Computational Chemistry*, Vol 4; Elsevier BV, 2008; pp 217–241. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(08\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(08)00012-1).
- (36) Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. Descubrimiento y Desarrollo de Fármacos: Un Enfoque Computacional. *Educ. Quim.* **2017**, *28* (1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>.
- (37) Leelananda, S. P.; Lindert, S. Computational Methods in Drug Discovery. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12* (1), 2694–2718. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267>.
- (38) Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66* (1), 334–395. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>.
- (39) Dellaflora, L.; Aichinger, G.; Geib, E.; Sánchez-Barrionuevo, L.; Brock, M.; Cánovas, D.; Dall’Asta, C.; Marko, D. Hybrid in Silico/in Vitro Target Fishing

- to Assign Function to “Orphan” Compounds of Food Origin – The Case of the Fungal Metabolite Atromentin. *Food Chem.* **2019**, *270*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.027>.
- (40) Méndez-Lucio, O.; Naveja, J. J.; Vite-Caritino, H.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. Review. One Drug for Multiple Targets: A Computational Perspective. *J. Mex. Chem. Soc.* **2016**, *60* (3), 168–181.
- (41) Cereto-Massagué, A.; Ojeda, M. J.; Valls, C.; Mulero, M.; Pujadas, G.; Garcia-Vallve, S. Tools for in Silico Target Fishing. *Methods* **2015**, *71* (C), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.09.006>.
- (42) Medina-Franco, J. L. Advances in computational approaches for drug discovery based on natural products. *Rev. Latinoam. química* **2013**, *41* (2), 95–110.
- (43) Maggiora, G.; Vogt, M.; Stumpfe, D.; Bajorath, J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (8), 3186–3204. <https://doi.org/10.1021/jm401411z>.
- (44) Cereto-Massagué, A.; Ojeda, M. J.; Valls, C.; Mulero, M.; Garcia-Vallvé, S.; Pujadas, G. Molecular Fingerprint Similarity Search in Virtual Screening. *Methods* **2015**, *71* (C), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.005>.
- (45) Swamidass, S. J.; Baldi, P. Bounds and Algorithms for Fast Exact Searches of Chemical Fingerprints in Linear and Sublinear Time. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47* (2), 302–317. <https://doi.org/10.1021/ci600358f>.
- (46) Mendez, D.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Chambers, J.; De Veij, M.; Félix, E.; Magariños, M. P.; Mosquera, J. F.; Mutowo, P.; Nowotka, M.; Gordillo-Marañón, M.; Hunter, F.; Junco, L.; Mugumbate, G.; Rodriguez-Lopez, M.; Atkinson, F.; Bosc, N.; Radoux, C. J.; Segura-Cabrera, A.; Hersey, A.; Leach, A. R. ChEMBL: Towards Direct Deposition of Bioassay Data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (D1), D930–D940. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1075>.
- (47) ChEMBL. FPSim2, a simple Python3 molecular similarity tool.

<http://chembl.blogspot.com/2019/01/fpsim2-simple-python3-molecular.html>
(consultado Abril 5, 2021).

- (48) Prieto-Martínez, F. D.; Arciniega, M.; Medina-Franco, J. L. Molecular Docking: Current Advances and Challenges. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **2018**, *21* (1), 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>.
- (49) Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. Molecular Docking. En *Molecular Modelling of Proteins*, Vol. 443; Humana Press, 2008; pp 365–382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19.
- (50) Guedes, I. A.; de Magalhães, C. S.; Dardenne, L. E. Receptor-Ligand Molecular Docking. *Biophys. Rev.* **2014**, *6* (1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.
- (51) Salmaso, V.; Moro, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9* (923), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>.
- (52) Ferreira, L. G.; Dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **2015**, *20* (7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- (53) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (54) Huang, S.-Y.; Zou, X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11* (8), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>.
- (55) Hill, A. D.; Reilly, P. J. Scoring Functions for Autodock. En *Glycoinformatics*, Vol. 1273; Humana Press Inc., 2015; pp 467–474. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2343-4_27.

- (56) The Scripps Research Institute. Equations — AutoDock. <http://autodock.scripps.edu/resources/science/equations/> (consultado Abril 6, 2021).
- (57) Galli, C. L.; Sensi, C.; Fumagalli, A.; Parravicini, C.; Marinovich, M.; Eberini, I. A Computational Approach to Evaluate the Androgenic Affinity of Iprodione, Procymidone, Vinclozolin and Their Metabolites. *PLoS One* **2014**, 9 (8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104822>.
- (58) Preto, J.; Gentile, F. Assessing and Improving the Performance of Consensus Docking Strategies Using the DockBox Package. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2019**, 33 (9), 817–829. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00227-7>.
- (59) Houston, D. R.; Walkinshaw, M. D. Consensus Docking: Improving the Reliability of Docking in a Virtual Screening Context. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53 (2), 384–390. <https://doi.org/10.1021/ci300399w>.
- (60) Oda, A.; Tsuchida, K.; Takakura, T.; Yamaotsu, N.; Hirono, S. Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, 46 (1), pp 380–391. <https://doi.org/10.1021/ci050283k>.
- (61) Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, 99 (6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.
- (62) Song, Y.; Dimaio, F.; Wang, R. Y. R.; Kim, D.; Miles, C.; Brunette, T.; Thompson, J.; Baker, D. High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM. *Structure* **2013**, 21 (10), 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>.
- (63) Vyas, V. K.; Ukawala, R. D.; Ghate, M.; Chintha, C. Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives. *Indian J. Pharm. Sci.* **2012**, 74 (1), 1–17. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.102537>.

- (64) Kuhlman, B.; Bradley, P. Advances in Protein Structure Prediction and Design. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20* (11), 681–697. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>.
- (65) Lam, S. D.; Das, S.; Sillitoe, I.; Orengo, C. An Overview of Comparative Modelling and Resources Dedicated to Large-Scale Modelling of Genome Sequences. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **2017**, *73* (8), 628–640. <https://doi.org/10.1107/S2059798317008920>.
- (66) Raman, S.; Vernon, R.; Thompson, J.; Tyka, M.; Sadreyev, R.; Pei, J.; Kim, D.; Kellogg, E.; Dimaio, F.; Lange, O.; Kinch, L.; Sheffler, W.; Kim, B. H.; Das, R.; Grishin, N. V.; Baker, D. Structure Prediction for CASP8 with All-Atom Refinement Using Rosetta. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *77* (9), 89–99. <https://doi.org/10.1002/prot.22540>.
- (67) Pražnikar, J.; Tomić, M.; Turk, D. Validation and Quality Assessment of Macromolecular Structures Using Complex Network Analysis. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38658-9>.
- (68) Domagalski, M. J.; Zheng, H.; Zimmerman, M. D.; Dauter, Z.; Wlodawer, A.; Minor, W. The Quality and Validation of Structures from Structural Genomics. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1091*, 297–314. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-691-7_21.
- (69) Laskowski, R. A.; Furnham, N.; Thornton, J. M. The Ramachandran Plot and Protein Structure Validation. In *Biomolecular Forms and Functions: A Celebration of 50 Years of the Ramachandran Map*; Bansal, M., Srinivasan, N., Eds.; World Scientific Publishing Co., 2013; pp 62–75. https://doi.org/10.1142/9789814449144_0005.
- (70) Williams, C. J.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Prisant, M. G.; Videau, L. L.; Deis, L. N.; Verma, V.; Keedy, D. A.; Hintze, B. J.; Chen, V. B.; Jain, S.; Lewis, S. M.; Arendall, W. B.; Snoeyink, J.; Adams, P. D.; Lovell, S. C.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: More and Better Reference Data for Improved All-Atom Structure Validation. *Protein Sci.* **2018**, *27* (1),

- 293–315. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>.
- (71) Nair, S.; Kukreja, N.; Singh, B. P.; Arora, N. Identification of B Cell Epitopes of Alcohol Dehydrogenase Allergen of *Curvularia Lunata*. *PLoS One* **2011**, *6* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020020>.
- (72) Liljas, A.; Liljas, L.; Piskur, J.; Lindblom, G.; Nissen, P.; Kjeldgaard, M. *Textbook of Structural Biology*, 1st ed., Vol. 1; PAGEPress Publications, 2009. <https://doi.org/10.4081/eb.2009.e2>.
- (73) McGuffin, L. J.; Buenavista, M. T.; Roche, D. B. The ModFOLD4 Server for the Quality Assessment of 3D Protein Models. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W372. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt294>.
- (74) Maghrabi, A. H. A.; McGuffin, L. J. ModFOLD6: An Accurate Web Server for the Global and Local Quality Estimation of 3D Protein Models. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (W1), W416–W421. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx332>.
- (75) Benkert, P.; Tosatto, S. C. E.; Schomburg, D. QMEAN: A Comprehensive Scoring Function for Model Quality Assessment. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2008**, *71* (1), 261–277. <https://doi.org/10.1002/prot.21715>.
- (76) Benkert, P.; Künzli, M.; Schwede, T. QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (2), W514. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp322>.
- (77) Wadood, A.; Riaz, M.; Uddin, R.; Ul-Haq, Z. In Silico Identification and Evaluation of Leads for the Simultaneous Inhibition of Protease and Helicase Activities of HCV NS3/4A Protease Using Complex Based Pharmacophore Mapping and Virtual Screening. *PLoS One* **2014**, *9* (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089109>.
- (78) Khalid, S.; Hanif, R.; Jabeen, I.; Mansoor, Q.; Ismail, M. Pharmacophore Modeling for Identification of Anti-IGF-1R Drugs and in-Vitro Validation of Fulvestrant as a Potential Inhibitor. *PLoS One* **2018**, *13* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196312>.

- (79) Zhang, Y.; Zhang, T.; Tu, S.; Zhang, Z.; Meng, F. Identification of Novel Src Inhibitors: Pharmacophore-Based Virtual Screening, Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Molecules* **2020**, *25* (18), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25184094>.
- (80) El Kerdawy, A. M.; Osman, A. A.; Zaater, M. A. Receptor-Based Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and Molecular Docking Studies for the Discovery of Novel GSK-3 β Inhibitors. *J. Mol. Model.* **2019**, *25* (6), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4032-5>.
- (81) Bateman, A.; Martin, M. J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Agivetova, R.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E. H.; Britto, R.; Bursteinas, B.; Bye-A-Jee, H.; Coetzee, R.; Cukura, A.; Silva, A. Da; Denny, P.; Dogan, T.; Ebenezer, T. G.; Fan, J.; Castro, L. G.; Garmiri, P.; Georghiou, G.; Gonzales, L.; Hatton-Ellis, E.; Hussein, A.; Ignatchenko, A.; Insana, G.; Ishtiaq, R.; Jokinen, P.; Joshi, V.; Jyothi, D.; Lock, A.; Lopez, R.; Luciani, A.; Luo, J.; Lussi, Y.; MacDougall, A.; Madeira, F.; Mahmoudy, M.; Menchi, M.; Mishra, A.; Moulang, K.; Nightingale, A.; Oliveira, C. S.; Pundir, S.; Qi, G.; Raj, S.; Rice, D.; Lopez, M. R.; Saidi, R.; Sampson, J.; Sawford, T.; Speretta, E.; Turner, E.; Tyagi, N.; Vasudev, P.; Volynkin, V.; Warner, K.; Watkins, X.; Zaru, R.; Zellner, H.; Bridge, A.; Poux, S.; Redaschi, N.; Aimo, L.; Argoud-Puy, G.; Auchincloss, A.; Axelsen, K.; Bansal, P.; Baratin, D.; Blatter, M. C.; Bolleman, J.; Boutet, E.; Breuza, L.; Casals-Casas, C.; de Castro, E.; Echioukh, K. C.; Coudert, E.; Cuche, B.; Doche, M.; Dornevil, D.; Estreicher, A.; Famiglietti, M. L.; Feuermann, M.; Gasteiger, E.; Gehant, S.; Gerritsen, V.; Gos, A.; Gruaz-Gumowski, N.; Hinz, U.; Hulo, C.; Hyka-Nouspikel, N.; Jungo, F.; Keller, G.; Kerhornou, A.; Lara, V.; Le Mercier, P.; Lieberherr, D.; Lombardot, T.; Martin, X.; Masson, P.; Morgat, A.; Neto, T. B.; Paesano, S.; Pedruzzi, I.; Pilbout, S.; Pourcel, L.; Pozzato, M.; Pruess, M.; Rivoire, C.; Sigrist, C.; Sonesson, K.; Stutz, A.; Sundaram, S.; Tognolli, M.; Verbregue, L.; Wu, C. H.; Arighi, C. N.; Arminski, L.; Chen, C.; Chen, Y.; Garavelli, J. S.; Huang, H.; Laiho, K.; McGarvey, P.; Natale, D. A.; Ross, K.; Vinayaka, C. R.; Wang, Q.; Wang, Y.; Yeh, L. S.; Zhang, J. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021.

- Nucleic Acids Res.* **2021**, 49 (D1), D480–D489.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
- (82) Shah, N.; Nute, M. G.; Warnow, T.; Pop, M. Misunderstood Parameter of NCBI BLAST Impacts the Correctness of Bioinformatics Workflows. *Bioinformatics* **2019**, 35 (9), 1613–1614.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty833>.
- (83) Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. Fast, Scalable Generation of High-quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, 7 (539), 1–6.
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- (84) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 2000, pp 235–242.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- (85) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25 (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- (86) Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the Estimation of the Absolute Quality of Individual Protein Structure Models. *Bioinformatics* **2011**, 27 (3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.
- (87) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, 11 (8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>.
- (88) Chemical Computing Group ULC. Molecular Operating Environment (MOE). Quebec, Canada 2019.

- (89) Schrödinger LLC. PyMOL Molecular Graphics System. (90) Sanabria-Chanaga, E. E.; Betancourt-Conde, I.; Hernández-Campos, A.; Téllez-Valencia, A.; Castillo, R. In Silico Hit Optimization toward AKT Inhibition: Fragment-Based Approach, Molecular Docking and Molecular Dynamics Study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37* (16), 4301–4311. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1546618>.
- (91) Dassault Systèmes. BIOVIA Discovery Studio Visualizer. San Diego 2020.
- (92) Berthold, M. R.; Cebren, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kotter, T.; Meinel, T.; Ohl, P.; Sieb, C. KNIME: The Konstanz Information Miner. In *Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization*; Springer, 2007.
- (93) Schwaller, P.; Gaudin, T.; Lányi, D.; Bekas, C.; Laino, T. “Found in Translation”: Predicting Outcomes of Complex Organic Chemistry Reactions Using Neural Sequence-to-Sequence Models. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (28), 6091–6098. <https://doi.org/10.1039/c8sc02339e>.
- (94) Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. DataWarrior: An Open-Source Program for Chemistry Aware Data Visualization and Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (2), 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>.
- (95) Lafrance-Vanasse, J.; Sygusch, J. Carboxy-Terminus Recruitment Induced by Substrate Binding in Eukaryotic Fructose Bis-Phosphate Aldolases †, ‡. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9533–9540. <https://doi.org/10.1021/bi700615r>.
- (96) Burge, R. J.; Damianou, A.; Wilkinson, A. J.; Rodenko, B.; Mottram, J. C. Leishmania Differentiation Requires Ubiquitin Conjugation Mediated by a UBC2-UEV1 E2 Complex. *PLoS Pathog.* **2020**, *16* (10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008784>.
- (97) Cheleski, J.; Rocha, J. R.; Pinheiro, M. P.; Wiggers, H. J.; Da Silva, A. B. F.; Nonato, M. C.; Montanari, C. A. Novel Insights for Dihydroorotate Dehydrogenase Class 1A Inhibitors Discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (12), 5899–5909. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.055>.

- (98) Rigden, D. J.; Phillips, S. E. V.; Michels, P. A. M.; Fothergill-Gilmore, L. A. The Structure of Pyruvate Kinase from *Leishmania Mexicana* Reveals Details of the Allosteric Transition and Unusual Effector Specificity. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291* (3), 615–635. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2918>.
- (99) Hannaert, V.; Yernaux, C.; Rigden, D. J.; Fothergill-Gilmore, L. A.; Opperdoes, F. R.; Michels, P. A. M. The Putative Effector-Binding Site of *Leishmania Mexicana* Pyruvate Kinase Studied by Site-Directed Mutagenesis. *FEBS Lett.* **2002**, *514* (2–3), 255–259. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02374-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02374-8).
- (100) Valentini, G.; Chiarelli, L.; Fortini, R.; Speranza, M. L.; Galizzi, A.; Mattevi, A. The Allosteric Regulation of Pyruvate Kinase: A Site-Directed Mutagenesis Study. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (24), 18145–18152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001870200>.
- (101) Suresh, S.; Bressi, J. C.; Kennedy, K. J.; Verlinde, C. L. M. J.; Gelb, M. H.; Hol, W. G. J. Conformational Changes in *Leishmania Mexicana* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Induced by Designed Inhibitors. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309* (2), 423–435. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4588>.
- (102) Hodge, C. D.; Edwards, R. A.; Markin, C. J.; McDonald, D.; Pulvino, M.; Huen, M. S. Y.; Zhao, J.; Spyropoulos, L.; Hendzel, M. J.; Glover, J. N. M. Covalent Inhibition of Ubc13 Affects Ubiquitin Signaling and Reveals Active Site Elements Important for Targeting. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (7), 1718–1728. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00222>.
- (103) Kufareva, I.; Abagyan, R. Methods of Protein Structure Comparison. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *857*, 231–257. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10.
- (104) Haddad, Y.; Adam, V.; Heger, Z. Rotamer Dynamics: Analysis of Rotamers in Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *Biophys. J.* **2019**, *116* (11), 2062–2072. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.04.017>.

- (105) Morgan, H. P.; McNae, I. W.; Nowicki, M. W.; Hannaert, V.; Michels, P. A. M.; Fothergill-Gilmore, L. A.; Walkinshaw, M. D. Allosteric Mechanism of Pyruvate Kinase from *Leishmania Mexicana* Uses a Rock and Lock Model. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (17), 12892–12898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079905>.
- (106) Cordeiro, A. T.; Feliciano, P. R.; Pinheiro, M. P.; Nonato, M. C. Crystal Structure of Dihydroorotate Dehydrogenase from *Leishmania Major*. *Biochimie* **2012**, *94* (8), 1739–1748. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.003>.
- (107) Ward, S. E.; Beswick, P. What Does the Aromatic Ring Number Mean for Drug Design? *Expert Opinion on Drug Discovery* **2014**, *9*, 995–1003. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.932346>.
- (108) Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J. F. The Impact of Aromatic Ring Count on Compound Developability - Are Too Many Aromatic Rings a Liability in Drug Design? *Drug Discov. Today* **2009**, *14* (21–22), 1011–1020. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.014>.
- (109) Hernández-Campos, A.; Ibarra-Velarde, F.; Vera-Montenegro, Y.; Rivera-Fernández, N.; Castillo, R. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-Chloro-2-Methylthio-6-(1-Naphthyloxy)-1H-Benzimidazole. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50* (5), 649–652. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.649>.
- (110) Valdez, J.; Cedillo, R.; Hernández-Campos, A.; Yépez, L.; Hernández-Luis, F.; Navarrete-Vázquez, G.; Tapia, A.; Cortés, R.; Hernández, M.; Castillo, R. Synthesis and Antiparasitic Activity of 1H-Benzimidazole Derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (16), 2221–2224. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00346-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00346-3).
- (111) Trejo-Soto, P. J. Síntesis de Tres Carboxamidas Bencimidazólicas Diseñadas Por Docking Como Inhibidores Potenciales de La Triosafosfato Isomerasa (TIM) de *Entamoeba Histolytica*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México,

2011.

- (112) Huerta García, C. S. Síntesis y Actividad Antiprotozoaria de N-(6-Cloro-5-(2,3-Diclorofenoxi)-1H-Bencimidazol-2-Il)Bencensulfonamidas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2017.
- (113) Knecht, W.; Henseling, J.; Löffler, M. Kinetics of Inhibition of Human and Rat Dihydroorotate Dehydrogenase by Atovaquone, Lawsone Derivatives, Brequinar Sodium and Polyporic Acid. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *124* (1), 61–76. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00144-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00144-1).

11.- Anexos

11.1 Anexo de la búsqueda por similitud

Tabla 25. Compuestos resultantes de la búsqueda por similitud estructural, los cuales presentan actividad biológica, potencia reportada y blanco conocido

ChEMBL ID	SMILE
CHEMBL1086440	<chem>CSc1nc2cc(Cl)c(Oc3cccc(Cl)c3Cl)cc2[nH]1</chem>
CHEMBL1710509	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(C)c(C)cc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL1574961	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cccc2[nH]1)c1ccc(Cl)cc1</chem>
CHEMBL1574891	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cccc2[nH]1)c1ccc2cccc2c1</chem>
CHEMBL1518903	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cccc2[nH]1)c1cccc1</chem>
CHEMBL208762	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cccc3[nH]2)c1</chem>
CHEMBL3683289	<chem>N#Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2ccc(F)cn2)ccc1Oc1ccc(Cl)c1Cl</chem>
CHEMBL1496940	<chem>Cc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(-c4cccc4)nc3c2)c(Cl)c1</chem>
CHEMBL3113167	<chem>COc1cccc(CNc2ccc(S(=O)(=O)Nc3nc4cccc4[nH]3)cc2)c1O</chem>
CHEMBL3688175	<chem>Cc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc(Oc3cccc(Cl)c3C#N)cc2)nc1</chem>
CHEMBL1480145	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(Oc2cccc3ccnc23)c(Cl)c1</chem>
CHEMBL1699207	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(NS(=O)(=O)c2cccc2)c(Cl)c1</chem>
CHEMBL1421937	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc3[nH]c(O)nc3c2)cc1</chem>
CHEMBL526139	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3ccc(Cl)cc3s2)cc1</chem>
CHEMBL210260	<chem>O=C(Nc1nc2cc(Cl)c(Cl)cc2[nH]1)c1cccc([N+](=O)[O-])c1</chem>
CHEMBL4161753	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(S(=O)(=O)Nc2cnc3cccc3c2)cc1</chem>
CHEMBL1418175	<chem>O=C(Cc1nc2cccc2[nH]1)c1cccc([N+](=O)[O-])c1</chem>
CHEMBL1509574	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(CSc2nc3cccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL1579136	<chem>Cc1nc(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)sc1C(=O)O</chem>
CHEMBL3092550	<chem>O=C(CCc1nc2cccc2c(=O)[nH]1)NCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1483402	<chem>O=C(Cc1nc2cccc2[nH]1)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1388992	<chem>O=C(NCCc1nc2cccc2[nH]1)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1370868	<chem>O=C(O)c1ccnc1SCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1579201	<chem>O=C(NCc1nc2cccc2[nH]1)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1507144	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(Cc2nc3cccc3nc2O)cc1</chem>
CHEMBL1323156	<chem>O=C(CSCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1)Nc1cccc1C(=O)O</chem>
CHEMBL1957941	<chem>O=C(NCCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1)c1ccc(O)c2[nH]c(Cc3cccc3)nc12</chem>
CHEMBL63146	<chem>O=[N+][O-]c1ccc2[nH]c(Cc3ccc(Oc4cccc4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL1880969	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(Cc2ccc([N+](=O)[O-])cc2)cc1</chem>
CHEMBL3677761	<chem>O=C(O)c1cccc2nc(-c3ccc(-c4c(F)cccc4F)cc3)[nH]c12</chem>
CHEMBL4077039	<chem>O=[N+][O-]c1ccc2[nH]c(Cc3cccc3)nc2c1</chem>

CHEMBL1366938	<chem>COC(=O)c1ccccc1NC(=O)C(C)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1304067	<chem>Cc1nc2cccc(C(=O)Oc3ccc([N+](=O)[O-])cc3)c2o1</chem>
CHEMBL1373698	<chem>COC(=O)c1c(C)[nH]c(C)c1-c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL33227	<chem>COC(=O)[C@H](Cc1ccc([N+](=O)[O-])cc1)NC(=O)c1cccc2cccc12</chem>
CHEMBL467812	<chem>COC(=O)c1ccccc1-c1cc2cc([N+](=O)[O-])ccc2[nH]1</chem>
CHEMBL1506253	<chem>O=C(OCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1)c1ccc2cccc2n1</chem>
CHEMBL1581672	<chem>Cc1nc2cccc2nc1OCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL3189284	<chem>CN/N=C(\Cc1nc2cccc2[nH]1)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1736338	<chem>COC(=O)c1cc(C)ccc1OCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1526476	<chem>CC(=O)Nc1ccc(Cc2nc3cccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL3397064	<chem>COC(=O)CCc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL2134746	<chem>COC(=O)c1ccccc1N=NNc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL131778	<chem>COC(=O)c1cccc(NC(=O)c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)c1N</chem>
CHEMBL131683	<chem>COC(=O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)nc12</chem>
CHEMBL2133491	<chem>COC(=O)c1cccc2c1C(=O)c1cc([N+](=O)[O-])ccc1-2</chem>
CHEMBL1934434	<chem>COC(=O)c1c(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)c(C)n(Cc2cccc2)c1C</chem>
CHEMBL1390552	<chem>Cl.O=C(O)c1ccc(-c2nc3cccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL1407741	<chem>O=[N+](O)c1ccc2[nH]c(-c3ccc(Cl)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL605301	<chem>O=C1c2cccc2C(=O)c2c1ccc1nc(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)[nH]c21</chem>
CHEMBL297548	<chem>O=[N+](O)c1ccc(Nc2c3cccc3nc3cccc23)cc1</chem>
CHEMBL1535921	<chem>COc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL1574420	<chem>O=C(O)c1ccccc1Nc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1310332	<chem>O=[N+](O)c1ccc(-c2nc(-c3cccs3)c(-c3cccs3)[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL1386380	<chem>O=C(O)c1c[nH]nc1-c1cccc([N+](=O)[O-])c1</chem>
CHEMBL1446966	<chem>Cc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL159895	<chem>Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL3677784	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(-c4ccc(OCCO)cc4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL1608264	<chem>O=C(O)c1ccc(Nc2nc(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)nc3cccc23)cc1</chem>
CHEMBL1164165	<chem>O=c1[nH]c(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)nc2cccc12</chem>
CHEMBL1607046	<chem>O=C(O)c1cc(-c2cccc([N+](=O)[O-])c2)nc2cccc12</chem>
CHEMBL160012	<chem>O=[N+](O)c1ccc2[nH]c(-c3ccncc3)nc2c1</chem>
CHEMBL1483847	<chem>O=[N+](O)c1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL1164403	<chem>O=[N+](O)c1ccc2[nH]c(-c3cccc3)nc2c1</chem>
CHEMBL109066	<chem>O=C(O)c1ccc(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)cc1</chem>
CHEMBL1434990	<chem>O=[N+](O)c1ccc(-c2cnc3cccc3n2)cc1</chem>
CHEMBL1563210	<chem>O=[N+](O)c1cccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)c1</chem>
CHEMBL3950657	<chem>O=C(O)c1cc(Nc2ccc(-c3nc4cccc4[nH]3)cc2)n(-c2ccc([N+](=O)[O-])</chem>

])cc2)n1
CHEMBL527253	O=C(COc1cccc([N+](=O)[O-])c1)Nc1ccc(-c2nc3ccccc3[nH]2)cc1
CHEMBL3715781	O=C(O)c1ccc2nc(-c3ccccc3)c(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)nc2c1
CHEMBL372161	O=C(Nc1ccc(-c2nc3ccccc3[nH]2)cc1)Nc1ccc(-c2nc3c([N+](=O)[O-])ccccc3[nH]2)cc1
CHEMBL1395204	O=C(O)c1cccc(Nc2nc(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)nc3ccccc23)c1
CHEMBL1366605	O=c1oc(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)nc2ccccc12
CHEMBL475441	O=C(O)c1cccc1-c1nc2ccccc2[nH]1
CHEMBL2142905	Cc1nc2ccccc2nc1-c1ccc([N+](=O)[O-])cc1
CHEMBL1377001	O=[N+](O)c1ccc(-c2n[nH]c(-c3ccccc3)n2)cc1
CHEMBL1380557	O=c1c2ccccc2nc(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)n1O
CHEMBL466699	O=[N+](O)c1ccc(-c2nc(-c3ccccc3)c[nH]2)cc1
CHEMBL133169	O=C(O)c1cccc2[nH]c(-c3ccccc3)nc12
CHEMBL467327	O=[N+](O)c1ccc(-c2c[nH]c(-c3ccccc3)n2)cc1
CHEMBL1413784	COc1ccc([N+](=O)[O-])cc1-c1[nH]c(-c2ccc(C(=O)O)cc2)nc1-c1ccccc1
CHEMBL193397	NC(=O)c1ccc2[nH]c(-c3ccc(Oc4ccc([N+](=O)[O-])cc4)cc3)nc2c1
CHEMBL234072	N=C(N)NC(=O)c1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1
CHEMBL3344019	O=C(O)CC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1
CHEMBL1519312	O=C(O)c1ccc(-c2nnc(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)o2)cc1
CHEMBL13876	O=[N+](O)c1ccc(-c2[nH]ccc3c4ccccc4nc2-3)cc1
CHEMBL285526	CN(c1cccc1C(=O)O)S(=O)(=O)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1
CHEMBL3589656	O=C(O)c1nc2ccccc2c2[nH]c3ccc([N+](=O)[O-])cc3c12
CHEMBL3961938	NC(=O)c1ccc2[nH]c(-c3ccc(N4CCN(c5ccc([N+](=O)[O-])cc5)CC4)cc3)nc2c1
CHEMBL3586114	Cc1cc2nc(-c3ccc(-c4nnc(-c5cccc([N+](=O)[O-])c5)o4)cc3)[nH]c2cc1C
CHEMBL1817880	O=C(c1ccc(-c2nc3ccccc3c(=O)[nH]2)cc1)N1CCN(S(=O)(=O)c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)CC1
CHEMBL1310040	O=C(c1ccc(-c2ccccc2)cc1)c1ccc([N+](=O)[O-])cc1
CHEMBL352531	O=[N+](O)c1ccc(-c2ccccc2)cc1
CHEMBL547599	O=C(Nc1ccc(-c2nc3ccccc3[nH]2)cc1)c1cccc([N+](=O)[O-])c1
CHEMBL97787	COc1ccc(-c2nc3cc(-c4nc5ccc([N+](=O)[O-])ccc5[nH]4)ccc3[nH]2)cc1
CHEMBL278262	O=[N+](O)c1ccc(-c2nc(-c3ccccc3)c(-c3ccccc3)[nH]2)cc1
CHEMBL336859	O=C(O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(O)cc3)nc12
CHEMBL1834966	CC(C)c1onc(-c2c(Cl)cccc2Cl)c1COc1ccc(-c2nc3cccc(C(=O)O)c3[nH]2)cc1
CHEMBL455953	O=C(O)c1cc(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)[nH]n1

CHEMBL339167	<chem>NC(=O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)nc12</chem>
CHEMBL3677795	<chem>Cc1ccc(C)n1-c1c(F)c(F)c(-c2nc3cccc(C(=O)O)c3[nH]2)c(F)c1F</chem>
CHEMBL175481	<chem>O=[N+](O)c1ccc2[nH]c(-c3ccc(Oc4cccc4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3677809	<chem>O=C(O)c1cccc2nc(-c3c(F)c(F)c(-c4cccc4)c(F)c3F)[nH]c12</chem>
CHEMBL3677731	<chem>O=C(O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(Oc4cccc4)cc3)nc12</chem>
CHEMBL3677739	<chem>O=C(O)c1cccc2nc(-c3ccc(-c4cccc4F)cc3F)[nH]c12</chem>
CHEMBL3344023	<chem>O=C(O)CCCC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL3289111	<chem>O=c1[nH]c(-c2cccc([N+](=O)[O-])c2)nc2cccc12</chem>
CHEMBL3586123	<chem>Cc1cc2nc(-c3ccc(-c4nnc(-c5ccc([N+](=O)[O-])cc5)o4)cc3)[nH]c2cc1C</chem>
CHEMBL3677810	<chem>O=C(O)c1cccc2nc(-c3c(F)c(F)c(-c4cccc(F)c4)c(F)c3F)[nH]c12</chem>
CHEMBL536620	<chem>Cc1cccc2nc(-c3ccc(-c4cccc(NC(=O)Nc5cccc5)c4)cc3)[nH]c12</chem>
CHEMBL3677792	<chem>O=C(O)c1cccc2nc(-c3c(F)c(F)c(-c4cccc(OCc5cccc5)c4)c(F)c3F)[nH]c12</chem>
CHEMBL3677762	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(Oc4cccc4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3965716	<chem>O=C(O)c1ccc2[nH]c(-c3ccc(Oc4ccc([N+](=O)[O-])cc4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3753644	<chem>O=C(Nc1ccc(Nc2c3cccc3nc3cccc23)cc1)Nc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL3668073	<chem>O=Cc1c(O)ccc2nc(-c3ccc(C(=O)O)cc3)[nH]c12</chem>
CHEMBL3593998	<chem>O=C(O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(-c4cccc4)cc3)nc12</chem>
CHEMBL3677765	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(-c4cccc4)nc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3677776	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(-c4ccc(O)c(O)c4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3677786	<chem>O=C(O)c1cccc2nc(-c3c(F)c(F)c(-c4cccc4OCc4cccc4)c(F)c3F)[nH]c12</chem>
CHEMBL4251207	<chem>O=C([O-])c1ccc(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)cc1O.[K+]</chem>
CHEMBL3344021	<chem>O=C(O)CCCC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL3344040	<chem>O=C(O)COCC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL3344020	<chem>O=C(O)CCC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL3677742	<chem>O=C(O)c1cccc2nc(-c3ccc(-c4cccc4)cc3F)[nH]c12</chem>
CHEMBL3970129	<chem>NC(=O)c1ccc2[nH]c(-c3ccc(S(=O)(=O)Nc4ccc([N+](=O)[O-])cc4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3341781	<chem>O=C(O)CSCC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL3677756	<chem>O=C(O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(Nc4cccc4)cc3)nc12</chem>
CHEMBL3677741	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(-c4cccc4F)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3677746	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(-c4ccc(F)cc4F)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3677766	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(-c4c(F)cccc4F)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3677806	<chem>Cc1cc(C(=O)O)c2[nH]c(-c3ccc(-n4c(C)ccc4C)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL3677747	<chem>O=C(O)c1cc(Cl)cc2nc(-c3ccc(-c4cccc4)cc3)[nH]c12</chem>
CHEMBL1817873	<chem>O=C(O)c1ccc(-c2nc3cccc3c(=O)[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL4294501	<chem>O=C1c2cccc2C(=O)c2[nH]c(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)nc21</chem>
CHEMBL129984	<chem>COC(=O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(C(F)(F)F)cc3)nc12</chem>

CHEMBL3126820	<chem>COC(=O)c1cn(-c2ccc(S(N)(=O)=O)cc2)nc1-c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
CHEMBL1606120	<chem>COc1ccc(-c2cc(C(=O)O)c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)c3ccccc3n2)cc1</chem>
CHEMBL469191	<chem>COC(=O)c1cccc(-c2cc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)c1</chem>
CHEMBL1579058	<chem>COC(=O)c1cc(C(=O)Nc2nc3ccccc3[nH]2)cc([N+](=O)[O-])c1</chem>
CHEMBL547194	<chem>O=C(Nc1ccc(-c2nc3ccccc3[nH]2)cc1)c1ccc(-c2ccccc([N+](=O)[O-])c2)o1</chem>
CHEMBL587065	<chem>Cc1cccc2nc(-c3ccc(-c4ccc(NC(=O)Nc5ccc(Cl)cc5)cc4)cc3)[nH]c12</chem>
CHEMBL1323490	<chem>COC(=O)c1ccc(-c2nc3ccccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL132356	<chem>COC(=O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(C#N)cc3)nc12</chem>
CHEMBL469192	<chem>COC(=O)c1ccc(-c2cc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL103573	<chem>COC(=O)C(c1ccc([N+](=O)[O-])cc1)c1c2ccccc2nc2ccccc12</chem>
CHEMBL529950	<chem>COc1cc(-c2nc(-c3ccc([N+](=O)[O-])cc3)c(-c3ccccc3)[nH]2)cc(OC)c1O</chem>
CHEMBL336369	<chem>COC(=O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(OC)cc3)nc12</chem>
CHEMBL1525675	<chem>COC(=O)c1c(C)[nH]c(C)c1-c1cccc([N+](=O)[O-])c1</chem>
CHEMBL546588	<chem>COC(=O)c1cccc(CNCc2ccc(-c3cccc(-c4nc5cccc(C)c5[nH]4)c3)cc2)c1.O=C(O)C(F)(F)F</chem>
CHEMBL531856	<chem>COC(=O)c1cccc(CNCc2cccc(-c3cccc(-c4nc5cccc(C)c5[nH]4)c3)c2)c1.O=C(O)C(F)(F)F</chem>
CHEMBL232675	<chem>COC(=O)C1=C(c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)CCC1</chem>
CHEMBL455954	<chem>COC(=O)c1cc(-c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)[nH]n1</chem>
CHEMBL236473	<chem>COC(=O)C1=C(c2cccc([N+](=O)[O-])c2)C2CCC1N2</chem>
CHEMBL529395	<chem>COC(=O)c1cccc(CNCc2ccc(-c3ccc(-c4nc5cccc(C)c5[nH]4)cc3)cc2)c1.O=C(O)C(F)(F)F</chem>
CHEMBL3668080	<chem>COC(=O)c1cccc(-c2nc3ccc(O)c(C=O)c3[nH]2)c1</chem>
CHEMBL2148170	<chem>COC(=O)C(=Cc1ccc([N+](=O)[O-])cc1)C(=O)OC</chem>
CHEMBL532642	<chem>COC(=O)c1cccc(CNCc2cccc(-c3ccc(-c4nc5cccc(C)c5[nH]4)cc3)c2)c1.O=C(O)C(F)(F)F</chem>
CHEMBL438682	<chem>COC(=O)C1=C(c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)C2CCC1N2</chem>
CHEMBL130685	<chem>COC(=O)c1cccc2[nH]c(-c3cccc(OC)c3)nc12</chem>
CHEMBL3344022	<chem>COC(=O)CCCC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc([N+](=O)[O-])ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL435196	<chem>COC(=O)c1cccc2[nH]c(-c3ccc(N)cc3)nc12</chem>
CHEMBL3668074	<chem>COC(=O)c1ccc(-c2nc3ccc(O)c(C=O)c3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL1305833	<chem>CC(=O)Nc1ccc(-c2nc3cc(Cl)c([N+](=O)[O-])cc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL547949	<chem>COC(=O)c1ccc2nc(-c3ccc(C(=O)NCc4ccc(Cl)c(Cl)c4)cc3)[nH]c2c1</chem>
CHEMBL3731604	<chem>O=C(Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1)c1c(Cl)cccc1Cl</chem>
CHEMBL1528127	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc2ccccc2c1)c1ccccc1</chem>
CHEMBL2338476	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ccc3ccccc3c2)c(Cl)c1)c1ccc(Cl)cc1Cl</chem>
CHEMBL4098241	<chem>O=S(=O)(Nc1cc(Cl)c(Oc2cnc3ccccc3c2)c(Cl)c1)c1ccc2ccccc2c1</chem>

CHEMBL603161	<chem>O=c1[nH]c2cccc(Oc3cccc(NS(=O)(=O)c4cccc4)c3)c2[nH]1</chem>
CHEMBL2347752	<chem>CCNC(=O)Nc1nc2ccc(Oc3ccccc3Cl)cc2[nH]1</chem>
CHEMBL66539	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc2[nH]c(Cc3ccc(Oc4cccc4)cc3)nc2c1)c1cccc1</chem>
CHEMBL4075218	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc4cccc4c3)c(Cl)c2)cc1</chem>
CHEMBL4075993	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc4cccc4c3)cc2Cl)cc1</chem>
CHEMBL451609	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2cccc2)cc1)c1ccc(Br)cc1</chem>
CHEMBL1353794	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cccc2nc1Cl)c1ccc(Br)cc1</chem>
CHEMBL1732585	<chem>O=S(=O)(Nc1ccncc1Cl)c1ccc2cccc2c1</chem>
CHEMBL4062558	<chem>O=S(=O)(Nc1cc(Cl)c(Oc2cnc3cccc3c2)c(Cl)c1)c1ccc(Br)cc1</chem>
CHEMBL1498955	<chem>COc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(COc4ccc5cccc5c4)nc3c2)cc1</chem>
CHEMBL128850	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cccc3[nH]2)c(S)cc1Cl</chem>
CHEMBL462553	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)c2ccc3cccc3c2)cc1</chem>
CHEMBL1412376	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc3cccc3c2)cc1</chem>
CHEMBL1401199	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc3cccc3n2)cc1</chem>
CHEMBL1518476	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cccc3nc2Cl)cc1</chem>
CHEMBL4069230	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc4cccc4c3)cc2)cc1</chem>
CHEMBL4101871	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc4cccc4c3)c(F)c2)cc1</chem>
CHEMBL3913640	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3cccc3)cc2)cc1</chem>
CHEMBL4093203	<chem>COc1cc(NS(=O)(=O)c2ccc(NC(C)=O)cc2)ccc1Oc1ccc2cccc2c1</chem>
CHEMBL4075815	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc4cccc4c3)c(C#N)c2)cc1</chem>
CHEMBL4064775	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc4cccc4c3)c(C)c2)cc1</chem>
CHEMBL3730958	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2cccc2Oc2cccc2)cc1</chem>
CHEMBL4096681	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc(Cl)c(C(F)(F)F)c3)c(C#N)c2)cc1</chem>
CHEMBL4059906	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccc4cccc4c3)cc2C)cc1</chem>
CHEMBL1505613	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3nccn3)c(Cl)c2)cc1</chem>
CHEMBL1407617	<chem>COc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(-c4cccc4)nc3c2)cc1</chem>
CHEMBL1422545	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccccn2)cc1</chem>
CHEMBL281995	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2cccc3cc(Cl)[nH]c23)cc1</chem>
CHEMBL1420800	<chem>COc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(COc4cccc5cccc45)nc3c2)cc1</chem>
CHEMBL1447010	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Oc2ccc3cccc3c2)cc1</chem>
CHEMBL1319235	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2cc(Cl)ccc2OC)cc1</chem>
CHEMBL3392606	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2cccc3cccc23)cc1</chem>
CHEMBL1372492	<chem>COc1cc(NS(=O)(=O)c2ccc3cccc3c2)c2ncccc2c1</chem>
CHEMBL1344481	<chem>COc1ccc(OCc2nc3cc(S(=O)(=O)Nc4cccc4Cl)ccc3[nH]2)cc1</chem>
CHEMBL4104989	<chem>COc1cc(Oc2ccc3cccc3c2)ccc1NS(=O)(=O)c1ccc(NC(C)=O)cc1</chem>
CHEMBL2153849	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2cnc(Oc3cnc4cccc4c3)c(Cl)c2)cc1OC</chem>
CHEMBL1556515	<chem>COc1cc(Cl)c(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(=O)ccc3c2)c(OC)c1</chem>

CHEMBL3311197	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2c(C)cc(Cl)cc2C)cc1</chem>
CHEMBL1602381	<chem>COc1ccc2cc(S(=O)(=O)Nc3cccn3)ccc2c1</chem>
CHEMBL1498758	<chem>COc1cccc1NS(=O)(=O)c1ccc2ccccc2c1</chem>
CHEMBL1404507	<chem>COc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(COc4ccc(Cl)c(C)c4)nc3c2)cc1</chem>
CHEMBL1698296	<chem>COc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(O)nc3c2)cc1</chem>
CHEMBL3392444	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2cc(OC)cc3cccn23)cc1</chem>
CHEMBL1486362	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3ccccc3s2)cc1</chem>
CHEMBL3929091	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc(Oc3ccccc3)cc2)cc1</chem>
CHEMBL518522	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)NC(=O)/C=C/c2cn(C)c3cccc(Oc4ccc5ccccc5c4)c23)cc1</chem>
CHEMBL182454	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccccc2)cc1</chem>
CHEMBL2132268	<chem>COc1ccc(OC)c(NS(=O)(=O)c2ccc3[nH]c(O)nc3c2)c1</chem>
CHEMBL1400041	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccc3ccccc3c2)cc1</chem>
CHEMBL4167436	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccccc2NS(=O)(=O)c2ccc(OC)cc2)cc1</chem>
CHEMBL4162602	<chem>COc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nnc(NS(=O)(=O)c3ccc(OC)cc3)c3ccccc23)cc1</chem>
CHEMBL1450215	<chem>O=[N+][O-]c1ccc(Oc2ccc(S(=O)(=O)Nc3ccccc3)cc2)cc1</chem>
CHEMBL3392364	<chem>COc1cc(NS(=O)(=O)c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)c2ncccc2c1</chem>
CHEMBL4069457	<chem>N#Cc1cc(NS(=O)(=O)c2ccc([N+](=O)[O-])cc2)ccc1Oc1ccc(Cl)c(C(F)(F)F)c1</chem>
CHEMBL1864277	<chem>COc1ccc(NS(=O)(=O)c2cccc3ccccc23)cc1</chem>
CHEMBL599852	<chem>O=c1[nH]c2cccc(Oc3cccc(NS(=O)(=O)c4cccc5ccccc45)c3)c2[nH]1</chem>
CHEMBL3893240	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ccccc2)cc1)c1cccc2ccccc12</chem>
CHEMBL199081	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ccc(Cl)cc2O)c(Cl)c1)c1cccc2ccccc12</chem>
CHEMBL1385069	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc2[nH]c(O)nc2c1)c1ccc2ccccc2c1</chem>
CHEMBL424146	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc2c[nH]nc2c1)c1ccc(Cl)cc1</chem>
CHEMBL1408748	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc2[nH]c(O)nc2c1)c1ccc(Cl)cc1</chem>
CHEMBL464411	<chem>Cn1cc(/C=C/C(=O)NS(=O)(=O)c2ccc(Cl)cc2)c2c(Oc3ccc4ccccc4c3)ccccc21</chem>
CHEMBL1415438	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ncccn2)c(Cl)c1)c1ccc(Cl)cc1</chem>
CHEMBL592616	<chem>O=c1[nH]c2cccc(Oc3cccc(NS(=O)(=O)c4ccc(Cl)cc4)c3)c2[nH]1</chem>
CHEMBL200322	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ccc(Cl)cc2O)c(Cl)c1)c1ccc2ccccc2c1</chem>
CHEMBL3939189	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ccccc2)cc1)c1ccc(Cl)cc1</chem>
CHEMBL489649	<chem>O=c1[nH]c2nccc(Oc3ccc(NS(=O)(=O)c4ccc(Cl)cc4)cc3)c2[nH]1</chem>
CHEMBL3949750	<chem>NS(=O)(=O)c1ccc2[nH]c(-c3ccc(Oc4ccc5ccccc5c4)cc3)nc2c1</chem>
CHEMBL381594	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Cl)ccc2o1)c1ccc2ccccc2c1</chem>
CHEMBL1545899	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2ccccc2nc1Cl)c1ccc(F)cc1</chem>
CHEMBL1505397	<chem>O=S(=O)(Nc1cccc(Oc2ccc(Cl)cc2)n1)c1ccc(F)cc1</chem>

CHEMBL1335080	<chem>O=S(=O)(Nc1ccccc1Cl)c1ccc(F)cc1</chem>
CHEMBL459688	<chem>Cn1cc(/C=C/C(=O)NS(=O)(=O)c2ccc(F)cc2)c2c(Oc3ccc4ccccc4c3)cccc21</chem>
CHEMBL1304528	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ncccn2)c(Cl)c1)c1ccc(F)cc1</chem>
CHEMBL1328625	<chem>O=S(=O)(Nc1cnc2ccccc2c1)c1ccc(F)cc1</chem>
CHEMBL485300	<chem>O=c1[nH]c2nccc(Oc3ccc(NS(=O)(=O)c4ccc(F)cc4)cc3)c2[nH]1</chem>
CHEMBL3894632	<chem>O=S(=O)(Nc1ccc(Oc2ccccc2)cc1)c1ccc(F)cc1</chem>
CHEMBL3688181	<chem>N#Cc1ccc(Oc2ccc(S(=O)(=O)Nc3ccc(F)cn3)cc2Cl)cc1F</chem>
CHEMBL3401725	<chem>O=C(Nc1nc2ccccc2[nH]1)c1ccc(Cl)c(Cl)c1</chem>
CHEMBL1595582	<chem>COc1ccc(Cl)cc1C(=O)Nc1nc2ccccc2[nH]1</chem>
CHEMBL1420307	<chem>CSc1ccccc1C(=O)Nc1nc2ccccc2[nH]1</chem>
CHEMBL1511219	<chem>COc1cc(SC)ccc1C(=O)Nc1nc2ccccc2[nH]1</chem>
CHEMBL1459468	<chem>COc1ccccc1C(=O)Nc1nc2ccccc2[nH]1</chem>
CHEMBL3763630	<chem>O=C(Nc1nc2cc(Cl)c(F)cc2[nH]1)c1csc(NC(=O)c2ccccc2OC(F)(F)F)n1</chem>
CHEMBL3401715	<chem>O=C(Nc1nc2ccccc2[nH]1)c1ccccc1Cl</chem>
CHEMBL3401723	<chem>O=C(Nc1nc2ccccc2[nH]1)c1cc(Cl)ccc1Cl</chem>
CHEMBL486340	<chem>COc1ccc2nc(NC(=O)c3cc4c(cc3Cl)OCO4)[nH]c2c1</chem>

11.2 Anexo del modelado por homología

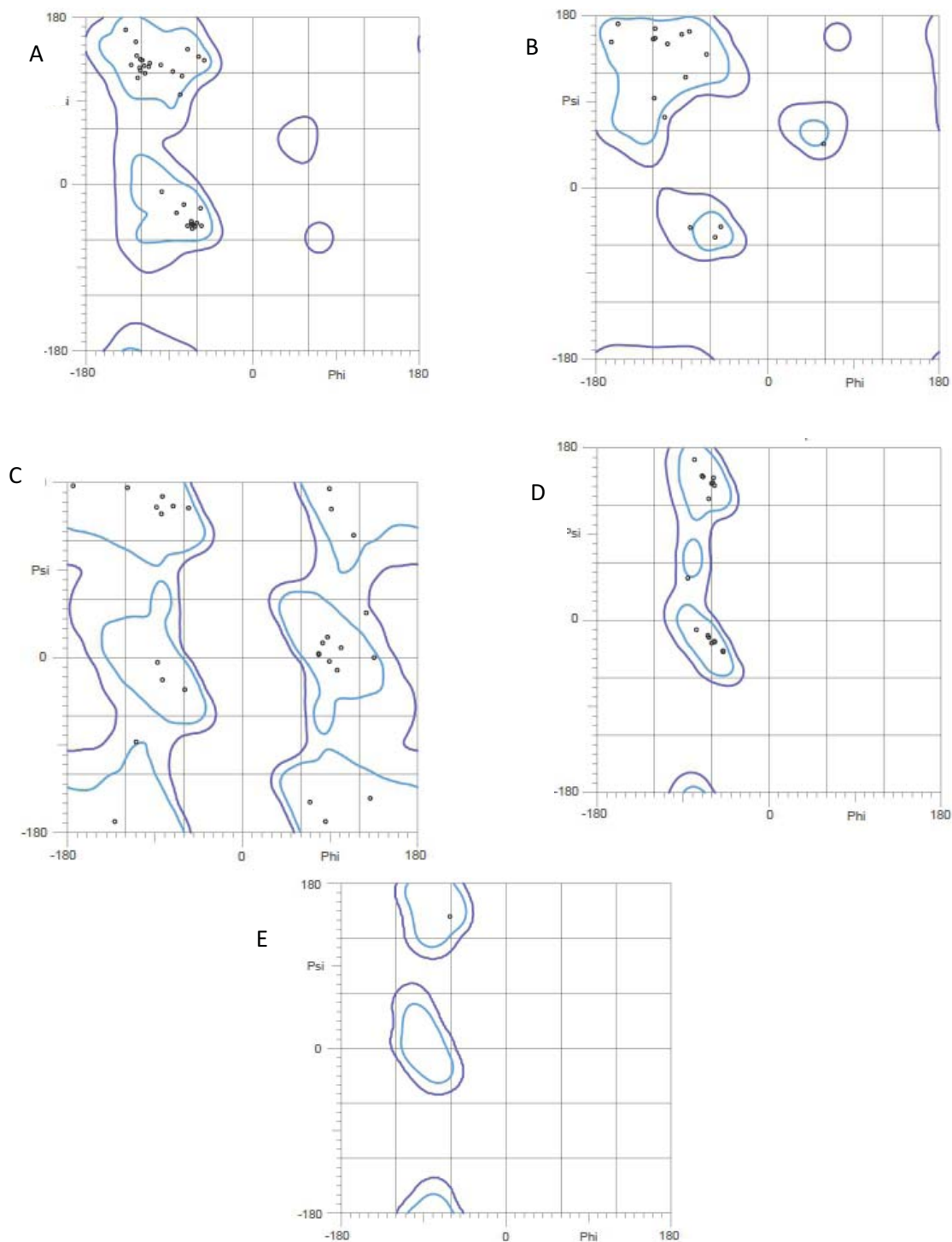


Figura 74. Diagramas de Ramachandran de la proteína DHODHLm modelada generados en Molprobit. Región delimitada en azul claro = zona favorecida; región delimitada en azul fuerte= zona permitida. A) Isoleucina/Leucina; B) Pre-prolina; C) Glicina; D) Trans-prolina; E) Cis-prolina.

11.3 Anexo del acoplamiento molecular consenso

Tabla 26. Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre GAPDHLm, así como energía de unión a GAPDHHs de los 25 derivados bencimidazólicos

Ligando	Energía de unión hacia GAPDHLm (kJ/mol)		Energía de unión hacia GAPDHHs (kJ/mol)		Coeficiente de selectividad en energía de unión	
	MOE	ATD4	MOE	ATD4	MOE	ATD4
1	-8.63	-4.25	-7.62	-4.28	1.13	0.99
2	-8.24	-4.94	-8.36	-4.03	0.98	1.22
3	-9.28	-5.26	-10.61	-5.13	0.87	1.02
4	-9.86	-5.11	-5.86	-4.80	1.68	1.06
5	-9.02	-5.01	-7.40	-5.64	1.22	0.89
6	-8.75	-4.67	-6.49	-4.31	1.35	1.08
7	-9.76	-5.04	-7.20	-4.51	1.35	1.12
8	-9.69	-4.92	-7.49	-4.41	1.29	1.11
9	-9.22	-4.93	-7.20	-3.97	1.28	1.24
10	-9.72	-4.90	-6.83	-5.72	1.42	0.86
11	-9.17	-4.37	-6.78	-5.10	1.35	0.86
12	-10.68	-4.60	-8.26	-4.54	1.29	1.01
13	-9.52	-5.64	-8.44	-4.41	1.13	1.28
14	-9.42	-5.14	-8.12	-4.94	1.16	1.04
15	-9.05	-6.43	-7.52	-6.31	1.20	1.02
16	-11.40	-5.80	-7.28	-5.35	1.57	1.08
17	-9.54	-5.31	-7.46	-4.91	1.28	1.08
18	-10.27	-5.81	-7.01	-5.57	1.46	1.04
19	-9.54	-5.86	-7.70	-6.91	1.24	0.85
20	-9.41	-5.38	-7.44	-6.25	1.26	0.86
21	-9.44	-5.70	-8.23	-5.74	1.15	0.99
22	-9.67	-5.48	-10.89	-4.85	0.89	1.13
23	-8.28	-6.57	-7.37	-7.06	1.12	0.93
24	-11.78	-6.81	-7.44	-6.69	1.58	1.02
25	-11.64	-6.64	-7.95	-7.94	1.46	0.84
NMD	-10.26	-8.22	-9.18	-8.86	1.12	0.93
TND	-10.53	-8.44	-8.24	-8.29	1.28	1.02
NAD⁺	-11.25	-9.30	-12.00	-7.70	NA	NA

Tabla 27. Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre 1,6-FBPALm, así como energía de unión a 1,6-FBPAHs de los 25 derivados bencimidazólicos

Ligando	Energía de unión hacia 1,6-FBPALm (kJ/mol)		Energía de unión hacia 1,6-FBPAHs (kJ/mol)		Coeficiente de selectividad en energía de unión	
	MOE	ATD4	MOE	ATD4	MOE	ATD4
1	-8.56	-4.59	-11.87	-5.03	0.72	0.91
2	-8.32	-4.45	-9.41	-4.71	0.88	0.94
3	-8.58	-4.96	-11.79	-5.23	0.73	0.95
4	-8.82	-4.87	-9.00	-4.65	0.98	1.05
5	-9.16	-4.61	-9.10	-4.39	1.01	1.05
6	-9.29	-4.26	-8.14	-4.38	1.14	0.97
7	-10.32	-4.50	-10.34	-4.29	1.00	1.05
8	-8.23	-4.29	-9.18	-4.09	0.89	1.05
9	-8.44	-4.56	-10.95	-4.81	0.77	0.95
10	-9.61	-4.68	-10.32	-4.97	0.93	0.94
11	-9.13	-3.96	-11.48	-3.97	0.79	1.00
12	-9.31	-4.38	-13.09	-4.33	0.71	1.01
13	-10.40	-5.06	-11.67	-4.74	0.89	1.07
14	-8.94	-4.91	-10.80	-5.15	0.83	0.95
15	-9.81	-5.36	-11.29	-5.27	0.87	1.02
16	-9.23	-5.06	-11.46	-4.17	0.80	1.21
17	-8.99	-4.72	-13.11	-3.81	0.68	1.24
18	-9.36	-5.46	-12.82	-4.66	0.73	1.17
19	-10.25	-5.55	-11.44	-5.64	0.89	0.98
20	-9.02	-5.32	-11.58	-5.39	0.78	0.99
21	-9.03	-4.99	-11.24	-4.66	0.80	1.07
22	-9.17	-4.80	-12.18	-4.88	0.75	0.98
23	-9.09	-6.75	-8.87	-6.32	1.02	1.07
24	-8.81	-6.48	-9.12	-6.76	0.97	0.96
25	-9.24	-6.52	-9.45	-7.69	0.98	0.85
1,6-MBP	-15.27	-7.27	-17.08	-7.67	0.89	0.95
1,6-FBP	-15.26	-7.37	-17.60	-9.04	0.87	0.81

Tabla 28. Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre PYK_{Lm}, así como energía de unión a PYK_{Hs} de los 25 derivados bencimidazólicos

Ligando	Energía de unión hacia PYK _{Lm} (kJ/mol)		Energía de unión hacia PYK _{Hs} (kJ/mol)		Coeficiente de selectividad en energía de unión	
	MOE	ATD4	MOE	ATD4	MOE	ATD4
1	-9.02	-4.32	-10.05	-3.87	0.90	1.12
2	-8.37	-4.15	-8.25	-4.09	1.01	1.01
3	-9.21	-4.33	-8.43	-4.11	1.09	1.05
4	-8.95	-4.23	-9.43	-4.18	0.95	1.01
5	-11.57	-5.05	-11.57	-4.02	1.00	1.26
6	-8.25	-4.86	-6.31	-3.78	1.31	1.28
7	-8.56	-4.35	-8.51	-3.96	1.00	1.10
8	-8.42	-3.71	-7.25	-4.09	1.16	0.91
9	-7.72	-3.43	-9.10	-3.43	0.85	1.00
10	-9.16	-4.39	-8.58	-3.79	1.07	1.16
11	-9.66	-3.62	-8.15	-3.46	1.18	1.05
12	-11.68	-3.33	-8.45	-3.16	1.38	1.05
13	-12.31	-4.08	-9.89	-4.27	1.24	0.95
14	-11.06	-3.69	-10.68	-4.57	1.04	0.81
15	-7.90	-4.32	-8.47	-4.90	0.93	0.88
16	-8.32	-3.83	-9.44	-4.10	0.88	0.93
17	-8.58	-3.94	-9.57	-4.16	0.90	0.95
18	-9.20	-3.56	-8.77	-4.77	1.05	0.75
19	-7.91	-4.85	-9.53	-5.09	0.83	0.95
20	-7.91	-4.73	-10.04	-5.07	0.79	0.93
21	-8.44	-4.13	-8.96	-4.75	0.94	0.87
22	-10.65	-3.51	-9.15	-3.90	1.16	0.90
23	-8.40	-5.23	-10.46	-5.79	0.80	0.90
24	-7.12	-5.09	-8.77	-5.99	0.81	0.85
25	-8.46	-4.94	-8.48	-5.75	1.00	0.86
L29	-8.60	-3.80	-7.42	-4.26	1.16	0.89
2,6-FBP	-20.33	- 8.76	NA	NA	NA	NA
1,6-FBP	NA	NA	-12.40	-8.65	NA	NA

Tabla 29. Energía de unión y coeficientes de selectividad sobre UBCE2Lm, así como energía de unión a UBCE2Hs de los 25 derivados bencimidazólicos

Ligando	Energía de unión hacia UBCE2Lm (kJ/mol)		Energía de unión hacia UBCE2Hs (kJ/mol)		Coeficiente de selectividad en energía de unión	
	MOE	ATD4	MOE	ATD4	MOE	ATD4
1	-9.79	-5.79	-9.87	-5.24	0.99	1.10
2	-9.37	-5.15	-8.36	-5.40	1.12	0.95
3	-10.67	-6.49	-9.05	-5.5	1.18	1.18
4	-10.03	-6.45	-8.33	-5.63	1.20	1.14
5	-8.67	-5.59	-9.34	-5.41	0.93	1.03
6	-8.87	-5.53	-9.59	-5.49	0.92	1.01
7	-9.79	-5.92	-10.53	-5.19	0.93	1.14
8	-9.10	-5.47	-8.91	-5.32	1.02	1.03
9	-9.85	-5.42	-9.79	-5.17	1.01	1.05
10	-10.45	-6.27	-9.15	-5.16	1.14	1.21
11	-9.99	-5.97	-9.59	-4.93	1.04	1.2
12	-10.42	-5.57	-9.98	-4.77	1.04	1.17
13	-11.87	-6.28	-9.83	-5.11	1.21	1.23
14	-9.50	-5.90	-9.60	-5.33	0.99	1.11
15	-10.42	-6.66	-9.41	-5.72	1.11	1.16
16	-10.19	-6.05	-9.64	-5.48	1.06	1.10
17	-10.28	-6.15	-10.12	-4.99	1.01	1.23
18	-11.18	-6.54	-10.55	-5.65	1.06	1.16
19	-10.34	-6.92	-10.28	-6.05	1.00	1.14
20	-10.57	-6.66	-9.55	-5.99	1.11	1.11
21	-9.66	-6.13	-9.68	-5.46	1.00	1.12
22	-9.57	-6.07	-10.11	-5.23	0.95	1.16
23	-10.62	-7.76	-10.44	-7.81	1.02	0.99
24	-10.19	-7.85	-10.39	-7.88	0.98	1.00
25	-10.44	-7.46	-9.45	-7.06	1.10	1.06
NSC697923	-8.77	-3.26	-7.67	-3.78	1.14	0.86
BAY 11-7082	-6.78	-3.14	-6.83	-2.95	0.99	1.06

11.4 Anexo de la dinámica molecular

Tabla 30. Valores de energía del ligando 3 en presencia de la DHODHLM (modelos para generación de energía: SASA= Área superficial accesible al disolvente; SAV= Área superficial por volumen; WCA= Esquema de descomposición Weeks–Chandler–Andersen)

Tipo de energía	Valor
Van der Waals	-133.949 ± 11.075 kJ/mol
Electrostáticas	-179.333 ± 27.962 kJ/mol
Solvatación polar	212.167 ± 30.770 kJ/mol
SASA	-14.762 ± 0.913 kJ/mol
SAV	0.000 ± 0.000 kJ/mol
WCA	0.000 ± 0.000 kJ/mol
Energía de unión	-115.876 ± 21.057 kJ/mol

Tabla 31. Valores de energía del ligando19 en presencia de la DHODHLM (modelos para generación de energía: SASA= Área superficial accesible al disolvente; SAV= Área superficial por volumen; WCA= Esquema de descomposición Weeks–Chandler–Andersen)

Tipo de energía	Valor
Van der Waals	-145.932 ± 12.531 kJ/mol
Electrostáticas	-36.048 ± 12.165 kJ/mol
Solvatación polar	113.847 ± 22.853 kJ/mol
SASA	-16.632 ± 1.349 kJ/mol
SAV	0.000 ± 0.000 kJ/mol
WCA	0.000 ± 0.000 kJ/mol
Energía de unión	-84.766 ± 19.474 kJ/mol

11.5 Anexo del DIFAC

Tabla 32. Energías de unión a la DHODHLm y DHODHHs, así como coeficientes de selectividad de los 71 compuestos obtenidos por DIFAC después de los filtros (regla de los cinco de Lipinski y presencia de núcleo de bencimidazol)

Ligando (DIFAC)	Energía de unión hacia DHODHLm (kJ/mol)	Ranking Energía de unión hacia DHODHLm	Energía de unión hacia DHODHHs (kJ/mol)	Coefficiente de selectividad de energía de unión	Ranking de coeficiente de selectividad
1	-16.04	54	-10.85	1.48	66
2	-16.30	44	-9.55	1.71	43
3	-15.40	67	-10.19	1.51	65
4	-15.77	61	-9.60	1.64	55
5	-17.38	12	-9.33	1.86	3
6	-15.39	68	-10.41	1.48	67
7	-16.27	46	-9.46	1.72	39
8	-16.32	41	-9.92	1.64	54
9	-16.30	43	-8.90	1.83	9
10	-16.38	39	-9.32	1.76	25
11	-15.93	57	-9.31	1.71	41
12	-16.29	45	-9.19	1.77	21
13	-16.06	53	-9.62	1.67	49
14	-15.36	69	-9.73	1.58	60
15	-16.24	47	-10.53	1.54	62
16	-16.07	52	-10.54	1.52	64
17	-17.67	7	-10.67	1.66	50
18	-17.40	11	-10.52	1.65	51
19	-17.68	6	-10.42	1.70	45
20	-16.42	35	-11.17	1.47	68
21	-16.93	23	-11.02	1.53	63
22	-16.01	55	-10.22	1.57	61
23	-16.00	56	-11.50	1.39	71
24	-17.12	21	-9.45	1.81	12
25	-17.33	13	-9.45	1.83	8
26	-16.56	31	-9.26	1.79	16
27	-15.91	58	-9.18	1.73	34
28	-16.81	27	-9.64	1.74	31

29	-15.74	62	-9.10	1.73	35
30	-16.60	30	-9.47	1.75	28
31	-15.62	63	-9.07	1.72	37
32	-17.69	5	-9.57	1.85	5
33	-15.57	64	-9.43	1.65	53
34	-16.52	33	-9.23	1.79	14
35	-16.91	25	-10.65	1.59	59
36	-17.25	15	-9.71	1.78	18
37	-17.33	14	-9.25	1.87	2
38	-16.54	32	-11.82	1.40	70
39	-15.36	70	-9.38	1.64	56
50	-16.70	29	-9.77	1.71	42
41	-17.15	19	-9.28	1.85	6
42	-16.40	38	-9.25	1.77	20
43	-16.18	48	-9.68	1.67	48
44	-15.90	59	-10.00	1.59	58
45	-17.56	9	-9.94	1.76	23
46	-15.55	65	-9.01	1.73	36
47	-16.32	42	-9.23	1.77	22
48	-16.09	51	-9.45	1.70	44
49	-17.8794	3	-9.67	1.85	4
50	-16.8007	28	-9.62	1.75	30
51	-16.1524	49	-9.96	1.62	57
52	-16.4119	37	-9.38	1.75	29
53	-17.4569	10	-9.51	1.84	7
54	-16.1187	50	-9.62	1.67	47
55	-15.4584	66	-9.35	1.65	52
56	-17.1457	20	-9.73	1.76	24
57	-16.4147	36	-9.59	1.71	40
58	-16.9506	22	-9.65	1.75	27
59	-17.2182	18	-9.53	1.81	13
60	-18.1224	2	-9.66	1.88	1
61	-16.833	26	-9.58	1.76	26
62	-17.7131	4	-9.74	1.82	11
63	-17.5845	8	-9.85	1.78	17
64	-16.3689	40	-9.40	1.74	32
65	-17.2214	17	-12.00	1.43	69

66	-15.3172	71	-8.56	1.79	15
67	-16.9126	24	-9.83	1.72	38
68	-15.8139	60	-9.12	1.73	33
69	-16.4509	34	-8.99	1.83	10
70	-17.2317	16	-9.72	1.77	19
71	-18.7262	1	-11.08	1.69	46

Tabla 33. Los 71 ligandos obtenidos por medio del DIFAC y después de los filtros, junto con su SMILE

Ligando	SMILE
1	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5c[nH]cc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
2	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cc[nH]c5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
3	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5c[nH]cc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
4	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4c[nH]c5ccccc45)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
5	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4[nH]cc5ccccc45)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
6	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cc5ccccc5[nH]4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
7	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5[nH]ccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
8	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cc[nH]c5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
9	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4[nH]cc5ccccc45)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
10	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cc5ccccc5[nH]4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
11	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cc[nH]c5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
12	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4c[nH]c5ccccc45)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
13	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4[nH]cc5ccccc45)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
14	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4c[nH]c5ccccc45)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
15	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3ccc4ccccc4c3)c(Cl)cc2[nH]1)c1ccc(O)[nH]1</chem>
16	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3cc4ccccc4[nH]3)c(Cl)cc2[nH]1)c1ccc(O)cc1</chem>

17	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3c[nH]c4cccc34)c(Cl)cc2[nH]1)c1ccc(O)cc1</chem>
18	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3ccc4[nH]ccc4c3)c(Cl)cc2[nH]1)c1ccc(O)cc1</chem>
19	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3ccc4cc[nH]c4c3)c(Cl)cc2[nH]1)c1ccc(O)cc1</chem>
20	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3ccc4cccc4c3)c(Cl)cc2[nH]1)c1c[nH]c(O)c1</chem>
21	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3ccc4cccc4c3)c(Cl)cc2[nH]1)c1cc(O)c[nH]1</chem>
22	<chem>O=S(=O)(Nc1nc2cc(Oc3ccc4c[nH]cc4c3)c(Cl)cc2[nH]1)c1ccc(O)cc1</chem>
23	<chem>Cc1cnc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
24	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5[nH]ccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cn1</chem>
25	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccncc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
26	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cnccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
27	<chem>Cc1ncc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
28	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5nccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
29	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccncc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
30	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cc5cccc5cn4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
31	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cnc5cccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
32	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccncc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
33	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cc5cccc5cn4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
34	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccncc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
35	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cnccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
36	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4c[nH]c5cccc45)c(Cl)cc3[nH]2)cn1</chem>
37	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4[nH]cc5cccc45)c(Cl)cc3[nH]2)cn1</chem>
38	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cc5cccc5[nH]4)c(Cl)cc3[nH]2)cn1</chem>
39	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cc5cccc5cn4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>

50	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ncccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
41	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cccnc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
42	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ncccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
43	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cccnc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
44	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccccc5n4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
45	<chem>Cc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)n[nH]1</chem>
46	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
47	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4c[nH]c5cccc45)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
48	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5[nH]ccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
49	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cc[nH]c5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
50	<chem>Nc1cc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
51	<chem>Nc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>
52	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5c[nH]cc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
53	<chem>N=c1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c[nH]1</chem>
54	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)nc1</chem>
55	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cc5ccccc5cn4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
56	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4cnc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
57	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5ncccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
58	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cccnc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
59	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cnccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
60	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Oc4ccc5cnccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
61	<chem>Cc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc([S@@](=O)c4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)[nH]1</chem>
62	<chem>Cc1c[nH]c(S(=O)(=O)Nc2nc3cc([S@@](=O)c4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)c1</chem>

63	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc([S@@](=O)c4ccc5ccccc5c4)c(Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>
64	<chem>COc1cc2nc(NS(=O)(=O)c3ccc(C)[nH]3)[nH]c2cc1Oc1ccc2ccccc2c1</chem>
65	<chem>CNc1cc2nc(NS(=O)(=O)c3ccc(C)[nH]3)[nH]c2cc1Oc1ccc2ccccc2c1</chem>
66	<chem>CNc1cc2nc(NS(=O)(=O)c3cc(C)c[nH]3)[nH]c2cc1Oc1ccc2ccccc2c1</chem>
67	<chem>Cn1c(=NS(=O)(=O)c2ccc(N)cc2)[nH]c2cc(Cl)c(Oc3ccc4ccccc4c3)cc21</chem>
68	<chem>CNc1cc2nc(NS(=O)(=O)c3ccc(N)cc3)[nH]c2cc1Oc1ccc2ccccc2c1</chem>
69	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Cl)c(Oc4cccc(Cl)c4Cl)cc3[nH]2)cn1</chem>
70	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Cl)c(Oc4cccc(Cl)c4Cl)cc3[nH]2)cn1</chem>
71	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc3cc(Cl)c(Oc4cccc(O)c4Cl)cc3[nH]2)cc1</chem>