



Búsqueda de moléculas con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer mediante análisis de Virtual Screening.

Ivan Ellson Lancho

Máster en Bioinformática y Bioestadística

Área 1. Subárea 3: Bioinformática farmacéutica.

Melchor Sánchez Martínez

Maria Jesús Marco Galindo

2 de enero de 2019



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Búsqueda de moléculas con potencial terapéutico para la enfermedad de Alzheimer mediante análisis de Virtual Screening.</i>
Nombre del autor:	<i>Ivan Ellson Lancho</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Melchor Sánchez Martínez</i>
Nombre del PRA:	<i>Maria Jesús Marco Galindo</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	01/2019
Titulación:	Máster en Bioinformática y Bioestadística
Área del Trabajo Final:	<i>Área 1. Subárea 3: Bioinformática farmacéutica.</i>
Idioma del trabajo:	<i>Español</i>
Palabras clave	<i>Alzheimer, Virtual Screening, Small Molecule</i>
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras):	
<p>La enfermedad de Alzheimer (AD) es el trastorno neurodegenerativo con mayor repercusión a nivel global. Tradicionalmente, la investigación en AD se ha basado en las hipótesis tau y β-amiloide, pero su patología es compleja y de carácter multifactorial. Por ello proponemos estudiar dos rutas alternativas relacionadas con el AD: la ruta de leucotrienos y la neuroinflamación mediada por el inflammasoma NLRP3. Para ello hemos escogido cuatro <i>targets</i> asociados al AD: 5-Lipooxigenasa y Leucotrieno-C₄ Sintasa para la ruta de leucotrienos, y la Catepsina B y la proteína MyD88 para la ruta del inflammasoma. Nuestra hipótesis era que, tras un análisis de <i>virtual screening</i>, las moléculas encontradas presentarían características que las validaran como potenciales inhibidores de los <i>targets</i> escogidos. Para ello realizamos un <i>virtual screening</i> basado en <i>docking</i> con una librería de ligandos "<i>drug-like</i>". Los mejores resultados fueron comprobados visualmente y comparados con inhibidores conocidos. Posteriormente se realizó un ligero análisis de propiedades para comprobar si atravesaban el Sistema Nervioso Central y la barrera hematoencefálica. Nuestros resultados mostraron que, además de inhibir potencialmente los <i>targets</i> escogidos, algunas presentaban inhibición <i>multitarget</i>. Las moléculas resultantes fueron dos estereoisómeros de R428, Lumacaftor, Venetoclax, Proscillaridin (ZINC118915483), Dihidroergotamina, RAF265 y Ditercalinium. Concluimos que todas las moléculas encontradas presentaban buenas características inhibitoras, aunque algunas no atravesaban pasivamente el CNS y la barrera hematoencefálica. De cara al futuro, pensamos que el desarrollo de fármacos partiendo de estos inhibidores y mejorando, en algunos casos, sus propiedades de distribución, podría ofrecer una terapia efectiva para el AD.</p>	

Abstract (in English, 250 words or less):

Alzheimer's disease (AD) is the leading neurodegenerative disorder worldwide. Traditionally, research in AD has been based on tau and β -amyloid hypothesis, but its pathology is complex and has a multifactorial nature. Therefore, here we propose to study two alternative paths related to AD: the leukotriene path and the neuroinflammation by the NLRP3 inflammasome. To do so, we chose four AD-related targets: 5-Lipoxygenase and Leukotriene-C4 Synthase for the leukotriene path, and Cathepsin B and MyD88 protein for the inflammasome path. We hypothesized that, after virtual screening analysis, the molecules found will show potential inhibitory features on the chosen targets. In order to do this, we conducted a docking based virtual screening analysis using a drug-like compound library. The best results were visually checked and compared with actual inhibitors and then we performed the analysis of some molecule properties to check if they could cross the central nervous system (CNS) and the blood-brain barrier (BBB). After virtual screening, we obtained six molecules for each target: R428 for 5-Lox, Lumacaftor for LTC4S, Venetoclax for Cathepsin B, and ZINC118915483, Dihydroergotamine and RAF265 for MyD88 binding sites 1 to 3, respectively. We concluded that all the molecules showed good inhibitory features, although some of them couldn't cross the CNS and BBB by passive transport. Looking forward, we think that these inhibitors are good candidates for future drug design processes, including further improvement of their distribution properties in some cases, in order to become an effective therapy for AD.

Índice

Introducción.....	1
Materiales y métodos.....	3
Resultados y discusión.....	7
Conclusiones	19
Glosario	20
Bibliografía.....	21
Anexos	26

Lista de figuras

Figura 1	7
Figura 2	9
Figura 3	10
Figura 4	12
Tabla 1	13
Figura 5	14
Figura 6	15
Figura 7	16
Figura 8	16
Tabla 2	18

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el trastorno neurodegenerativo con mayor repercusión en la población a nivel global. Es el tipo de demencia más extendido, representando un 60-80% de todos los casos de demencia (1) y se caracteriza por la pérdida progresiva de las capacidades cognitivas y de la memoria. En el año 2015, 46,8 millones de personas en el mundo padecían la enfermedad de Alzheimer o demencias similares (2), sin embargo, la prevalencia está en aumento y para el año 2050 se estima que más de 115 millones de personas tendrán la enfermedad (3).

La enfermedad de Alzheimer se clasifica en dos tipos. Por un lado, el hereditario, cuya causa es una mutación en el gen de la APP, la proteína precursora amiloide, y por otro lado el AD esporádico, que se manifiesta mayoritariamente en personas de edad avanzada y cuya causa sigue siendo desconocida. Este segundo tipo constituye aproximadamente un 99% de los casos de AD (4).

En cuanto a la fisiología del AD, se ha observado que la patología está relacionada con la acumulación en el cerebro de placas extracelulares formadas por péptidos β -Amiloide ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares intracelulares formados por la proteína tau hiperfosforilada, normalmente asociada a microtúbulos (5–7). Gracias a estas observaciones surgió la "hipótesis amiloide", según la cual la acumulación de placas $A\beta$ es la responsable de la cascada de reacciones que acaban produciendo la muerte de células neuronales entre otros efectos adversos (6). Otras hipótesis han aparecido en los últimos años, como la "hipótesis tau", que apunta a la proteína tau como origen de la enfermedad (7). Estas hipótesis han sido la base principal de la investigación del AD en las últimas décadas, sin embargo el modelo de funcionamiento del AD ha demostrado ser mucho más complejo y sigue sin entenderse, por lo que los tratamientos basados directamente en estas rutas como causa primera del AD no han resultado efectivos (8). Los últimos estudios apoyan un tratamiento multifactorial del AD, por lo que se requieren nuevos enfoques o *targets* en la investigación de esta enfermedad para avanzar en su entendimiento.

Además, la patología del AD es compleja y variada, incluyendo la muerte neuronal, neuroinflamación, destrucción de la barrera hematoencefálica o alteración de la neurogénesis, entre otros aspectos. Esto dificulta enormemente su tratamiento y otorga gran importancia a una terapia basada en varios *targets*(9).

Por ello, en este estudio proponemos investigar dos importantes rutas alternativas propuestas en los últimos años como *target* frente al AD, con el objetivo de afrontar esta variedad de aspectos patológicos desde un punto de vista farmacológico.

La ruta de los leucotrienos:

Se puede decir que la ruta comienza con el ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado que se forma a partir de fosfolípidos gracias a la fosfolipasa 2. El ácido araquidónico es transformado en varios compuestos, entre ellos en leucotrieno A_4 (LTA_4) gracias a la enzima 5-lipooxigenasa (5-Lox), que para funcionar necesita unirse a

una proteína activadora llamada FLAP (5-lipoxygenase activating protein). Posteriormente el LTA₄ es transformado en leucotrieno B₄ (LTB₄) por la LTA₄ Hidrolasa o en leucotrieno C₄ (LTC₄) mediante la unión de glutatión reducido gracias a la LTC₄ Sintasa. El LTC₄ se exporta fuera de la célula y puede formar leucotrienos D₄ (LTD₄) y leucotrienos E₄ (LTE₄) por hidrólisis de aminoácidos sucesivamente. Estos últimos tres leucotrienos forman el grupo de los llamados cisteinil leucotrienos (CysLT), esenciales en los procesos de inflamación (10). Los CysLT se producen principalmente en los leucocitos, pero también se ha descubierto que pueden producirse en los astrocitos e intervienen en las reacciones de inflamación en diversas partes del sistema nervioso (11). Además, también se ha observado una mayor expresión de los receptores de los CysLT (CysLTR₁ y CysLTR₂) en cerebros patológicos frente a sanos (12,13).

Recientemente se ha observado un aumento de 5-Lox en cerebros con AD (14), así como una reducción de la acumulación de A β al inhibir esta enzima (15). Así mismo se ha observado que la inhibición del activador de 5-Lox, FLAP, provoca también una mejora en la patología A β (16). Estos descubrimientos parecen indicar que la ruta de leucotrienos tiene un papel importante en el AD.

Además, nuevos estudios indican que la inhibición de esta ruta permite no solo reducir la acumulación de A β y la neuroinflamación, sino también reducir la fosforilación de tau, mejorar la supervivencia neuronal y la neurogénesis o mantener la integridad sináptica y de la barrera hematoencefálica (17). Por ello, en este estudio, hemos decidido utilizar esta ruta como punto de intervención terapéutica frente al AD, en concreto hemos decidido buscar inhibidores para dos de las enzimas que intervienen en esta ruta: 5-Lox y LTC₄ Sintasa.

Ya existen fármacos inhibidores de la 5-Lipooxigenasa, como el Zileuton, un fármaco aprobado por la FDA (*United States Food and Drug Administration*) para tratar el asma (18), sin embargo ninguno de ellos ha sido aprobado aún para su uso en pacientes humanos con AD y, dado que se trata de un *target* muy prometedor, es necesario continuar la búsqueda de inhibidores alternativos.

También hemos decidido utilizar la LTC₄ Sintasa como *target* en este estudio, dada su importancia en la ruta de los leucotrienos y que apenas existen inhibidores disponibles para esta proteína.

Neuroinflamación e inflammasoma NLRP3:

La inflamación es un proceso beneficioso que ocurre en respuesta a infecciones o agresiones del medio y está mediada por el sistema inmune. Sin embargo los procesos de inflamación excesiva o crónica pueden resultar dañinos o contribuir a la enfermedad. Este es el caso del AD, donde la neuroinflamación juega un papel importante. La respuesta inmune en el cerebro, responsable de la neuroinflamación, está mediada principalmente por la microglía y los astrocitos. En general, las respuestas inflamatorias están reguladas por moléculas señalizadoras llamadas citoquinas, siendo la más importante la interleucina-1 β (IL-1 β). Se ha demostrado en varias ocasiones la importancia de la IL-1 β en la neuroinflamación del AD (19,20). Esta IL-1 β tiene una precursora inactiva, la proIL-1 β , cuya expresión es inducida por receptores Toll-Like (TLR) (21). Todos los TLR excepto TLR3 (22) interactúan con una proteína denominada

MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88). Se ha demostrado que la deficiencia de esta proteína MyD88 reduce la patogénesis de AD, por lo que en este estudio hemos elegido esta proteína como *target*, ya que su inhibición farmacológica puede resultar de gran utilidad en futuras investigaciones.

Además de este punto de control en su expresión, la IL-1 β presenta otro nivel de regulación. Y es que para pasar de proIL-1 β a su forma activa IL-1 β necesita la intervención de la enzima caspasa-1. Esta caspasa-1 a su vez deriva de la procaspasa-1, cuya activación se produce gracias a un complejo proteico que recibe el nombre de inflammasoma. Existen varios tipos de inflamasomas, siendo el más importante en inflammasoma NLRP3. Aunque aún no se conoce completamente el mecanismo de funcionamiento y activación de NLRP3, se sabe que este inflammasoma está relacionado con el AD (23). Se ha demostrado que NLRP3 se activa por la presencia de los depósitos A β propios de AD (24) y también que la inhibición de NLRP3 produce una reducción en la neuroinflamación patológica de AD (25).

Se sabe que el NLRP3 es activado en el citoplasma por la enzima catepsina B, y que la inhibición de esta enzima produce una mejora en la memoria y favorece la reducción de A β en modelos de ratón mutantes para AD (26). Sin embargo, existe cierto debate en cuanto a los beneficios de inhibir esta enzima (27). La introducción de nuevos inhibidores podría ayudar a resolver el debate en relación a esta enzima y el AD, por lo que hemos decidido incluirla en este estudio como *target*.

El objetivo de este estudio es encontrar *small molecules* que sirvan como potenciales inhibidores de los *targets* seleccionados. Para ello realizaremos un análisis de *virtual screening* y posteriores comprobaciones de los resultados, con lo que pretendemos obtener una serie de ligandos que se unan a los receptores elegidos. Nuestra hipótesis es que los ligandos encontrados tendrán, potencialmente, la capacidad de inhibir los *targets* seleccionados al presentar características para ello, sirviendo como punto de partida para continuar el proceso de diseño de fármacos para combatir el AD.

Materiales y métodos

Para cada proteína *target* se realizó un análisis por *virtual screening* basado en *docking* molecular. El *docking* es una técnica computacional que permite predecir la orientación tridimensional de un ligando cuando forma un complejo estable con una macromolécula receptora (28). Este tipo de *virtual screening* realiza el proceso de *docking* para cada ligando de una librería de moléculas seleccionada, estimando los valores de energía libre resultantes de cada complejo de unión ligando-receptor.

El procedimiento se realizó mediante la herramienta MTiOpenScreen (29) del servidor web del RPBS (*Ressource Parisienne en BioInformatique Structurale*)(30,31). Esta herramienta utiliza el software AutoDock Vina (32) para realizar los cálculos de *docking*. El algoritmo que utiliza AutoDock Vina se basa en un método de optimización de gradientes que lo convierte en uno de los softwares de *docking* más eficaces actualmente (33,34). Para su funcionamiento, el programa únicamente necesita recibir los datos del centro y las dimensiones del sitio de búsqueda, una zona dentro de la proteína *target* que abarca la cavidad catalítica. Esta zona recibe el nombre de caja de

búsqueda y en ella se situarán los ligandos con la conformación más estable posible según su estructura. Estos ligandos son flexibles y tienen capacidad de rotación en ciertos átomos, a diferencia de la macromolécula, que permanece estática en todos los cálculos de *docking* realizados con este software. La herramienta MTiOpenScreen también ofrece la posibilidad de estimar la caja de búsqueda automáticamente a partir de una serie de residuos de la macromolécula, que debemos indicar. Por defecto, MTiOpenScreen asigna algunos parámetros predefinidos a AutoDock Vina, como una resolución de la caja de búsqueda de 1Å, la estimación de 10 modos de unión para cada ligando y una exhaustividad de 8 (tiempo dedicado a la búsqueda de la mejor orientación para cada ligando, relacionado linealmente con su número de átomos). Para la obtención de los resultados, AutoDock Vina utiliza un algoritmo de puntuación que se basa en la predicción de la afinidad de unión expresada en kcal/mol (energía de unión).

Para este Screening se eligió la librería de ligandos Drugs-lib, disponible en el propio servidor de MTiOpenScreen. Esta librería contiene una colección de fármacos aprobados y disponibles comercialmente. Se trata de una librería previamente filtrada a partir de un conjunto de compuestos procedentes de cuatro bases de datos: los fármacos disponibles en la base de datos ChEMBL (35), el grupo de "*approved drugs*" de la base de datos DrugBank (36) (versión 5.0.10), la base de datos del DrugCentral Online Compendium (37) y el grupo "*approved*" de la base de datos SuperDrug2 (38) (versión 2.0). En total se recolectaron 21276 compuestos, que fueron sometidos a varios filtros hasta obtener una librería de 7173 ligandos, optimizados para estudios de *virtual screening* basado en estructura. Para este filtraje se aplicaron los protocolos indicados en Lagarde *et al.*, 2018 (39) que incluyen la eliminación de duplicados, la eliminación de compuestos no preparados para *docking*, la eliminación de subestructuras indeseadas, la búsqueda de estereoisómeros para cada compuesto en la base de datos ZINC15 (40) o la generación de estructuras 3D cuando fuera necesario. Para realizar estos filtrajes se utilizó además la herramienta FAF-Drugs4 (Free ADME-Tox Filtering) (41), que permitió eliminar las sales, mezclas inorgánicas o isótopos, así como la eliminación de compuestos con toxicóforos o PAINS (Pan Assay Interference Compounds). También se utilizó esta herramienta para filtrar los compuestos por sus propiedades físico-químicas, eliminando aquellos con un peso molecular inferior a 100 o superior a 1000, con más de 20 uniones rotatorias o con menos de 5 átomos pesados. El número total de 7173 ligandos utilizados de Drugs-lib corresponden a los estereoisómeros de 4574 isómeros resultantes.

Además de la selección de la librería de ligandos, para realizar cada análisis de *virtual screening* se utilizaron las estructuras tridimensionales de los *targets* disponibles en la base de datos del RCSB Protein Data Bank (PDB) (42). Se realizaron varios *virtual screenings*, uno por cada proteína *target* elegida, con la excepción de la proteína MyD88, que necesitó 3 análisis de *virtual screening*, uno por cada sitio de unión.

Virtual screening para la 5-Lipooxigenasa

Para el análisis de la enzima 5-Lox, se decidió utilizar la estructura correspondiente a su conformación al unirse al ácido araquidónico (PDB id: 3V99 (43)). Para la preparación de esta proteína, que presenta una estructura de doble cadena, se decidió utilizar el

ensamblaje biológico 1 disponible en el PDB, eliminando así la cadena B de la unidad asimétrica y manteniendo la cadena A, que es la que presenta interacción con el ácido araquidónico en el PDB. Tras obtener la estructura se localizó el sitio de unión del ácido araquidónico en la proteína. Para situar el centro de la caja de búsqueda para el análisis de *virtual screening*, se decidió utilizar las coordenadas del átomo central de la molécula de ácido araquidónico. Posteriormente se eliminó el ácido araquidónico, así como las moléculas de agua y demás solventes del archivo PDB. Para realizar estas modificaciones se utilizó el software PyMol (versión 2.2; Schrödinger, LLC.).

Tras preparar la molécula se realizó el análisis de *virtual screening*, utilizando como centro de la caja de búsqueda las coordenadas $x = 17.36$, $y = -78.5$, $z = -34.65$ y un tamaño de la zona de búsqueda de $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ en los ejes x , y , z , conteniendo en su interior la cavidad de unión del ácido araquidónico. Como resultado se obtuvo una lista de 4500 *small molecules* provenientes de la librería Drugs-lib, que se ordenaron de menor a mayor energía de unión.

Virtual screening para la LTC₄ Sintasa

Se descargó la estructura cristalizada de la LTC₄ Sintasa del PDB (PDB id: 2PNO (44)), concretamente se utilizó el ensamblaje biológico 1, correspondiente a una unidad trimérica con tres cadenas A, B y C de la proteína, conformación activa que adquiere al situarse en su posición transmembrana (45). Para seleccionar las coordenadas de la caja de búsqueda para el *screening*, se decidió buscar el sitio de unión al que se acoplaban inhibidores conocidos. Se encontró una serie de inhibidores (46) que se acoplaban al sitio de unión de la zona citoplasmática de la macromolécula, en el bolsillo formado por la unión de dos cadenas adyacentes. Estos inhibidores, que ya se habían comprobado *in vitro* e *in vivo* en ratones, establecían interacciones con residuos de ambas cadenas adyacentes (cadenas A y C en este caso). En nuestro estudio utilizamos los residuos de este sitio de unión para determinar automáticamente la zona de búsqueda en MTiOpenScreen. Los residuos utilizados fueron ARG-31 y SER-36 de la cadena A y ARG-104 y LEU-108 de la cadena C.

Virtual screening para la Catepsina B

Para el *screening* de la Catepsina B, se utilizó la estructura disponible en el PDB de esta proteína al unirse a la nitroxolina (PDB id: 3A18 (47)) y se realizó un proceso similar al *screening* de la 5-Lox. A partir de la estructura descargada del PDB, que presentaba dos cadenas similares, se utilizó PyMol 2.2 para eliminar la cadena B y los solventes, manteniendo la A. Después se calcularon las coordenadas del átomo central del inhibidor ya presente, la nitroxolina, y se utilizaron estas coordenadas ($x = -7.78$, $y = -8.68$, $z = 0.72$) para situar el centro de una caja de búsqueda con un tamaño de $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ que mantuviera en su interior la cavidad de unión de la nitroxolina.

Virtual screening para la proteína MyD88

Por último, para el *screening* de MyD88 se utilizó la estructura del dominio TIR de esta proteína disponible en el PDB (PDB id: 2Z5V (48)). Este dominio TIR (Toll/Interleucina-1 Receptor) se une a otros dominios TIR presentes en TLRs (Toll-Like Receptors), iniciando

la ruta de transducción de señal que desemboca en la respuesta inmune y en un aumento de la neuroinflamación en AD. MyD88 es esencial para la señalización de estos TLRs, entre los que destaca TLR4, un receptor ampliamente estudiado cuya señalización estimula la activación de la glía en la respuesta inmune (49). Además, se ha demostrado la relación de TLR4 con el AD (50), por ello decidimos buscar inhibidores para el dominio TIR de MyD88, enfocándonos especialmente en inhibir su correcta unión con TLR4. Sin embargo, se ha demostrado que MyD88 presenta 3 sitios de unión en su dominio TIR importantes para la señalización de TLR4 (48). La unión de los dominios TIR de TLR4 y MyD88 se produce a través de una proteína Mal (MyD88 Adaptor Like) (51), que interactúa con los sitios de unión 2 y 3 de MyD88-TIR (48). El mecanismo de unión al sitio 1 no está claro, pero se ha demostrado su importancia en la respuesta celular de TLR4 (52). Por ello en este estudio hemos decidido buscar inhibidores para estos 3 sitios de unión, realizando un análisis de *virtual screening* por cada sitio. Para cada *screening*, las coordenadas de la caja de búsqueda se estimaron automáticamente a partir de los principales residuos en MTiOpenScreen. Para el sitio 1 se utilizó la Arginina-217, para el sitio 2 la Arginina-196 y el Aspartato-197, y para el sitio 3 la Lisina-282 y la Arginina-228.

Con cada análisis de *virtual screening*, se obtuvo un archivo con la información de la energía de unión y el número de uniones rotatorias de cada ligando, así como el nombre de la molécula y su código de identificación para la base de datos ZINC (información mostrada parcialmente en Anexos). También se obtuvo un archivo con las conformaciones tridimensionales de cada ligando y su orientación tras el *docking*. Se utilizó el software OpenBabel (versión 2.4.1) (53) para dividir este archivo en archivos PDB, uno para cada ligando. Posteriormente se utilizó PyMol 2.2 para superponer los 10 mejores ligandos a la estructura PDB del receptor utilizado. Esto permitió realizar una comprobación visual de la unión ligando-receptor, confirmando que todos los ligandos se situaban en el sitio de unión elegido. Después, se utilizó el software PyMol 2.2 para encontrar contactos polares entre los átomos de los 10 primeros ligandos de cada *screening* y los residuos cercanos del receptor.

Con la intención de comprobar los resultados se observaron las uniones ligando-receptor del complejo 5-Lox con ácido araquidónico y del complejo Catepsina B con nitroxolina. Para ello se utilizó la herramienta web PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler) (54) y como comprobación también se observaron los contactos polares estimados por PyMol 2.2. Para la observación de estos enlaces en la LTC₄ Sintasa y la proteína MyD88 se utilizó la información bibliográfica disponible (46,48).

Por último, se decidió realizar un análisis de las propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) de los ligandos más relevantes. Se accedió a la base de datos ZINC15 y se obtuvieron los códigos SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) de las moléculas. Estos códigos se introdujeron en la base de datos pkCSM (Small Molecule Pharmacokinetic Prediction) (55) para obtener una estimación de las propiedades ADMET.

Resultados y discusión

A continuación mostramos los resultados de los mejores ligandos, que presentaban la mejor afinidad de unión, es decir, la menor energía de unión. El total de los 10 mejores ligandos obtenidos para cada análisis de *virtual screening* se muestran como tablas de información en anexos.

5-Lipooxigenasa

El análisis de *virtual screening* para la 5-Lox determinó que el mejor ligando para formar un complejo estable al unirse al sitio activo de la 5-Lox era la molécula R428, mostrada en la figura 1 (ZINC id: ZINC51951669). Esta *small molecule* se ha caracterizado previamente como inhibidor del receptor tirosina quinasa Axl (56), mostrando efectos terapéuticos frente al cáncer de mama en ratones (57).

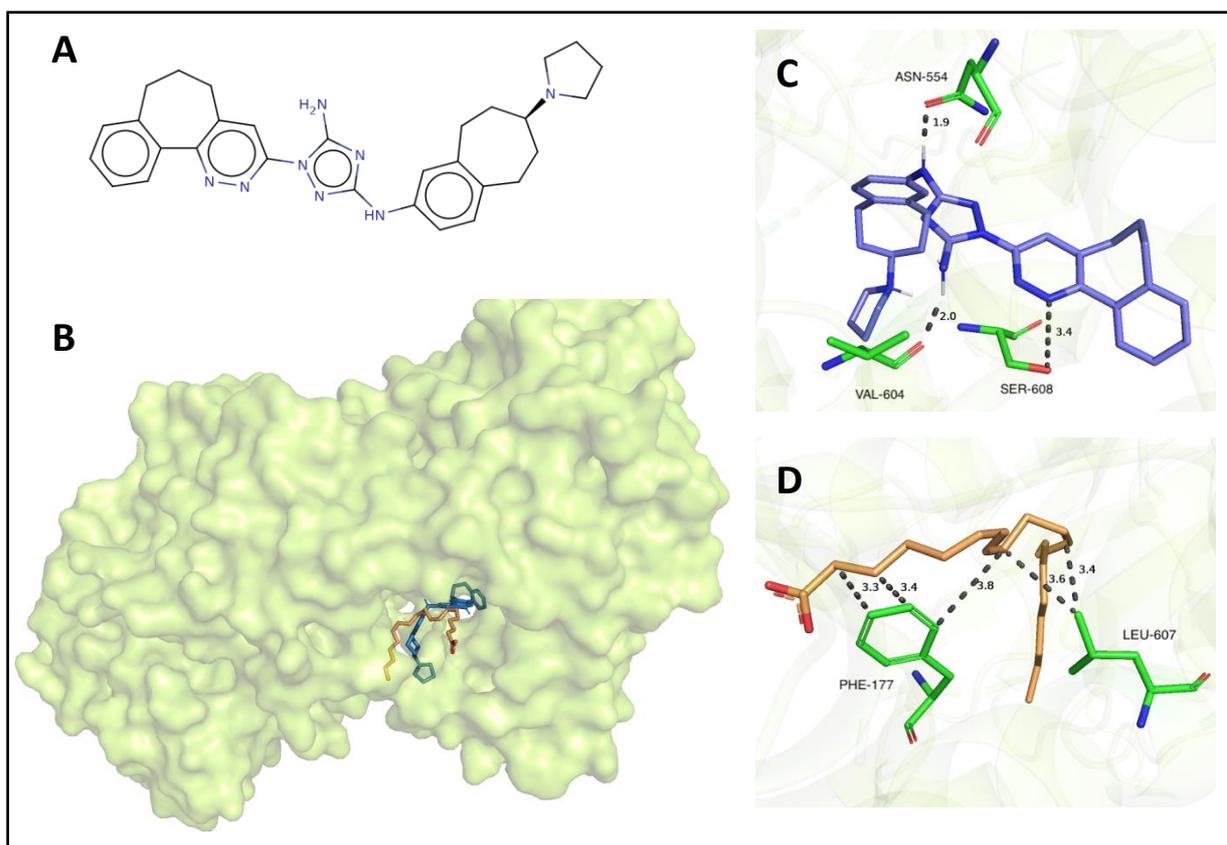


Figura 1. Estructura química del ligando obtenido para la 5-Lipooxigenasa y visualización del *docking*. **A:** Estructura química del ligando (ZINC51951669). **B:** Estructuras del ácido araquidónico (naranja) y la molécula R428 (azul) situados en el sitio de unión de la 5-Lipooxigenasa (superficie verdosa). **C:** Interacción de R428 (azul) con los residuos de la 5-Lox (verde). También se indica la distancia de interacción en Angstroms. **D:** Interacción de la molécula de ácido araquidónico (naranja) con los residuos de la 5-Lox (verde).

La molécula se sitúa en el mismo sitio de unión que el ácido araquidónico (figura 1B). Según su disposición, hemos estimado que la molécula establecerá enlaces polares con los residuos de Asparagina-554, Valina-604 y Serina-608 (figura 1C). El complejo ligando-receptor formado tras el *docking* con la molécula R428 muestra una energía de unión de -12.2 kcal/mol.

Podemos observar que la molécula R428 se une al sitio activo de la 5-Lox y que tiene la capacidad de establecer 3 enlaces polares (incluyendo puentes de hidrógeno) a corta distancia, además de, posiblemente, más interacciones hidrofóbicas. El ácido araquidónico, sustrato de la 5-Lox, únicamente muestra enlaces por interacciones hidrofóbicas, generalmente más débiles (58), por lo que la unión de nuestra molécula R428 a la 5-Lox parece ser más fuerte. Esto, unido a las buenas propiedades energéticas al formar complejo ligando-receptor, hace que la molécula R428 tenga las características adecuadas para actuar como un posible inhibidor de la 5-Lox y, por lo tanto, de la ruta de los leucotrienos.

Leukotrieno C₄ Sintasa

En cuanto a la LTC₄ Sintasa, el *screening* determinó que el ligando que presentaba menor energía de unión al formar complejo con la proteína era la molécula de Lumacaftor (ZINC id: ZINC64033452), con -10.1 kcal/mol. Los resultados del *docking* se representan en la figura 2. Lumacaftor es un fármaco aprobado que se utiliza en conjunto con otro fármaco, el Ivacaftor, para tratar la fibrosis quística (59). Podemos comprobar que la molécula se sitúa en el sitio de unión de los inhibidores conocidos propuestos en la bibliografía (46), estos son las moléculas TK04, TK04a y TK05. Estos inhibidores presentan enlaces polares con los residuos de Arginina-31 de la cadena A y Arginina-104 de la cadena C. En nuestro caso, estimamos que la molécula de Lumacaftor establecerá enlaces polares con los residuos de Arginina-30 y Prolina-37 de la cadena A (verde en la figura 2) y con los residuos de Arginina-51 y Arginina-104 de la cadena C (rosa en la figura 2). Dado que nuestra molécula de Lumacaftor consigue colocarse en el mismo sitio de unión que otros inhibidores y posiblemente establece un mayor número de enlaces polares con los residuos de la macromolécula *target*, podemos decir que el Lumacaftor tiene propiedades para frenar la síntesis de leucotrienos inhibiendo la LTC₄ Sintasa.

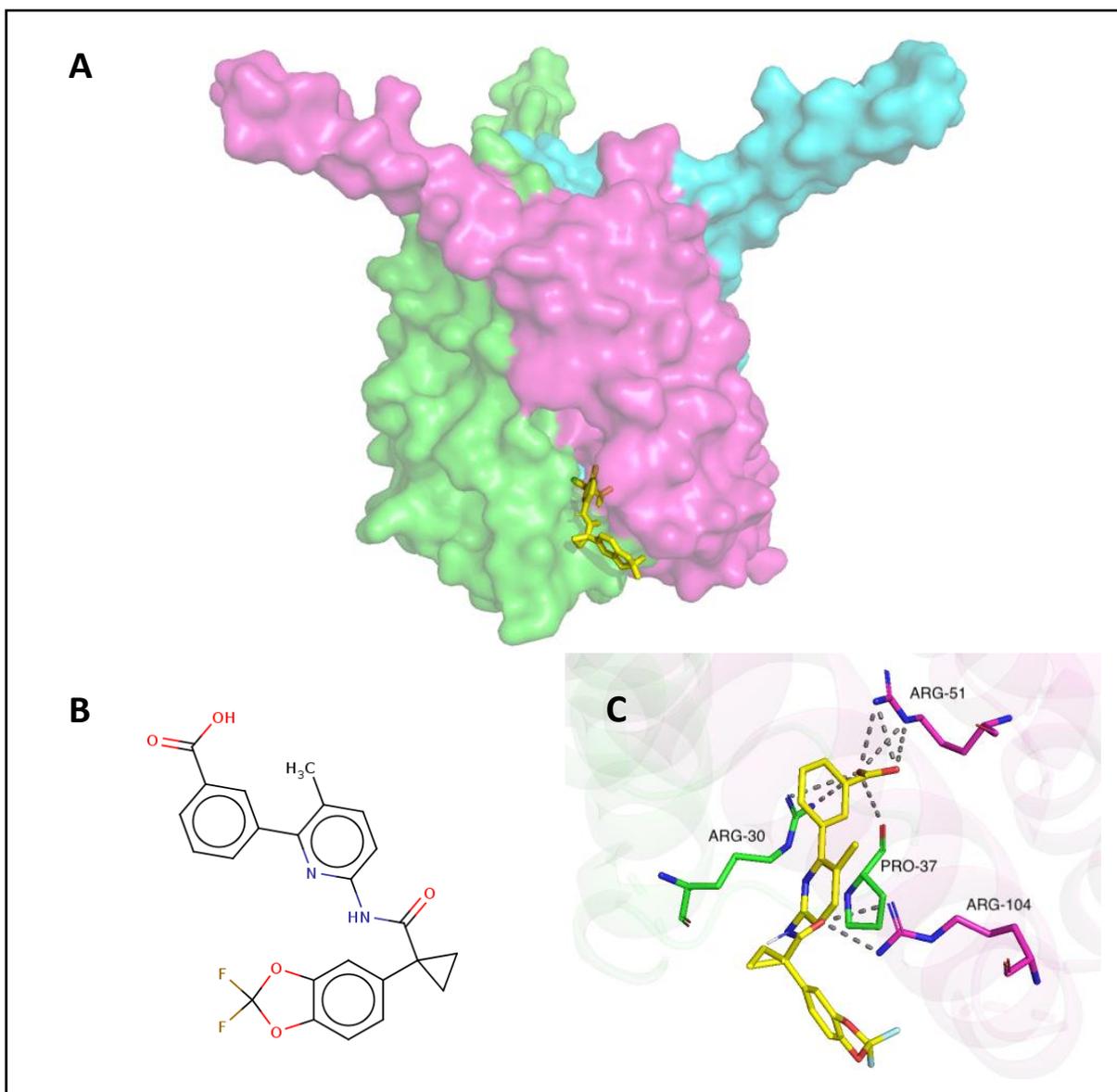


Figura 2. Estructura química del ligando obtenido para la LTC₄ Sintasa y visualización del *docking*. **A:** Estructura del ligando obtenido, Lumacaftor (amarillo) situado en el sitio de unión de la LTC₄ Sintasa, entre las cadenas A y C. La macromolécula consta de 3 cadenas, A (superficie verde), B (superficie celeste) y C (superficie rosa). **B:** Estructura química del Lumacaftor (ZINC64033452). **C:** Interacción del Lumacaftor (amarillo) con los residuos de la LTC₄ Sintasa, de la cadena A (verde) y C (rosa).

Catepsina B

Los resultados para la Catepsina B determinaron que el mejor ligando era la molécula Venetoclax (ZINC id: ZINC150338755). Venetoclax es un fármaco aprobado por la FDA como tratamiento para la leucemia linfática crónica que actúa inhibiendo la proteína BCL-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2). En nuestro caso, vemos como Venetoclax se acopla a la Catepsina B en el mismo bolsillo de unión que su inhibidor, la nitroxolina (figura 3A). El complejo Venetoclax-Catepsina B presenta una energía de unión de -10.3

kcal/mol, además la molécula presenta 13 puntos de rotación. Podemos ver como la nitroxolina establece enlaces con los residuos de Glutamina-23 (puente de hidrógeno) y Triptófano-221 (interacción hidrofóbica) de la Catepsina B (figura 3C). La molécula de Venetoclax es de mayor tamaño y, hemos estimado que además de establecer enlaces polares con estos dos residuos, también los establecerá con los residuos de Glutamato-109, Cisteína-119, Histidina-110, Histidina-111 y Glicina-198 (figura 3D). Esta molécula presenta un número mayor de contactos polares pero también es de mayor tamaño que la nitroxolina, por lo que su acoplamiento puede ser más difícil. Sin embargo, dado que se une al mismo sitio que la nitroxolina y presenta una baja energía de unión al unirse a la Catepsina B, pensamos que el Venetoclax puede servir como potencial inhibidor de esta proteína, evitando la activación del inflammasoma de NLRP3 y, por lo tanto, frenando la neuroinflamación propia del AD.

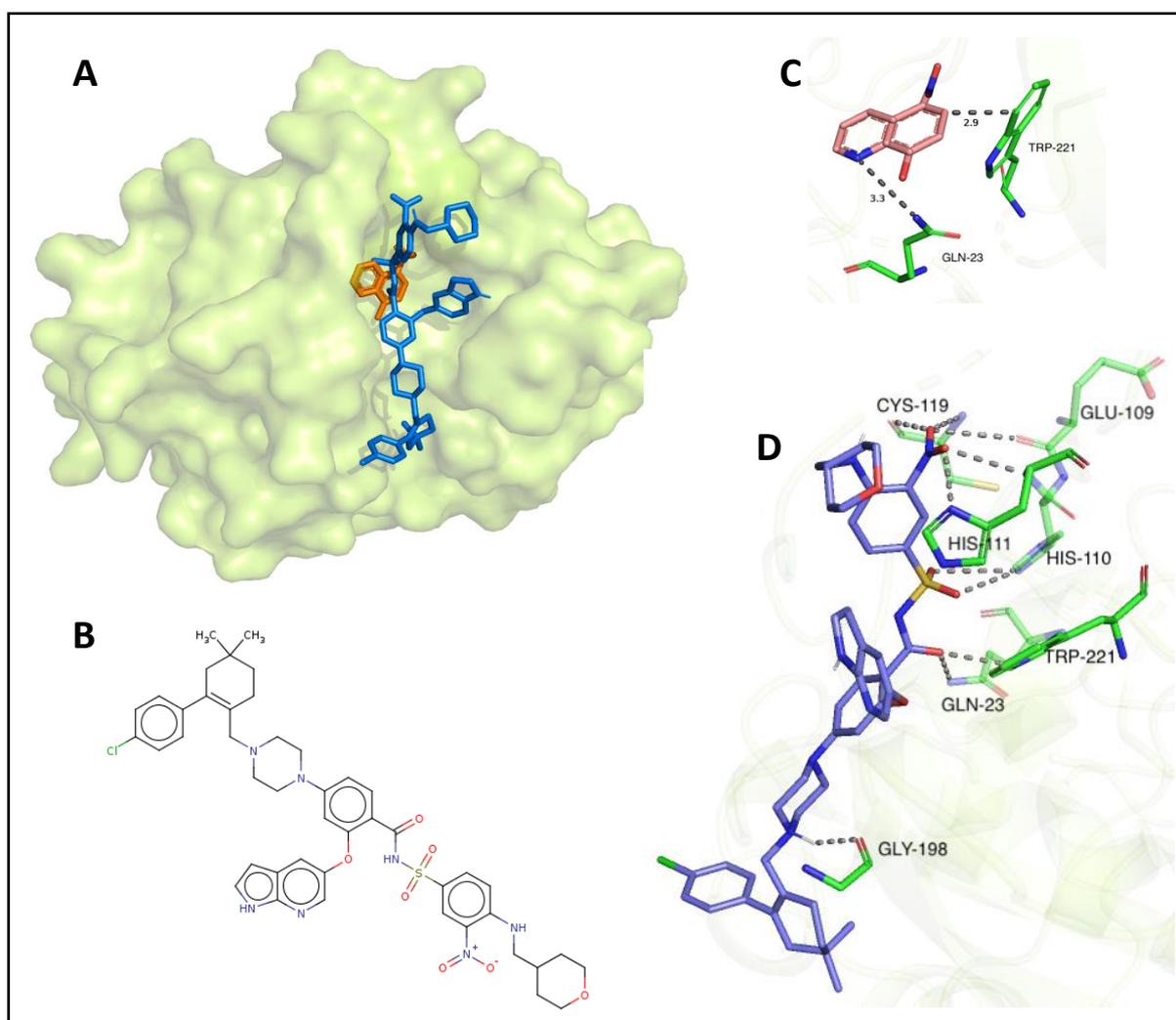


Figura 3. Estructura química del ligando obtenido para la Catepsina B y visualización del *docking*. **A:** Estructuras de la nitroxolina (naranja) y el ligando Venetoclax (azul) situados en el sitio de unión de la Catepsina B (superficie verdosa). **B:** Estructura química del Venetoclax (ZINC150338755). **C:** Interacción de la molécula de nitroxolina (naranja) con los residuos de la Catepsina B (verde). **D:** Interacción del ligando Venetoclax (azul) con los residuos de la Catepsina B (verde).

MyD88

Los resultados de los 3 *screenings* para el dominio TIR de la proteína MyD88 permitieron obtener 3 mejores ligandos, uno para cada sitio de unión descrito (48). Podemos observar la distribución de los 3 sitios de unión en la figura 4A. Para el sitio 1, cuyo residuo más importantes era la Arginina-217, se obtuvo como mejor ligando la molécula mostrada en la figura 4B (ZINC id: ZINC118915483), catalogada como Proscillaridin en la librería Drugs-lib, con una energía de unión de -6.4 kcal/mol. Aunque se encuentra anotada en el catálogo de la FDA "*approved drugs*", no se ha especificado aún la actividad de esta molécula. Como podemos observar en la figura 4E, hemos estimado que esta molécula establecerá enlaces polares con los residuos de Arginina-218 y Arginina-251. En el sitio 2 hemos encontrado la molécula Dihidroergotamina (ZINC id: ZINC3978005), (figura 4C). La Dihidroergotamina es un fármaco utilizado para tratar el dolor de cabeza o migraña aguda (60), actuando sobre el sistema vascular mediante la activación del receptor 5-HT_{1B/1D}. En nuestro *docking* con la proteína MyD88, esta molécula presenta una energía de unión de -7.5 kcal/mol. El sitio de unión 2 se centra principalmente en el residuo de Arginina-196 y Aspartato-197 (48), mientras que nuestra molécula de Dihidroergotamina hemos estimado que establecerá enlaces polares con Aspartato-195, Arginina-196 y Leucina-199. Por último, en el sitio 3 hemos encontrado como mejor ligando la molécula Chir-265 (ZINC id: ZINC18710085) (figura 4D), también llamada RAF265, un potente antitumoral que actúa inhibiendo B-RAF(V600E) y afectando a la ruta de las MAP quinasas en células tumorales (61). En nuestro *docking* esta molécula presenta una energía de unión de -8.1 kcal/mol. En nuestra proteína MyD88, el sitio de unión 3 se centra en los residuos de Lisina-282 y Arginina-288. La molécula RAF265, según hemos estimado, establecerá un enlace polar con el residuo de Arginina-288 del sitio 3 de MyD88-TIR.

La falta de información sobre inhibidores para estos sitios de unión del dominio TIR de MyD88 hace que sea difícil comprobar nuestros resultados. Sin embargo, en los tres casos, estimamos que las moléculas encontradas establecen enlaces polares con los residuos más importantes o sus adyacentes, cubriendo los sitios de unión. Por ello y por presentar energías de unión aceptables, podemos decir que las moléculas Proscillaridin (ZINC118915483), Dihidroergotamina y RAF265 tienen el potencial de inhibir la unión TIR-TIR de la proteína MyD88 con TLR4 y, posiblemente, con más TLRs, evitando la activación de la IL-1 β y reduciendo la neuroinflamación patogénica del AD.

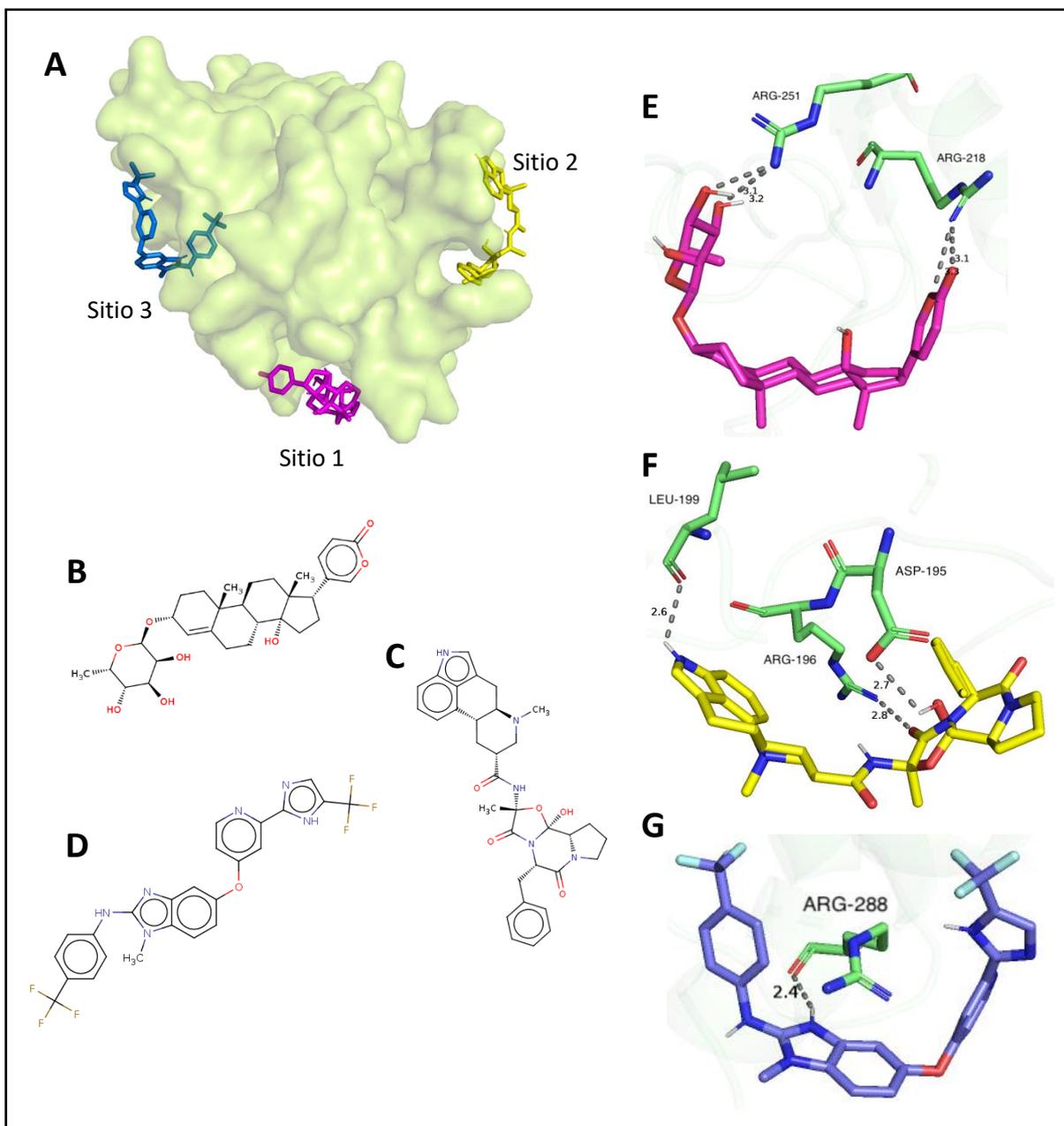


Figura 4. Estructura química de los ligandos obtenidos para la proteína MyD88-dominio TIR y visualización del *docking*. **A:** Estructura de los mejores ligandos obtenidos para cada sitio de unión del dominio TIR de MyD88 (superficie verdosa). En el sitio 1 se sitúa el ligando rosa, en el sitio 2 el ligando amarillo y en el sitio 3 el ligando azul. **B:** Estructura química del ligando Proscillaridin (ZINC118915483) para el sitio 1. **C:** Estructura química del ligando Dihydroergotamina (ZINC3978005) para el sitio 2. **D:** Estructura química del ligando RAF265 (o Chir-265) (ZINC18710085) para el sitio 3. **E:** Interacción del ligando Proscillaridin (rosa), obtenido para el sitio 1, con los residuos de MyD88-TIR (verde). **F:** Interacción del ligando Dihydroergotamina (amarillo), obtenido para el sitio 2, con los residuos de MyD88-TIR (verde). **G:** Interacción del ligando RAF265 (azul), obtenido para el sitio 3, con los residuos de MyD88-TIR (verde).

Inhibidores multitarget

Además de los ligandos obtenidos para cada *target* en concreto, hemos encontrado que, entre los 10 mejores resultados de los *screenings*, hay ligandos que aparecen en más de un *screening*. Esto abre la posibilidad de un enfoque *multitarget*, en el que un mismo fármaco pueda inhibir varias proteínas o sitios de unión diferentes. Los fármacos *multitarget* están adquiriendo cada vez más importancia en la búsqueda de tratamientos para el AD, dada la naturaleza multifactorial de la enfermedad. Tras observar cada ligando, hemos encontrado los resultados mostrados en la tabla 1.

Molécula	5-Lox	LTC4S	Catepsina B	MyD88 Site1	MyD88 Site2	MyD88 Site3	Nº <i>Targets</i> inhibidos
R428 (ZINC51951669)	-12.2		-10.2				2
Lumacaftor (ZINC64033452)		-10.1			-7.1	-7.4	3
Venetoclax (ZINC150338755)	-11.2		-10.3				2
Proscillaridin (ZINC118915483)				-6.4			1
Dihydroergotamine (ZINC3978005)					-7.5		1
Chir-265 (ZINC18710085)						-8.1	1
R428 (ZINC51951668)	-12.1		-9.9		-7.4		3
Ditercalinium (ZINC4215707)	-11.5					-7.5	2
Mk3207 (ZINC103760981)	-11.0		-10.2				2
Mk3207 (ZINC103760978)		-9.6	-10.0		-7.1		3
Mk3207 (ZINC43203371)		-9.5	-10.2		-7.3		3
Fluazuron (ZINC2570819)					-7.3	-7.1	2

Tabla 1. Energías de unión de los mejores ligandos de cada *virtual screening* y de los ligandos que aparecen entre los 10 mejores de más de un *screening*, potencialmente inhibiendo más de un *target* o sitio de unión. Se muestran resaltadas en negrita las moléculas que presentan la menor energía de unión para cada complejo molécula-*target*, y en color azulado el valor de estas energías. Las energías se muestran en valores de kcal/mol. La última columna indica cuántos *targets* podrían quedar potencialmente inhibidos por cada molécula. Los espacios vacíos indican que la molécula no está presente entre los 10 mejores ligandos del *screening*.

Como vemos, la molécula R428 (ZINC51951669), que hemos confirmado previamente como mejor ligando para la 5-Lox, presenta también la posibilidad de inhibir la Catepsina B. Sin embargo, tras comprobar sus enlaces estimados con los residuos de la Catepsina B, vimos que sólo presentaba un enlace polar, insuficiente para confirmarla como inhibidor de la Catepsina B. Por otra parte, vemos que en la tabla 1 aparece otro estereoisómero de la molécula R428 (ZINC51951668) (Figura 5A). Al analizar el *docking*

de este estereoisómero alternativo, vimos que podía establecer enlaces polares con los residuos de Metionina-196, Glicina-198 y Glutamato-122 de la Catepsina B (Figura 5D). Esto permitía establecer una unión más fuerte con la Catepsina B, aunque la energía del complejo sería mayor y no se establecerían contactos polares con los residuos que interactúan con el inhibidor conocido, la nitroxolina. Este estereoisómero de la molécula R428 (ZINC51951668) establece los mismos enlaces con la 5-Lox que el primero analizado (figura 1C), como vemos en la figura 5B. También podemos ver en la tabla 1 que este mismo estereoisómero de R428 podría inhibir el sitio 2 del dominio TIR de la proteína MyD88, ya que presenta posibles enlaces polares con los residuos de Aspartato-195 y Aspartato-197 de MyD88 (Figura 5C), siendo el segundo uno de los residuos principales del sitio 2 (48).

Esto hace que el estereoisómero ZINC51951668 de la molécula R428 pueda ser un posible inhibidor de 5-Lox, Catepsina B y MyD88-sitio 2, a tener en cuenta para un enfoque *multitarget* frente al AD.

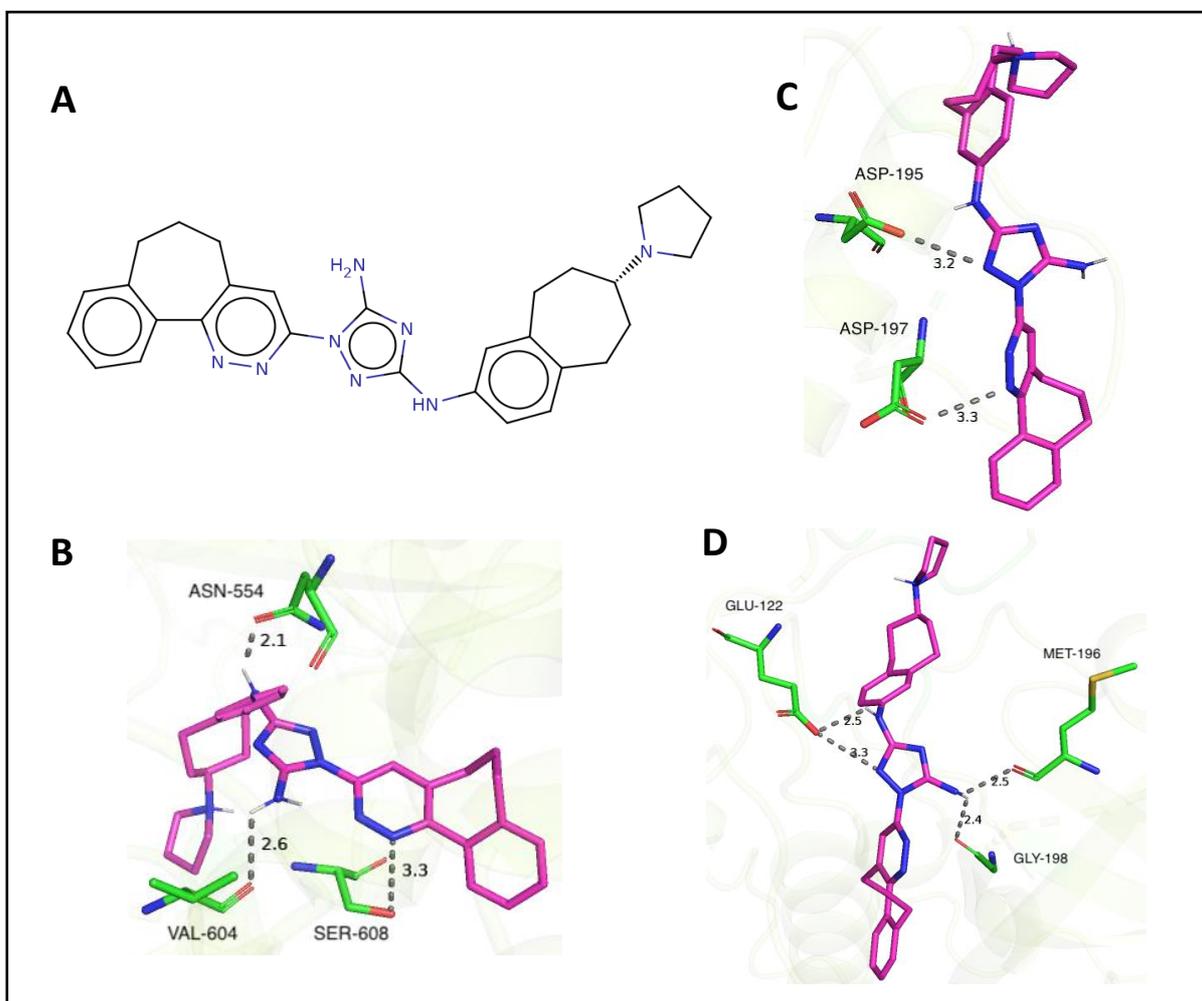


Figura 5. Visualización del *docking* de la molécula R428 (estereoisómero ZINC51951668) frente a varios *targets*. **A:** Estructura química del estereoisómero. **B:** *Docking* de la molécula (Rosa) en el sitio de unión de la 5-Lox y enlaces con los residuos de la proteína (Verde). **C:** *Docking* de la molécula (Rosa) en el sitio de unión 2 de MyD88 y enlaces con los residuos de la proteína (Verde). **D:** *Docking* de la molécula (Rosa) en el sitio de unión de la Catepsina B y enlaces con los residuos de la proteína (Verde).

Por otra parte, hemos visto que la molécula de Lumacaftor (ZINC64033452), que hemos establecido como el mejor ligando inhibidor para la LTC₄ Sintasa, es también un posible inhibidor para los sitios 2 y 3 del dominio TIR de MyD88 (Tabla 1). Estos dos sitios de unión tienen especial importancia, ya que ambos se unen a proteínas Mal y esta unión es necesaria para la interacción de MyD88-TIR con TLR4 (48). En el sitio 2 hemos comprobado que Lumacaftor puede establecer enlaces polares con los residuos de Metionina-157, Aspartato-195, Arginina-196 y Serina-206 de MyD88 (Figura 6A). En el sitio 3 la molécula interactuaría con los residuos de Valina-273 y Arginina-288 (Figura 6B). Dado que los Arginina-196 y Arginina-288 son residuos principales de los sitios de unión 2 y 3, respectivamente, podemos estimar que Lumacaftor tiene capacidad para inhibir correctamente estos dos sitios de unión, formando en ambos casos un complejo ligando-proteína con una energía de unión aceptable. Por ello podemos decir que Lumacaftor es un buen candidato para establecer una terapia *multitarget* para el AD, al inhibir tanto la LTC₄ Sintasa en la ruta de los leucotrienos, como la proteína MyD88 en la ruta de la neuroinflamación del AD.

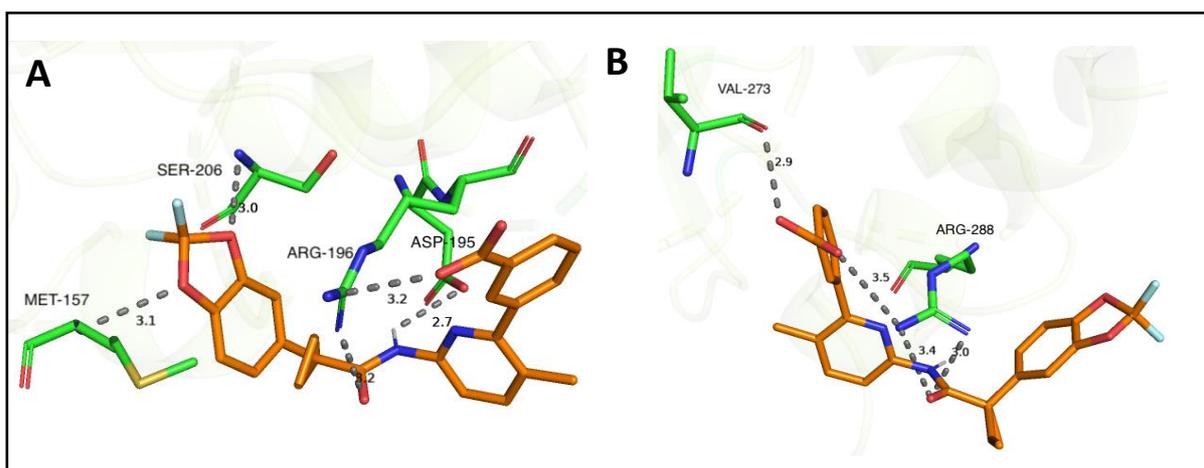


Figura 6. Visualización del *docking* de la molécula Lumacaftor (ZINC64033452) frente a varios *targets*. **A:** *Docking* de la molécula (Naranja) en el sitio de unión 2 del dominio TIR de MyD88 y enlaces con los residuos de la proteína (Verde). **B:** *Docking* de la molécula (Naranja) en el sitio de unión 3 del dominio TIR de MyD88 y enlaces con los residuos de la proteína (Verde).

También hemos visto que la molécula Venetoclax (ZINC150338755), potencial inhibidor de la Catepsina B, aparece entre los 10 mejores ligandos en el *screening* de la 5-Lox, con una energía de unión de -11.2 kcal/mol. Al observar este *docking* (Figura 7), hemos visto que esta molécula podría establecer uniones polares con los residuos de Fenilalanina-177, Asparagina-554 y Glutamina-609 del sitio de unión de la 5-Lox, lo que la convierte en un potencial inhibidor de la 5-Lox. Podemos, por lo tanto, decir que el Venetoclax es un buen candidato para tratar el AD desde un enfoque *multitarget*, ya que es un potencial inhibidor de la neuroinflamación mediada por Catepsina B y de la producción de leucotrienos mediada por 5-Lox.

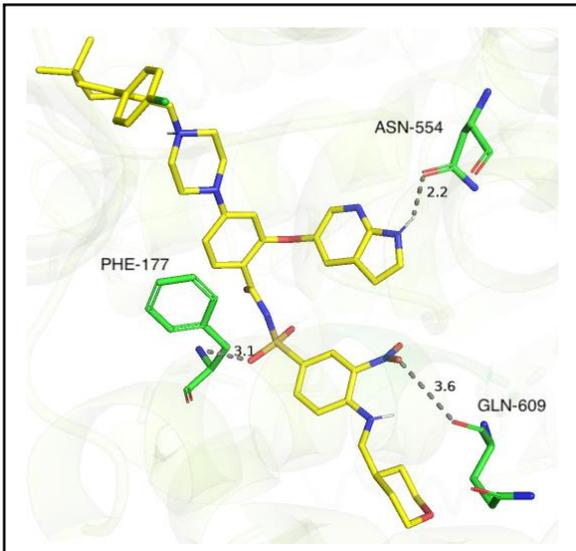


Figura 7. Visualización del *docking* de la molécula Venetoclax (ZINC150338755) frente a la 5-Lipooxigenasa. La molécula de Venetoclax (Amarillo) se coloca en el sitio activo de la 5-Lox y establece enlaces polares con tres residuos de la proteína (Verde).

Hemos podido comprobar también que la molécula Ditercalinium (ZINC4215707) podría ser un potencial inhibidor de la 5-Lox y del sitio de unión 3 de MyD88-TIR (Figura 8). Aún no se conoce específicamente la actividad de esta molécula.

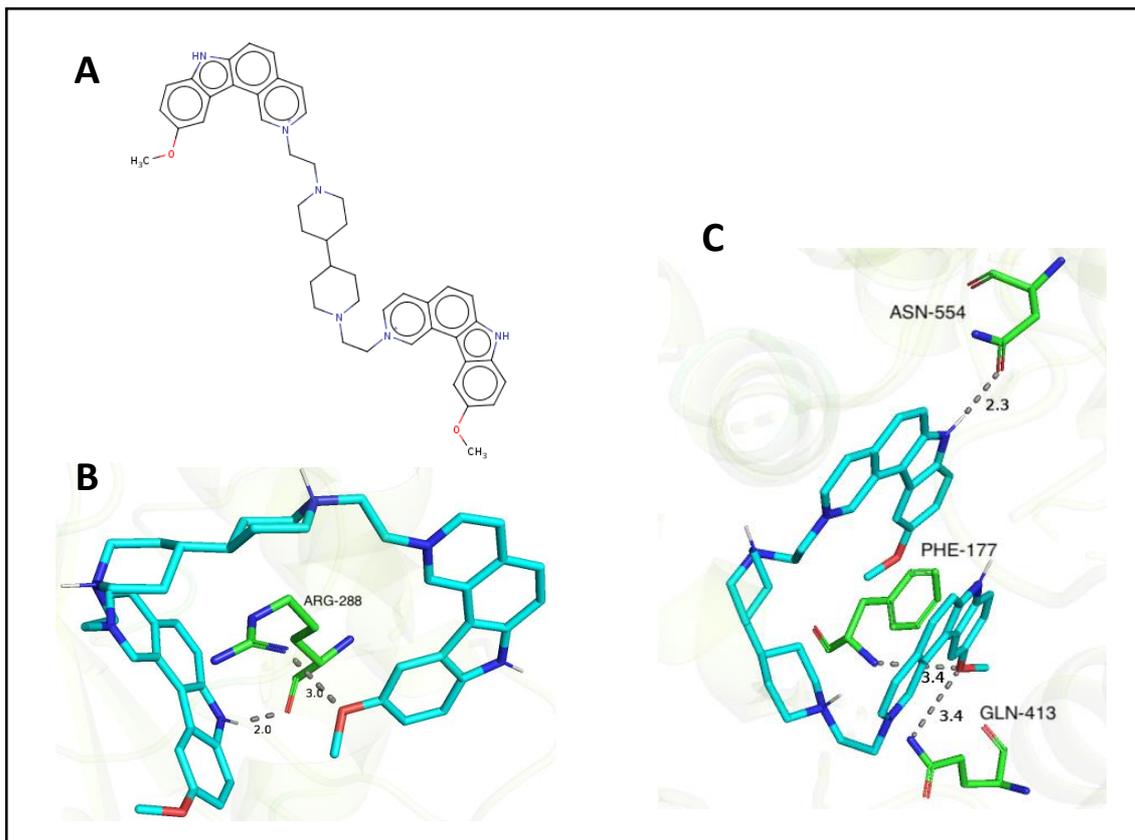


Figura 8. Visualización del *docking* de la molécula Ditercalinium (ZINC4215707) frente a la 5-Lox (C) y el sitio de unión 3 de MyD88 (B). A: Estructura química de la molécula. La molécula de Ditercalinium se muestra en color celeste y los residuos pertenecientes a los *targets* en color verde.

Hemos podido comprobar que el Ditercalinium podría establecer enlaces polares con los residuos de Fenilalanina-177, Glutamina-413 y Asparagina-554 de la 5-Lox y con los dos extremos del residuo Arginina-288 del sitio 3 de la MyD88, uno de los principales residuos de este sitio de unión. Además de establecer estos enlaces fuertes, la molécula presenta en ambos *targets* unas energías de unión aceptables (-11.5 y -7.5, respectivamente), por lo que podemos considerar el Ditercalinium como un posible candidato para inhibidor *multitarget*.

Como podemos ver en la tabla 1, existen otras moléculas que no hemos nombrado y que aparecen entre los 10 mejores ligandos en más de un *screening*. La molécula Fluazuron (ZINC2570819) podría inhibir los sitios 2 y 3 de MyD88-TIR, aunque esto lo podríamos conseguir con el Lumacaftor, como ya hemos visto. La molécula Mk3207 presenta tres estereoisómeros potenciales inhibidores *multitarget*. De estos tres estereoisómeros, el primero (ZINC103760981) podría inhibir la 5-Lox y la Catepsina B, aunque esto ya puede hacerlo la molécula de Venetoclax. El segundo y tercer estereoisómero (ZINC103760978 y ZINC43203371) podrían inhibir las proteínas LTC₄ Sintasa, Catepsina B y el sitio de unión 2 de MyD88, sin embargo hemos comprobado que los enlaces establecidos con estos *targets* no son suficientes como para poder considerar estos estereoisómeros como inhibidores.

Análisis de las propiedades moleculares

Dada la naturaleza de la enfermedad a tratar en este estudio, es necesario que los inhibidores lleguen al sistema nervioso central y atraviesen la barrera hematoencefálica. Para atravesar estas barreras por transporte pasivo, las moléculas deben cumplir unos requisitos determinados. En nuestro estudio todas las moléculas presentaban buenas propiedades farmacocinéticas debido al filtraje previo de la librería de ligandos utilizada (39). Por ello, al observar las propiedades ADMET de nuestras moléculas resultado, nos centramos en comprobar que los valores de "*BBB permeability*" y "*CNS permeability*" obtenidos en el servidor web pkCSM (55) fueran aceptables, tomando como aceptables los valores indicados en la información del servidor. Estos valores eran un $\log_{BB} > -1$ para tomar la "*BBB permeability*" como aceptable y un $\log_{PS} > -3$ para la "*CNS permeability*". Los valores estimados por el servidor pkCSM para nuestros inhibidores se muestran en la tabla 2.

Según los valores estimados obtenidos podemos observar que la molécula R428 presentaría dificultades para atravesar la BBB (barrera hematoencefálica), aunque el valor es ajustado con un \log_{BB} muy cercano a -1. No tendría problemas para penetrar al CNS (sistema nervioso central). Los estereoisómeros muestran los mismos valores de \log_{BB} y \log_{PS} . El Lumacaftor, sin embargo, no tendría problemas para atravesar ambas barreras ya que presenta ambos valores aceptables. El Venetoclax, por otro lado, presenta incapacidad para atravesar tanto el BBB como el CNS, al tener unos valores muy reducidos de ambas permeabilidades. En cuanto a los potenciales inhibidores de MyD88 con menor energía de unión, encontramos que la molécula de Proscillaridin (ZINC118915483) asociada al sitio de unión 1 puede atravesar la BBB pero presenta dificultades para penetrar al CNS. La Dihidroergotamina tiene las características

Molécula	BBB permeability (logBB)	CNS permeability (logPS)
R428 (ZINC51951669)	-1.031	-2.013
Lumacaftor (ZINC64033452)	-0.534	-2.793
Venetoclax (ZINC150338755)	-1.914	-3.212
Proscillaridin (ZINC118915483)	-0.943	-3.168
Dihydroergotamine (ZINC3978005)	-0.589	-2.655
Chir-265 (ZINC18710085)	-1.861	-1.836
R428 (ZINC51951668)	-1.031	-2.013
Ditercalinium (ZINC4215707)	0.295	-1.482

Tabla 2. Resultados de "BBB permeability" en valores de logBB y "CNS permeability" en valores de logPS para las *small molecules* encontradas. Se muestran resaltadas en negrita las mejores moléculas resultantes de cada *screening*, según su energía de unión. Se indican con color verde los valores de logBB y logPS que entran dentro de los límites aceptables según la información del servidor pkCSM. Valores obtenidos mediante el servidor web pkCSM.

necesarias para atravesar ambas barreras. Esto es lógico, ya que se trata de un fármaco aprobado para tratar el dolor de cabeza. La molécula RAF265 (o Chir-265), potencial inhibidora del sitio 3 del dominio TIR de MyD88, consigue penetrar al CNS pero no puede atravesar la barrera hematoencefálica. Por último, el Ditercalinium, potencial inhibidor *multitarget* para 5-Lox y MyD88-sitio 3, podría atravesar fácilmente ambas barreras de forma pasiva.

Ante estos resultados podríamos pensar que las moléculas incapaces de llegar al CNS y atravesar la barrera hematoencefálica quedarían invalidadas como tratamiento del AD. Sin embargo, existen numerosos métodos de transporte además del transporte pasivo que pueden permitir la correcta distribución de diferentes tipos de moléculas al cerebro. Por ejemplo, recientemente se ha descubierto que es posible utilizar liposomas modificados como sistema de transporte de fármacos para atravesar la barrera hematoencefálica y tratar el AD (62). También con el objetivo de tratar el AD, se han utilizado nanopartículas de un polímero derivado de las fibras del mango para transportar fármacos penetrando al CNS (63). La aparición en los últimos años de nuevas estrategias en la distribución de fármacos como las mencionadas, hace que sea posible utilizar una gran variedad de moléculas como fármacos para el AD, aunque no cumplan los requisitos ideales para su transporte pasivo hacia el cerebro.

Conclusiones

Según hemos podido comprobar, las *small molecules* obtenidas en este estudio tras varios análisis de *virtual screening* han confirmado nuestra hipótesis inicial al presentar capacidades inhibitoras cuando interactúan con los cuatro *targets* seleccionados.

Desde el punto de vista del futuro diseño de fármacos, estos inhibidores llamados "*hits*", tras ser confirmados experimentalmente, estarían preparados para continuar con el proceso aplicando técnicas "*hit-to-lead*" para mejorar las propiedades de las moléculas obtenidas hasta convertirse en "*leads*" y, tras varias fases de pruebas, en un fármaco para el AD.

Debido a que hemos comprobado que algunas de las moléculas obtenidas pueden presentar dificultades para penetrar al sistema nervioso central o atravesar la barrera hematoencefálica, estas técnicas "*hit-to-lead*" deberían incluir la búsqueda de estrategias para mejorar la distribución del fármaco.

Los fármacos que se obtendrían a partir de las moléculas de este estudio, actuarían inhibiendo cuatro *targets*, dos en puntos diferentes de la ruta los leucotrienos y otros dos en diferentes partes del proceso de respuesta inflamatoria patológica del AD. Este enfoque de múltiples *targets* parece ser la mejor opción en la búsqueda de terapias para el AD actualmente. Por ello, en este estudio, además de encontrar moléculas inhibitoras para cada uno de los *targets* propuestos, hemos mostrado como varias moléculas podrían inhibir más de un *target*, resultando especialmente útiles en el tratamiento del AD.

Podemos concluir que las moléculas obtenidas en este estudio presentan la capacidad de convertirse en fármacos que constituyan una terapia efectiva frente a la enfermedad de Alzheimer.

Glosario

AD: Enfermedad de Alzheimer (Alzheimer Disease)

A β : Beta-Amiloide

5-Lox: 5-lipooxigenasa

LT: Leucotrieno

CysLT: Cisteinil leucotrieno

CysLTR: Receptor de cisteinil leucotrieno

FLAP: 5-lipoxygenase activating protein

IL-1 β : Interleucina-1 β

TLR: Toll-Like Receptors

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88

PDB: Protein Data Bank

TIR: Toll/Interleucina-1 Receptor

Mal: MyD88 Adaptor Like

BBB: Blood-Brain Barrier

CNS: Central Nervous System

ADMET: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad

Bibliografía

1. Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2018;14:367–429. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>
2. Prince M, Wimo A, M G, GC A, YT W, M P. World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Dis Int* [Internet]. 2015; Available from: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>
3. Dartigues JF. Alzheimer's disease: a global challenge for the 21st century. *Lancet Neurol* [Internet]. 2009;8:1082–3. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70298-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70298-4)
4. Castellani RJ, Smith MA. Compounding artefacts with uncertainty, and an amyloid cascade hypothesis that is “too big to fail.” *J Pathol*. 2011;224(2):147–52.
5. Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*. 2004;62:1984–9.
6. Hardy DJS & J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *Struct Complex Turbul Shear Flow* [Internet]. 2016;8(6):595–608. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-81991-9_5
7. Maccioni RB, Farías G, Morales I, Navarrete L. The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Arch Med Res*. 2010;41:226–31.
8. Kozlov S, Afonin A, Evsyukov I, Bondarenko A. Alzheimer's disease: As it was in the beginning. *Rev Neurosci*. 2017;1–19.
9. Rosini M, Simoni E, Caporaso R, Minarini A. Multitarget strategies in Alzheimer's disease: Benefits and challenges on the road to therapeutics. *Future Med Chem*. 2016;8(6):697–711.
10. Marc Peters-Golden, M.D., and William R. Henderson, Jr. MD. Leukotrienes. *N Engl J Med*. 2007;357(18):1841–54.
11. Ciccarelli R, D'Alimonte I, Santavenere C, D'Auro M, Ballerini P, Nargi E, et al. Cysteinyl-leukotrienes are released from astrocytes and increase astrocyte proliferation and glial fibrillary acidic protein via cys-LT1 receptors and mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Neurosci*. 2004;20(6):1514–24.
12. Fang SH, Wei EQ, Zhou Y, Wang ML, Zhang WP, Yu GL, et al. Increased expression of cysteinyl leukotriene receptor-1 in the brain mediates neuronal damage and astrogliosis after focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*. 2006;140:969–79.
13. Hu H, Chen G, Zhang JM, Zhang WP, Zhang L, Ge QF, et al. Distribution of cysteinyl leukotriene receptor 2 in human traumatic brain injury and brain tumors. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(6):685–90.
14. Ikonomic MD, Abrahamson EE, Uz T, Manev H, DeKosky ST. Increased 5-lipoxygenase immunoreactivity in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(12):1065–73.
15. Firuzi O, Zhuo J, Chinnici CM, Wisniewski T, Praticò D. 5-Lipoxygenase gene disruption reduces amyloid- β pathology in a mouse model of Alzheimer's

- disease. *FASEB J* [Internet]. 2008;22:1169–78. Available from: <http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.07-9131.com>
16. Hawkes CA, Shaw JE, Brown M, Sampson AP, McLaurin J, Carare RO. MK886 reduces cerebral amyloid angiopathy severity in TgCRND8 mice. *Neurodegener Dis*. 2013;13:17–23.
 17. Johanna Michael, Julia Marschallinger LA. The leukotriene signaling pathway: a druggable target in Alzheimer's disease. 2018. p. 1–12.
 18. Kubavat AH, Khippal N, Tak S, Rihwani P, Bhargava S, Patel T, et al. A Randomized, comparative, multicentric clinical trial to assess the efficacy and safety of zileuton extended-release tablets with montelukast sodium tablets in patients suffering from chronic persistent asthma. *Am J Ther*. 2013;20(2):154–62.
 19. Xie L, Lai Y, Lei F, Liu S, Liu R, Wang T. Exploring the association between interleukin-1 β and its interacting proteins in Alzheimer's disease. *Mol Med Rep*. 2015;11(5):3219–28.
 20. Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağasi H, Bilgiç B, Lohmann E, Ertan S, et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*. 2015;283:50–7.
 21. Ozato K, Tsujimura H, Tamura T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques*. 2002;33(4 SUPPL.).
 22. Uematsu S, Akira S. Pathogen recognition by innate immunity. *Ski Res*. 2006;124:783–801.
 23. Tan MS, Yu JT, Jiang T, Zhu XC, Tan L. The NLRP3 inflammasome in alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2013;48(3):875–82.
 24. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol*. 2008;9(8):857–65.
 25. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* [Internet]. 2012;0:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11729>
 26. Hook VYH, Kindy M, Hook G. Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce β -amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, β -secretase site of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem*. 2008;283(12):7745–53.
 27. Wang C, Sun B, Zhou Y, Grubb A, Gan L. Cathepsin B degrades amyloid- β in mice expressing wild-type human amyloid precursor protein. *J Biol Chem*. 2012;287(47):39834–41.
 28. Chen L, Morrow JK, Tran HT, Phatak SS, Du-Cuny L and Zhang S. From laptop to benchtop to bedside: Structure-based Drug Design on Protein Targets. *Curr Pharm Des*. 2012;18(9):1217–39.
 29. Labbé CM, Rey J, Lagorce D, Vavruša M, Becot J, Sperandio O, et al. MTiOpenScreen: A web server for structure-based virtual screening. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(1):1–7.
 30. Alland C, Moreews F, Boens D, Carpentier M, Chiusa S, Lonquety M, et al. RPBS:

- A web resource for structural bioinformatics. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:44–9.
31. Néron B, Ménager H, Maufrais C, Joly N, Maupetit J, Letort S, et al. Mobyle: A new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics.* 2009;25(22):3005–11.
 32. OLEG TROTT AJO. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem.* 2009;31(2):455–61.
 33. Gaillard T. Evaluation of AutoDock and AutoDock Vina on the CASF-2013 Benchmark. *J Chem Inf Model.* 2018;58:1697–706.
 34. Wang Z, Sun H, Yao X, Li D, Xu L, Li Y, et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys Chem Chem Phys.* 2016;1–27.
 35. Gaulton A, Hersey A, Nowotka ML, Patricia Bento A, Chambers J, Mendez D, et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:945–54.
 36. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:1074–82.
 37. Ursu O, Holmes J, Knockel J, Bologna CG, Yang JJ, Mathias SL, et al. DrugCentral: Online drug compendium. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D932–9.
 38. Siramshetty VB, Eckert OA, Gohlke BO, Goede A, Chen Q, Devarakonda P, et al. SuperDRUG2: A one stop resource for approved/marketed drugs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1137–43.
 39. Lagarde N, Rey J, Gyulxhandanyan A, Tufféry P, Miteva MA, Villoutreix BO. Online structure-based screening of purchasable approved drugs and natural compounds: Retrospective examples of drug repositioning on cancer targets. *Oncotarget [Internet].* 2018;9(64):32346–61. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85051790127&doi=10.18632/oncotarget.25966&partnerID=40&md5=09c4edd4ded6550182cfdb477ddc5142>
 40. Sterling T, Irwin JJ. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model.* 2015;55(11):2324–37.
 41. Lagorce D, Bouslama L, Becot J, Miteva MA and Villoutreix BO. FAF-Drugs4: Free ADME-Tox Filtering computations for chemical biology and early stages drug discovery. *Bioinformatics.* 2016;31(i):31–7.
 42. Rose PW, Prlić A, Altunkaya A, Bi C, Bradley AR, Christie CH, et al. The RCSB protein data bank: Integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D271–81.
 43. Gilbert NC, Rui Z, Neau DB, Waight MT, Bartlett SG, Boeglin WE, et al. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *FASEB J [Internet].* 2012;26:3222–9. Available from: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.12-205286>
 44. Ago H, Kanaoka Y, Irikura D, Lam BK, Shimamura T, Austen KF, et al. Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature.* 2007;448(7153):609–12.
 45. Lam BK, Penrose JF, Freeman GJ, Austen KF. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. *ProcNatAcadSciUSA.* 1994;91(16):7663–

- 7.
46. Kleinschmidt TK, Haraldsson M, Basavarajappa D, Lundeberg E, Thulasingham M, Ekoff M, et al. Tandem Benzophenone Amino Pyridines, Potent and Selective Inhibitors of Human Leukotriene C4 Synthase. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2015;355(1):108–16. Available from: <http://jpet.aspetjournals.org/content/355/1/108.abstract>
 47. Mirković B, Renko M, Turk S, Sosič I, Jevnikar Z, Obermajer N, et al. Novel Mechanism of CathepsinB Inhibition by Antibiotic Nitroxoline and Related Compounds. *ChemMedChem*. 2011;6(8):1351–6.
 48. Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Orii KE, Li A, Kimura T, et al. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009;106(25):10260–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0812956106>
 49. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(6):429–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2565>
 50. Tahara K, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi KI. Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance. *Brain*. 2006;129(11):3006–19.
 51. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*. 2002;420:329–33.
 52. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell*. 2006;125(5):943–55.
 53. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox - 1758-2946-3-33.pdf. 2011;1–14. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1758-2946-3-33.pdf>
 54. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W443–7.
 55. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem*. 2015;58(9):4066–72.
 56. Mollard A, Warner SL, Call LT, Wade ML, Bearss JJ, Verma A, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of novel AXL kinase inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2011;2(12):907–12.
 57. Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2010;70(4):1544–54.
 58. Durell RD, Ben-Naim A. Hydrophobic-Hydrophilic Forces in Protein Folding. 2016;15(5):477–91.
 59. McColley MTG and SA. The safety of lumacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Heal Hum Serv*. 2017;16(11):1305–11.
 60. Schürks M. Dihydroergotamine: role in the treatment of migraine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2009;5(9):1141–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425250903164211>
 61. Williams TE, Subramanian S, Verhagen J, McBride CM, Costales A, Sung L, et al. Discovery of RAF265: A Potent mut-B-RAF inhibitor for the treatment of metastatic melanoma. *ACS Med Chem Lett*. 2015;1–5.

62. Agrawal M, Ajazuddin, Tripathi DK, Saraf S, Saraf S, Antimisialis SG, et al. Recent advancements in liposomes targeting strategies to cross blood-brain barrier (BBB) for the treatment of Alzheimer's disease. *J Control Release* [Internet]. 2017;260:61–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.019>
63. Jakki SL, Ramesh YV, Gowthamarajan K, Senthil V, Jain K, Sood S, et al. Novel anionic polymer as a carrier for CNS delivery of anti-Alzheimer drug. *Drug Deliv.* 2016;23(9):3471–9.

Anexos

Descripción: 10 primeros resultados de cada análisis de *virtual screening*. Se muestra el número, nombre de la molécula con ZINC id, energía de unión en kcal/mol y número de puntos con capacidad de rotación, respectivamente.

Virtual screening 5-Lox:

Nº	Compound	Energy	nRot
1	R428_ZINC000051951669	-12.2	5
2	R428_ZINC000051951668	-12.1	5
3	Velpatasvir_ZINC000504665932	-11.9	13
4	Bolazine_ZINC000008214506	-11.6	3
5	Velpatasvir_ZINC000504665931	-11.6	13
6	Ditercalinium_ZINC000004215707	-11.5	9
7	Venetoclax_ZINC000150338755	-11.2	13
8	Cortisuzol_ZINC000004215464	-11.1	9
9	Mk3207_ZINC000103760981	-11.0	4
10	Dirilotapide_ZINC000003988502	-11.0	10

Virtual screening LTC₄ Sintasa:

Nº	Compound	Energy	nRot
1	Lumacaftor_ZINC000064033452	-10.1	5
2	Mk3207_ZINC000103760984	-9.7	4
3	Capeserod_ZINC000000603773	-9.7	6
4	Mk3207_ZINC000103760978	-9.6	4
5	Tofogliflozin_ZINC000035826342	-9.6	8
6	Ripisartan_ZINC000000538309	-9.5	6
7	Mk3207_ZINC000043203371	-9.5	4
8	Ly-2584702_ZINC000043204100	-9.4	4
9	Tasosartan_ZINC000013444037	-9.4	4
10	Azd-8055_ZINC000143201183	-9.3	6

Virtual screening Catepsina B:

Nº	Compound	Energy	nRot
1	Venetoclax_ZINC000150338755	-10.3	13
2	Mk3207_ZINC000103760981	-10.2	4
3	Mk3207_ZINC000043203371	-10.2	4
4	Telcagepant_ZINC000028827350	-10.2	5
5	Rimegepant_ZINC000068267814	-10.2	5
6	R428_ZINC000051951669	-10.2	5
7	Tarazepide_ZINC000002015955	-10.1	3
8	Mk3207_ZINC000103760978	-10.0	4
9	Metergotamine_ZINC000072266819	-9.9	5
10	R428_ZINC000051951668	-9.9	5

Virtual screening MyD88 sitio 1:

Nº	Compound	Energy	nRot
1	Proscillaridin_ZINC000118915483	-6.4	7
2	Aprepitant_ZINC000097974568	-6.4	8
3	Proscillaridin_ZINC000118915484	-6.4	7
4	Verubecestat_ZINC000144542146	-6.3	3
5	Polydatin_ZINC000005923201	-6.3	11
6	baicalin_ZINC000003943903	-6.3	9
7	Cep-32496_ZINC000043207440	-6.3	8
8	Proscillaridin_ZINC000118917543	-6.3	7
9	Bifeprunox_ZINC000052971454	-6.2	4
10	Netupitant_ZINC000011681563	-6.2	7

Virtual screening MyD88 sitio 2:

Nº	Compound	Energy	nRot
1	Dihydroergotamine_ZINC000003978005	-7.5	5
2	Hesperidin_ZINC000008214774	-7.5	15
3	R428_ZINC000051951668	-7.4	5
4	Mk3207_ZINC000043203371	-7.3	4
5	Fluazuron_ZINC000002570819	-7.3	5
6	Dovitinib_ZINC000003816310	-7.2	3
7	Glisindamide_ZINC000000537799	-7.1	6
8	Golvatinib_ZINC000043195317	-7.1	8
9	Lumacaftor_ZINC000064033452	-7.1	5
10	Mk3207_ZINC000103760978	-7.1	4

Virtual screening MyD88 sitio 3:

Nº	Compound	Energy	nRot
1	Chir-265_ZINC000018710085	-8.1	7
2	Glisamuride_ZINC000000537797	-7.8	7
3	Abemaciclib_ZINC000072318121	-7.7	7
4	Ditercalinium_ZINC000004215707	-7.5	9
5	Lumacaftor_ZINC000064033452	-7.4	5
6	Farglitazar_ZINC000049639808	-7.4	12
7	Altiratinib_ZINC000113198271	-7.2	8
8	Pomisartan_ZINC000150340377	-7.1	6
9	Fluazuron_ZINC000002570819	-7.1	5
10	Upidosin_ZINC000003796141	-7.1	8