

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



DISEÑO, REFINAMIENTO Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE MODELOS FARMACOFÓRICOS 3D PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE PKNG DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE EL TAMIZAJE VIRTUAL MASIVO DE MOLÉCULAS

ALICIA LIZET ARICA SOSA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA  
EN BIOLOGÍA

Asesor interno: Blgo. Roberto Christian Pineda Chavarria  
Asesor externo: Dr. Miguel Angel Quiliano Meza

Lima, Perú 2021



**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



DISEÑO, REFINAMIENTO Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE MODELOS FARMACOFÓRICOS 3D PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE PKNG DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE EL TAMIZAJE VIRTUAL MASIVO DE MOLÉCULAS

**ALICIA LIZET ARICA SOSA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA  
EN BIOLOGÍA

Asesor interno: Blgo. Roberto Christian Pineda Chavarria  
Asesor externo: Dr. Miguel Angel Quiliano Meza

Lima, Perú 2021

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



DISEÑO, REFINAMIENTO Y EVALUACIÓN *IN SILICO* DE MODELOS FARMACOFÓRICOS 3D PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE PKNG DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE EL TAMIZAJE VIRTUAL MASIVO DE MOLÉCULAS

**ALICIA LIZET ARICA SOSA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA  
EN BIOLOGÍA

**MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR, ASESOR INTERNO Y ASESOR  
EXTERNO**

**PRESIDENTE:** Mg. Mauricio Gonzales Molfino

**SECRETARIO:** Juan Carlos Ramos Gorbeña

**VOCAL:** Blgo. Miguel Dávila Robles

**ASESOR INTERNO:** Blgo. Roberto Pineda Chavarría

**ASESOR EXTERNO:** Dr. Miguel Angel Quiliano Meza

## **DEDICATORIA**

A mis padres por brindarme su apoyo a lo largo de la carrera y forjarme como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo en gran parte a ustedes, incluyendo este.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, por dame vida, salud y sabiduría a lo largo del camino.*

*Al apoyo económico brindado por el Gobierno del Perú en mi condición de tesista de proyecto. Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC - FONDECYT en el marco de la convocatoria “Proyectos de Investigación Básica 2019-01” [406-2019].*

*A mi director de tesis y mentor, el Dr. Miguel Angel Quiliano Meza. Gracias por todos sus consejos, enseñanzas, oportunidades e infinita paciencia.*

*Y a todas esas personas que han contribuido dándome ánimo, palabras de aliento y fuerza. Gracias por creer en mí.*

# ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN .....	3
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	5
III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
IV. OBJETIVOS.....	7
4.1.Objetivo General.....	7
4.2.Objetivo Específicos .....	7
V. MARCO TEÓRICO.....	8
5.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).....	8
5.2 Tuberculosis (TB).....	8
5.3. Resistencia a los medicamentos antituberculosos .....	9
5.4. Tuberculosis Multirresistente (TB-MDR) .....	11
5.5. Tuberculosis Extremadamente Resistente (TB-XDR) .....	11
5.6. Proteína quinasa Serina/Treonina G (PknG) .....	11
5.7. Descubrimiento de fármacos .....	12
5.8. Farmacóforo .....	13
5.9. Curva ROC y AUC.....	13
5.10 Descriptores de desempeño.....	14
5.11 Acoplamiento molecular .....	15
5.12 LigandScout .....	17
VI. ANTECEDENTES.....	18
VII. HIPOTESIS .....	19
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
8.1 Lugar de ejecución.....	20
8.2 Tipo y diseño de investigación .....	20
8.3 Variables .....	23
8.4 Operacionalización de las variables y muestreo .....	23
8.5 Metodología .....	25
8.5.1 Hardware y software .....	25

A.	Diseñar modelos farmacofóricos 3D para la búsqueda de inhibidores de PknG de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizando las aproximaciones “Basado en el receptor” y “Basado en el ligando”.	25
8.5.2	Búsqueda bibliográfica	25
8.5.3	Aproximación basada en el receptor	25
8.5.4	Aproximación basada en el ligando	26
B.	Refinar y validar en forma teórica los modelos farmacofóricos generados mediante el uso de compuestos señuelos e información disponible en la literatura (Verdaderos Positivos y Verdaderos Negativos).	27
8.5.5	Refinamiento	27
8.5.6	Validación teórica	27
C.	Seleccionar y evaluar in silico los potenciales nuevos inhibidores producto del uso de los modelos farmacofóricos refinados y el tamizaje masivo de bibliotecas virtuales.	28
8.5.7	Tamizaje masivo usando modelos basados en el receptor	28
8.6	Aspecto ético	29
IX.	RESULTADOS	30
A.	Diseñar modelos farmacofóricos 3D para la búsqueda de inhibidores de PknG de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizando las aproximaciones “Basado en el receptor” y “Basado en el ligando”.	30
9.1	Búsqueda bibliográfica	30
9.2	Aproximación basada en el receptor	46
9.2.1	Validación del protocolo de acoplamiento molecular para la Serie A-C	46
9.2.2	Diseño de farmacóforo para Serie A-C	48
9.2.3	Validación del protocolo de acoplamiento molecular para las Aminopirimidinas	58
9.2.4	Diseño de farmacóforo para Aminopirimidinas	60
9.3	Aproximación basada en el ligando	67
9.3.1	Diseño de farmacóforo para la Serie A-C	67
9.3.2	Diseño de farmacóforo para Aminopirimidinas	72
B.	Refinar y validar en forma teórica los modelos farmacofóricos generados mediante el uso de volúmenes de exclusión, compuestos señuelos, información disponible en la literatura (Verdaderos Positivos y Verdaderos Negativos) y análisis de desempeño	78
9.4	Modelos en la aproximación basados en el receptor	78
9.4.1	Serie A-C	78
9.4.2	Aminopirimidinas	84

9.5 Modelos en la aproximación basados en el ligando.....	91
9.5.1 Serie A-C .....	91
9.5.2 Aminopirimidinas .....	95
C. Seleccionar y evaluar in silico los potenciales nuevos inhibidores producto del uso de los modelos farmacofóricos refinados y el tamizaje masivo de bibliotecas virtuales.....	99
9.6 Tamizaje masivo usando modelos basados en el receptor.....	99
9.6.1 Serie A-C .....	99
9.6.2 Aminopirimidinas .....	108
9.7 Tamizaje masivo usando modelos basados en el ligando.....	113
9.7.1 Serie A-C .....	113
9.7.2 Aminopirimidinas .....	117
X. DISCUSIONES.....	118
XI. CONCLUSIONES .....	122
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	123
XIII. ANEXOS .....	131

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* que, a pesar de ser prevenible y curable, viene siendo considerada un riesgo para la salud pública debido a su incidencia y prevalencia a nivel mundial. Pese a la disponibilidad de fármacos antituberculosos, la existencia de cepas multirresistentes y extremadamente resistentes conlleva a la búsqueda de nuevas dianas esenciales. PknG es una proteína serina/treonina quinasa que juega un rol crucial en la supervivencia de esta micobacteria, así como también en la prevención de la fusión fagosoma-lisosoma evitando la degradación y permitiéndole vivir en estado de latencia dentro de los macrófagos hasta tener las condiciones adecuadas en el organismo del hospedero para volver a proliferar causando nuevamente la enfermedad. La presente tesis diseñó, optimizó, validó y evaluó *in silico* cuatro modelos farmacofóricos para los compuestos de la serie A-C y aminopirimidinas. Los modelos fueron usados posteriormente en conjunto con el clúster virtual “Drug Hunter” en Amazon Web Service (AWS) para realizar tamizajes virtuales usando las bases de datos ChEMBL21 de 1,578,014 moléculas y ProdNat de 111,000 moléculas. Los tamizajes arrojaron 689 hits en ChEMBL21 y 222 hits en ProdNat. Finalmente, los hits se redujeron a 32 candidatos después de ser analizados mediante cálculos de acoplamiento molecular, análisis de energía de unión, puntaje de Pharmacophore Fit-score, interacciones de importancia dentro del sitio activo y disponibilidad comercial ( 27 candidatos de ChEMBL21 y 5 candidatos de ProdNat). Esta investigación se realizó en el Centro de Investigación e Innovación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) con el apoyo económico de CONCYTEC-FONDECYT.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, PknG, LigandScout, farmacóforos, sitio activo, inhibición, tamizaje virtual

## ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* which, despite being preventable and curable, has been considered a risk to public health due to its incidence and prevalence worldwide. Despite the availability of anti-tuberculosis drugs, the existence of multi-resistant and extremely resistant strains leads to the search for new essential targets. PknG is a serine/threonine kinase protein that plays a crucial role in the survival of this mycobacterium, as well as in the prevention of phagosome-lysosome fusion avoiding degradation and allowing it to live in a latency within macrophages until it has the necessary adequate conditions in the host's organism to re-proliferate causing the disease again. This thesis designed, optimized, validated and evaluated *in silico* four pharmacophoric models for the A-C series compounds and aminopyrimidines. The models were later used in conjunction with the virtual cluster "Drug Hunter" on Amazon Web Service (AWS) to perform virtual screenings using the databases ChEMBL21 of 1,578,014 molecules and ProdNat of 111,000 molecules. The screenings yielded 689 hits on ChEMBL21 and 222 hits on ProdNat. Finally, the hits were reduced to 32 candidates after being analyzed by molecular docking calculations, binding energy analysis, Pharmacophore Fit-score, key interactions within the active site, and commercial availability (27 candidates from ChEMBL21 and 5 candidates from ProdNat). This research was carried out at the Research and Innovation Center of the Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) with the financial support of CONCYTEC-FONDECYT.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, PknG, LigandScout, pharmacophores, active site, inhibition, virtual screening

## I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que afecta a más de un tercio de la población a nivel global convirtiéndose así en un problema de gran interés (Alarcón, *et al.* 2017). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estimó que, en el año 2019, más de 10 millones de personas desarrollaron Tuberculosis y perecieron cerca de 1.5 millones. Debido a que es considerada un problema de salud pública, la OMS ha planteado una estrategia llamada “Fin de la Tuberculosis” (Organización Mundial de la Salud. 2016) la cual tiene como objetivo poner fin a la epidemia mundial de TB teniendo como indicadores haber reducido para el año 2035 la mortalidad en un 95% y su incidencia en un 90% en comparación del 2015. El mayor porcentaje de incidencia de TB en América Latina le corresponde a 12 países incluido Perú, notificando en el 2019, 39000 casos de TB de los cuales fallecieron 2400 y 490 por coinfección con VIH (World Health Organization. 2020). Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, localizándose generalmente en el pulmón, pero siendo capaz de afectar otros órganos. Cuando el individuo presenta la bacteria en su organismo, pero esta no enferma a su hospedero debido a su sistema inmune fuerte, se denomina como una infección de TB en latencia; no puede transmitir la bacteria a los demás (Álvarez, *et al.* 2009), aunque por lo general, tienen una reacción positiva en la prueba cutánea de tuberculina y/o dar un resultado positivo en un examen de sangre. Sin embargo, si la persona manifiesta un sistema inmunológico débil o comprometido, la bacteria de la TB se vuelve activa multiplicándose y causando la infección, siendo las personas portadoras del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) quienes tienen mayores probabilidades de enfermarse con TB por coinfección y perecer debido a la enfermedad (Úriz, *et al.* 2007). La Norma Técnica de Tuberculosis del Perú, categoriza de 4 maneras a la TB resistente a medicamentos: TB resistente a isoniacida (H), TB resistente a rifampicina (R), TB multidrogaresistente (TB-MDR) si la resistencia es a H y R, y TB extensamente resistente (TB-XDR) si además de crear resistencia a H y R también lo es a una fluoroquinona y a un inyectable de segunda línea (MINSA. 2013) A raíz del incremento de resistencia, existe la necesidad de buscar una alternativa terapéutica que logre establecer una utilidad frente a este problema (Alarcón, *et al.* 2017).

El diseño de fármacos asistidos por computadora (DIFAC) es un proceso con mucha complejidad que ha permitido generar metodologías y simulaciones de procesos biológicos que ayudan en el procesamiento de datos con la finalidad de evaluar e identificar potenciales fármacos (Prieto, *et al.* 2018) favoreciendo así a desarrollar fármacos que actualmente puede ser encontrados en el mercado como es el caso por ejemplo del Crizotinib, Rilpivirina, Zolboraf, Boceprevir, Captopril, entre otros (Saldívar-González, *et al.* 2016). Una de estas metodologías computacionales del DIFAC se basa en el diseño de Farmacóforo, el cual es definido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como "el conjunto de características estéricas y electrónicas que es necesario para asegurar

las interacciones supramoleculares óptimas con una estructura diana biológica específica y para activar (o bloquear) su respuesta biológica" (Wermuth, *et al.* 1998). En vinculación con el cribado virtual se puede utilizar estos Farmacóforos para buscar futuros fármacos viables mediante el acoplamiento entre un receptor y un ligando, proceso conocido como Docking-Based Virtual Screening (DBVS) (Chen, *et al.* 2009).

El genoma de *Mtb* codifica once proteínas quinasas Serina/Treonina ( PknA, PknB, PknD, PknE, PknF, PknG, PknH, PknI, PknJ, PknK, y PknL) como las eucariotas y al menos tres de éstas (PknA, PknB y PknG) son esenciales para su crecimiento y supervivencia (Székely, *et al.* 2008). Esta proteína es de importancia debido a que juega un rol fundamental ayudando a la bacteria a poder sobrevivir dentro de los macrófagos causando una infección persistente al interrumpir la formación del fagolisosoma, logrando escapar de la vía de degradación lisosomal (Kaneheiro, *et al.* 2018). En los últimos años numerosos esfuerzos han sido llevados a cabo teniendo como referente a la proteína PknG de *Mtb* ( Caballero, *et al.* 2018; Kan, *et al.* 2018; Koul, *et al.* 2001; Lisa, *et al.* 2015; Scherr, 2008). Pero en cuanto a la búsqueda de inhibidores para PknG mediante el uso de herramientas computacionales, hasta la fecha han sido reportados tres estudios. El trabajo realizado por Santhi & Aishwarya. 2011 utilizando un acoplamiento molecular sencillo de 40 withanolidos (grupo de esteroides provenientes de *Withania somnifera*) en el sitio activo de PknG propone 3 moléculas candidatas para la inhibición de PknG basados en el score de acoplamiento. Swain, *et al.* 2021 realizaron un estudio utilizando una aproximación computacional más rigurosa haciendo uso del acoplamiento molecular para acoplar 477 flavononas, obtenidas de la base de datos de PubChem al sitio activo de PknG, pero complementando sus análisis con predicción farmacocinética, análisis de re-acoplamiento molecular y dinámicas moleculares proponiendo finalmente 6 moléculas candidatas como posibles inhibidores de PknG de *Mtb*. Y por último un estudio similar a este en donde un modelo farmacofórico es usado para encontrar inhibidores de PknG (Singh, *et al.* 2015) sin embargo, dicho estudio solo utilizó la aproximación basada en el ligando con una muy limitada base de datos conformada de 1207 moléculas para realizar una adecuada validación teórica del modelo proponiendo 1 candidato final.

En la presente investigación se hizo uso de DIFAC para diseñar y refinar modelos farmacofóricos inhibitorios de PknG basándose en la aproximación Basado en el receptor (Structure-Based) con la información del receptor, así como con la aproximación Basado en el ligando (Ligand-Based) de acuerdo al ligando con el fin de continuar la formación del fagolisosoma resultando en la degradación de *Mtb* dentro de los macrófagos erradicando la TB latente.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los medicamentos antituberculosos de primera línea como la Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF); y de segunda línea como fluoroquinolonas (levofloxacino y moxifloxacino) e inyectables (kanamicina, amikacina y capreomicina), los cuales han sido utilizados hace ya más de una década, han empezado a demostrar su poca efectividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*, constituyéndose como un problema de salud pública de gran magnitud (Alarcón, *et al.* 2017).

Debido a la aparición de cepas de *Mtb* multirresistentes (MDR-TB) y extensamente resistentes (XDR-TB) a por lo menos cuatro de los principales fármacos por sus diferentes mecanismos de resistencia, se ve la necesidad de emprender una búsqueda de fármacos innovadores que tengan como target proteínas esenciales para la supervivencia de la micobacteria (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. 2013).

De esta forma se plantea la búsqueda de nuevos inhibidores de la proteína PknG de *M. tuberculosis*. Esta proteína perteneciente al grupo de serina/treonina quinasas juega un rol importante en el crecimiento y supervivencia de la bacteria dentro del organismo infectado o huésped. El éxito de *M. tuberculosis* como patógeno se debe, en parte, a su habilidad para sobrevivir largos periodos de tiempo dentro de macrófagos infectados. PknG es secretado por *M. tuberculosis* en los macrófagos de la célula huésped para interferir en sus rutas de señalización y de esta forma bloquear la fusión de los lisosomas con el fagosoma. Está demostrado mediante estudios bioquímicos que la inhibición de la proteína PknG desencadena la degradación de *Mycobacterium tuberculosis* provocado por la fusión del lisosoma y fagosoma (Chakraborti, *et al.* 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Se necesitan nuevos fármacos para combatir la tuberculosis latente, multirresistente y ultrarresistente. La presente tesis pretende contribuir a la lucha global contra la tuberculosis mediante la búsqueda de nuevos inhibidores de la proteína PknG de *M. tuberculosis*.

Como el patógeno más mortal del mundo, *Mycobacterium tuberculosis* fue responsable de la muerte de 1,4 millones de personas en el 2019. En el Perú afecta principalmente a familias de escasos recursos económicos y está presente al menos en diez regiones del Perú. La tuberculosis es una enfermedad que se puede curar y prevenir. Sin embargo, en los últimos años se ha observado la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistente y ultrarresistente debido a la pérdida de eficacia de los fármacos de primera y segunda línea del tratamiento. A esto se suma la estimación de la OMS la cual indica que un cuarto de la población mundial está infectado con *M. tuberculosis* latente. Ante este panorama de epidemia global de la TB, la OMS mediante su estrategia “Fin de la tuberculosis” y el Perú, mediante la Ley 30287 donde declara la lucha frente a TB como un tema de interés nacional, ponen en común políticas sanitarias para erradicar la TB.

De esta forma emergen tres pilares para el logro de los objetivos en común, estos son: Pilar 1; prevención y atención integral de la TB centrada en el paciente; Pilar 2, Políticas audaces y sistemas de soporte, y Pilar 3, Investigación e innovación intensificada. La presente tesis busca reforzar el Pilar 3 a través de la Investigación básica con gran potencial de Innovación proponiendo la búsqueda de potenciales fármacos para combatir la TB. En forma específica, planteando la búsqueda de nuevos inhibidores de la proteína PknG de *M. tuberculosis*.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Diseñar, refinar y evaluar *in silico* modelos farmacofóricos para la búsqueda de nuevos inhibidores de PknG de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el uso de una plataforma de tamizaje masivo.

### 4.2. Objetivo Específicos

- Diseñar modelos farmacofóricos 3D para la búsqueda de inhibidores de PknG de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando las aproximaciones “Basado en el receptor” y “Basado en el ligando”.
- Refinar y validar en forma teórica los modelos farmacofóricos generados mediante el uso de compuestos señuelos e información disponible en la literatura (Verdaderos Positivos y Verdaderos Negativos).
- Seleccionar y evaluar *in silico* los potenciales nuevos inhibidores producto del uso de los modelos farmacofóricos refinados y el tamizaje masivo de bibliotecas virtuales.

## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

Descubierto el 24 de marzo de 1882 por el Dr. Robert Koch, por ello también se le conoce como “Bacilo de Koch” (Koch, R. 1981). Es un bacilo inmóvil, curvo, con un tamaño de aproximadamente 0,2 - 0,6 x 1 - 10 micras ( $\mu\text{M}$ ), aerobio obligado de división lenta y no formador de esporas. Su pared celular presenta una composición compleja al ser dos veces más gruesa y fuerte que los Gram negativos constituyendo una coraza lipídica muy difícil de penetrar (Figura S1), la cual impide realizar una decoloración con ácido y alcohol así como a la desecación, por ende, esta característica coloca a *Mycobacterium tuberculosis* dentro del grupo de las Bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR). Para poder identificarlo, frecuentemente se utiliza la coloración Ziehl-Neelsen ya que, una vez teñidos los bacilos su decoloración no es posible, quedando así coloreados con una tonalidad rojiza (Barba, R. 2020).

### 5.2 Tuberculosis (TB)

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa granulomatosa producida por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) o Bacilo de Koch, localizada generalmente en el pulmón, pero también puede comprometer el hígado, meninges, cerebro, riñones, peritoneo, glándulas suprarrenales, ganglios linfáticos entre otros. Su transmisión se debe a la inhalación de gotas de aerosol (gotas de Flügge), las que contienen *Mtb*, eliminadas por individuos enfermos al estornudar, hablar o toser ya que al ser expulsadas aquellas gotas de entre 1 a 5 micras de diámetro pueden permanecer suspendidas en el ambiente por periodos de tiempo prolongados alcanzando el alveolo pulmonar las áreas medias e inferiores de los pulmones como implantación inicial (Murillo, *et al.* 2006).

Una vez *Mtb* ingresa al organismo tiene cuatro posibles destinos: a) La respuesta inmunológica inicial del organismo es 100% efectiva y eliminará a todos los bacilos impidiendo la proliferación y la enfermedad, b) El bacilo comienza a multiplicarse por una baja respuesta inmunitaria por parte del huésped causando una TB primaria progresiva, c) Los bacilos pueden quedar en un estado latente dentro de los macrófagos pero sin causar la enfermedad solo manifestándose como positivo en una prueba de tuberculina, d) Luego de un tiempo, los bacilos en estado latente pueden comenzar a crecer causando una TB de reactivación (Ministerio de la Protección Social. 2011).

Para el tratamiento de esta enfermedad se debe de tomar muy en cuenta la combinación correcta de

los medicamentos y el régimen terapéutico a utilizar. Si se presume o se sabe que se padece de una TB sensible a fármacos el tiempo varía entre 2 a 4 meses utilizando medicamentos de primera línea; Si es una alta probabilidad de ser Tuberculosis multirresistente, el tiempo va desde los 8 meses con cuatro medicamentos antituberculosos de segunda línea además de la pirazinamida , hasta los 20 meses; Y si es una TB-MDR confirmada susceptible a fluoroquinolonas y agentes inyectables de segunda línea, la fase intensiva del tratamiento tendrá un tiempo de entre 4 a 6 meses con siete medicamentos antituberculosos de segunda línea del régimen estandarizado más corto para la TB-MDR, siguiendo con la fase de continuación hasta los 5 meses con cuatro medicamentos antituberculosos de segunda línea (World Health Organization. 2020).

### 5.3. Resistencia a los medicamentos antituberculosos

La resistencia a medicamentos se origina debido al uso indiscriminado de antibióticos ya que al ser utilizados por un tiempo prolongado y de manera innecesaria, incitan a que ocurran mutaciones en los organismos, los cuales pueden desarrollar mecanismos de resistencia en respuesta (Cegielski, J. 2018).

Los medicamentos antituberculosos han sido reclasificados por la OMS luego de haber evaluado toda la evidencia disponible, su nivel de certeza, relación entre los efectos deseables - no deseables y su viabilidad en la implementación (World Health Organization, 2016) de la siguiente manera:

#### **Medicamentos antituberculosos que se utilizan en el régimen “estándar” de tratamiento corto para TB sensible a fármacos**

**Isoniazida (INH):** Ha sido el fármaco clave y el más eficaz durante un periodo de más de 60 años. Se utiliza en combinación con otros fármacos antituberculosos como también en para tratar a personas con TB latente. Su concentración bactericida es de 0.02 - 0.2 µg / ml para las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* (Kayukova y Berikova, 2020).

**Rifampicina (RIF):** Bactericida de amplio espectro, activo contra bacterias Gram positivas, algunas micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, y contra ciertas bacterias Gram negativas. Debe de ser administrada en conjunto con otros medicamentos ya que de administrarse por sí sola, va creando paulatinamente resistencia (Ministerio de la protección Social, 2011).

**Pirazinamida (PZA):** Bactericida. Actúa de manera eficaz en medio ácido ejerciendo una acción

esterilizante sobre los bacilos. Esta forma de acción en no es típica en los otros fármacos antituberculosos.

**Etambutol (EMB):** Bacteriostático. Su actividad está relacionada a su estereoespecificidad, por ello su isómero D es el más utilizado por ser 600 veces más activo contra TB que su isómero L (Kayukova y Berikova, 2020).

Los cuatro grupos a continuación se utilizan para una TB resistente a fármacos:

- **Grupo A. Fluoroquinolonas - Antibióticos de amplio espectro**
  - Levofloxacino (Lvx)
  - Moxifloxacino (Mfx)
  - Gatifloxacino (Gfx)
  
- **Grupo B. Agentes de segunda línea inyectables - Presentan actividad bactericida**
  - Amikacina (Am)
  - Capreomicina (Cm)
  - Kanamicina (Km)
  - Estreptomina (S)
  
- **Grupo C. Otros agentes centrales que pertenecen a la segunda línea**
  - Etionamida / Protionamida (Eto / Pro)
  - Cicloserina / Terizidona (Cs / Trd)
  - Linezolid (Lzd)
  - Clofazimina (Cfz)
  
- **Grupo D. Agentes complementarios**
  - D1. Pirazinamida
    - Etambutol
    - Dosis elevadas de isoniazida
  - D2. Bedaquilina (Bdq)
    - Delamanida (Dlm)
  - D3. Ácido p - aminosalicílico (PAS)
    - Imipenem - cilastatina (Ipm)
    - Meropenem (Mpm)
    - Amoxicilina - Clavulanato (Amx-Clv)

– Tioacetazona (T)

A lo largo de los años, la aparición de cepas de *Mtb* resistentes a los fármacos antituberculosos han constituido un gran problema para el control de la enfermedad catalogándola de acuerdo a su resistencia como: Tuberculosis Multirresistente (TB-MDR), Tuberculosis Extremadamente Resistente (TB-XDR).

5.4. Tuberculosis Multirresistente (TB-MDR)

TB que se caracteriza por tener resistencia por lo menos a dos fármacos de primera línea: Isoniacida y Rifampicina, los cuales son los dos medicamentos antituberculosos de mayor impacto.

5.5. Tuberculosis Extremadamente Resistente (TB-XDR)

Tipo de TB resistente no solo a la Isoniacida y Rifampicina, sino también a todas las fluoroquinolonas de última generación (Levofloxacin, Moxifloxacin) y por lo menos a tres fármacos inyectables pertenecientes a la segunda línea, como por ejemplo Kanamicina, Amikacina y Capreomicina.

Debido a esta gran resistencia, las opciones de tratamiento para pacientes que presentan TB-XDR son menos eficaces (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. 2013).

5.6. Proteína quinasa Serina/Treonina G (PknG)

La estructura cristalizada de PknG junto con su inhibidor se encuentre en el Protein Data Bank bajo el código 2PZI (Figura S2A y S2B) (Scherr, *et al.* 2007). PknG es una proteína quinasa de 82 KDa que contiene tres dominios: Un dominio de Rubedroxina (Rbdx) en el lóbulo N-terminal que se caracteriza por presentar dos pares de cisteínas que pueden interactuar con una molécula de hierro para una posible transferencia de electrones, lo que sugiere que tendría una función de sensor redox (O' Hare, *et al.* 2008); un motif tetratricopeptido (TPR) en el lóbulo C que puede participar en las interacciones proteína - proteína y a su vez regular la actividad quinasa. (Chakraborti, *et al.* 2011). Y un dominio quinasa central en donde se encuentra su sitio catalítico de unión de ATP, este dominio contiene los tres aminoácidos esenciales de la región bisagra, Glu233, Tyr 234 y Val235; dos aminoácidos únicos en su parte N-terminal que confieren un nuevo pocket hidrofóbico cerca de la

región bisagra contribuyendo a una mayor selectividad Ile87 y Ala92; una lisina catalítica Lys181, una metionina gatekeeper Met 232 y dos paredes hidrofóbicas orientadas hacia los lóbulos N (Ile157, Ile165, Val179) y C (Val211, Ile292, Met283) (Caballero, *et al.* 2018). Su dímero se forma a través de múltiples contactos entre los dominios TPR de cada monómero y no por interacciones de los lóbulos N. (Figura S2C). PknG se ubica en el citoplasma de la bacteria debido a que carece de un dominio transmembrana. Esta proteína quinasa se encuentra implicada tanto en la virulencia como también en la supervivencia de la bacteria al inhibir la fusión fagolisosómica, escapando de la degradación lisosomal y permitiéndole residir dentro de los macrófagos.

### 5.7. Descubrimiento de fármacos

El descubrimiento de fármacos es un proceso que sirve para identificar un compuesto útil que pueda colocar a disposición nuevos acercamientos para prevenir, tratar, amainar o curar una enfermedad (Kapetanovic, I. 2011). El descubrimiento de fármacos de manera tradicional implica que se deban de identificar candidatos, sintetizarlos, caracterizarlos, realizar un cribado masivo en laboratorio para luego optimizar el proceso, efectuar ensayos de eficacia y una vez que el compuesto logre demostrar su efectividad habiendo pasado exitosamente por la fase pre clínica y las 4 fases clínicas es recién ahí en donde se puede enviar al mercado. Todo este desarrollo toma una cantidad aproximada de entre 10 a 15 años y un costo elevado de más de 1.9 billones de dólares (Prakash y Devangi, 2010). Con el tiempo el descubrimiento de fármacos se ha ido actualizando y esto se puede observar con la implementación del cribado de alto rendimiento (HTS) quien hace uso de robótica, software de procesamiento, manejo de muestras y detectores de sensibilidad haciendo posible testear una gran cantidad de compuestos activos con moléculas potenciales (Entzeroth, *et al.* 2009). Sin embargo, el uso de HTS lleva consigo algunas desventajas como por ejemplo la obtención de la maquinaria, la adquisición de las moléculas o compuestos candidatos, el acondicionamiento y la capacitación de personal, por ello se siguen recurriendo a nuevas alternativas, como lo es el tamizaje virtual (Virtual Screening).

Este proceso consta en identificar posibles targets o moléculas diana de acuerdo a la bibliografía experimental depositada en las diferentes bases de datos, así como también en artículos científicos, estudiar a profundidad su estructura y características esenciales, utilizar softwares especializados para realizar modelos farmacofóricos viables y validados basados en el receptor o basados en ligandos dependiendo de la información que se obtenga, para utilizarlos en un tamizaje virtual frente a librerías de miles o millones de moléculas con la finalidad de obtener potenciales hits que seguirán siendo testeados (Prakash y Devangi, 2010). Los hits obtenidos son probados con diversos parámetros computacionales como Docking, dinámicas moleculares, filtros ADMET entre otros.

## 5.8. Farmacóforo

De acuerdo con la definición de la IUPAC, un farmacóforo “es un conjunto de características estéricas y electrónicas que son necesarias para asegurar la óptima interacción supramolecular con un blanco biológico específico y para activar (o bloquear) su respuesta biológica” (Wermuth, *et al.* 1998).

Cabe destacar que no representa a una molécula real y definida, sino que provee una matriz de la disposición 3D de las características necesarias para representar las funcionalidades químicas de los grupos funcionales, un conjunto de características y cualidades como: Donadores de enlace de hidrógeno (HBD), aceptores de enlace de hidrógeno (HBA), áreas hidrofóbicas (H), grupo ionizable positivo (PI), grupo ionizable negativo (NI) y sus restricciones de tamaño mejor conocidas como volúmenes de exclusión (XVOL). El objetivo de realizar un modelado y tamizaje virtual utilizando farmacóforos es poder identificar las moléculas con un perfil de actividad biológica determinado dentro de una librería amplia compuesta de miles o millones de moléculas. Estas moléculas detectadas, también llamadas “hits” o aciertos, cumplen el requisito indispensable de encajar en el conjunto de patrones estéricos y electrónicos llamado farmacóforo (Vuorinen y Schuster, 2015). (Figura S3).

Es preciso señalar que el desarrollo de un modelo farmacofórico de buena calidad pasa por varios pasos de modelado y refinamiento (Seidel, *et al.* 2010), debe de ser validado teóricamente con toda la información disponible antes de ser utilizado en el cribado masivo de moléculas. Una vez obtenida la lista de hits potenciales y analizados *in silico*, estos resultados pueden pasar a ser validados experimentalmente. Dependiendo de los resultados experimentales, el modelo farmacofórico puede ser mejorado con la nueva data generada y lanzado a un nuevo cribado de ser el caso (Figura S4).

## 5.9. Curva ROC y AUC

Representa de manera visual y numérica el rendimiento del modelo al realizar la clasificación de moléculas demostrando su relación entre la sensibilidad y 1-especificidad obtenidos al considerar todos los posibles valores de corte de la prueba. La exactitud de la detección del modelo es plasmada en un diagrama en donde de ser una detección ideal o casi perfecta la curva empieza desde el origen desplazándose hacia el vértice superior izquierdo y luego con una línea recta horizontal hacia el vértice superior derecho lo que corresponde a una Sensibilidad = 1 y 1-Especificidad = 1. El AUC (Area bajo la curva) mide toda el área por debajo de la curva ROC interpretándose como la probabilidad de que el modelo logre clasificar de manera aleatoria los verdaderos positivos por

encima de los falsos positivos o los negativos (Braga, *et al.* 2013) (Figura S5).

#### 5.10 Descriptores de desempeño

- Sensibilidad - Proporción de los compuestos verdaderos positivos (TP) recuperados con respecto a todos los compuestos activos en la base de datos. (valores del 0 - 1 )
- Especificidad - Proporción de los compuestos determinados como verdaderos negativos (TN) con respecto a todos los compuestos negativos en la base de datos. (valores del 0 - 1 )
- Factor de desempeño (EF) - Mide el rendimiento de las moléculas activas (YA) proporcionalmente al ratio de activos en la base de datos, en donde A es el número total de activos en la base de datos y D es el número total de moléculas que conforman la base de datos.
- Günner-Henry score (GH) - Este descriptor toma en cuenta tanto el rendimiento de activo (YA) como el porcentaje de activos que se detecten en la base de datos obteniendo una medida acerca de la calidad de la lista de aciertos detectados por el farmacóforo. (valores del 0 - 1 )
- ROC (Curva ROC) - Representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad que demuestra el desempeño del modelo frente a la recuperación de moléculas en la base de datos.
- AUC ( Área bajo la curva ) - Área que se encuentra por debajo de la curva ROC que se interpreta como la probabilidad de que el modelo clasifique una molécula activa aleatoria más alta que una molécula inactiva aleatoria.

Para calcular estos descriptores es necesario aplicar las siguientes fórmulas matemáticas:

$$GH = \left( \frac{Tp (3A + Ht)}{4HtA} \right) \left( 1 - \frac{Ht - Tp}{D - A} \right)$$

$$EF = \frac{YA}{(Tp/D)}$$

$$Se = \frac{Tp}{Tp + Fn}$$

$$Sp = \frac{Tn}{Tn + Fp}$$

$$YA = \frac{Tp}{Ht}$$

$$RA = \frac{Tp}{A}$$

En donde:

- A: N° total de activos en la base de datos
- D: N° total de inactivos en la base de datos
- Tp: Verdaderos positivos
- Tn: Verdaderos negativos
- Fp: Falsos positivos
- Fn: Falsos negativos
- Ht: Hits totales
- D: N° total de moléculas en la base de datos
- YA: Rendimiento de Activos
- RA: Ratio de Activos
- EF: Factor de Enriquecimiento
- GH: Güñner Henry - Score

### 5.11 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular predice la estructura del complejo receptor-ligando utilizando cálculos matemáticos en dos pasos: primero muestrea las conformaciones del ligando dentro del sitio activo del receptor y luego clasifica estas conformaciones en base a una función de puntuación (Score). Los algoritmos utilizados en el muestro reproducen el modo de unión experimental y la función de puntaje les brinda el mayor puntaje a las mejores conformaciones (Meng, *et al.* 2011).

#### **Algoritmos de muestreo:**

- **Algoritmos coincidentes (MA):** Basado en la forma molecular, mapea un ligando dentro del sitio activo del receptor de acuerdo a la forma e información de características químicas. Aquí se encuentran los farmacóforos.

- **Método de construcción incremental (IC):** Divide al ligando en varios fragmentos rompiendo sus enlaces rotables, luego se selecciona un fragmento grande de ligando que puede tener un papel funcional significativo para que se acople molecularmente al receptor, este fragmento sirve de ancla para que los demás fragmentos puedan ser agregados de forma incremental.
- **LUDI:** Su objetivo se centra en los enlaces de hidrógeno y los enlaces hidrófobos que se forman entre el ligando y el receptor. Genera un conjunto de sitios de interacción buscando en la base de datos o utilizando reglas.
- **Método estocástico:** Busca en el espacio conformacional modificando de manera aleatoria la conformación del ligando.
- **Método de Monte Carlo:** Genera varias poses del ligando a través de la rotación de sus enlaces, traslación o rotación, luego la conformación escogida es probada en un criterio de selección basado en energía.

### **Funciones de puntaje:**

- **Funciones clásicas basadas en campo de fuerza:** Calculan la energía con la suma de las interacciones electrostáticas y de Van de Waals. Mientras que las interacciones electrostáticas son calculadas por la fórmula de ley de Coulomb.
- **Extensiones de las funciones de puntuación basadas en campo de fuerza:** Consideran los enlaces de puentes de hidrógeno, solvataciones y entropía.
- **Función de puntuación empírica:** Descompone la energía de unión en varios componentes energéticos como enlaces de puente de hidrógeno, interacción iónica, interacción hidrófoba y entropía. Luego cada componente se multiplica por un coeficiente y se suman para dar un puntaje final.
- **Función basada en el conocimiento:** Utiliza el análisis estadístico de los complejos proteína-ligando para obtener la frecuencia de las interacciones interatómicas y la distancia entre el ligando y el receptor. Su estadística se basa en que a más favorable una interacción, mayor será la frecuencia de ocurrencia de dicha interacción.

- **Puntuación por consenso:** Combina varias puntuaciones para evaluar la conformación de acoplamiento molecular. Acepta la pose del ligando potencial dentro del sitio activo cuando esta puntúe bien en las diferentes funciones de puntuación.

### 5.12 LigandScout

LigandScout es un software avanzado para el diseño y modelamiento molecular que ha ido evolucionando a partir de su prototipo lanzado en el año 2005. Se caracteriza por ser un potente generador de modelo farmacofóricos basados tanto en la estructura de la molécula diana y de ligandos reportados. Utiliza diversos algoritmos para realizar alineaciones e interpretar y a su vez personalizar interacciones ligando-macromolécula. (Figura S6A) Tiene la capacidad de crear, cargar y utilizar amplias bibliotecas de compuestos para realizar el tamizaje virtual y tener una detección *in silico* rápida y precisa (Inteligand 2019) (Figura S6B).

En algunos casos cuando no se dispone de datos pertenecientes a la estructura tridimensional del receptor de la proteína target, el diseño del farmacóforo puede basarse en los ligandos conocidos de dicha proteína para obtener como punto de partida las características esenciales necesarias para realizar una correcta interacción. Este enfoque se conoce como "diseño de farmacóforo basado en ligandos" (Aproximación Ligand-Based). Por otro lado, si por el contrario se tiene la información de la estructura del receptor de la proteína target más se desconocen los ligandos, se utiliza esta información y se analiza el sitio activo para diseñar un farmacóforo basado en las características estructurales del pocket. Este enfoque se conoce como "diseño de farmacóforo basado en receptor" (Aproximación Structure-Based) (Wolber y Langer, 2005).

## VI. ANTECEDENTES

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que se encuentra entre las 10 primeras causas de muerte a nivel global teniendo una clasificación superior al VIH/SIDA. Con un diagnóstico oportuno, la mayoría de las personas que desarrollan TB pueden curarse y reducir la transmisión siempre y cuando concluyan el tratamiento el cual puede variar entre 6 – 9 meses, pero puede postergarse hasta más de 20 meses aproximadamente si se presenta como una TB resistente a medicamentos (World Health Organization, 2016). Sin embargo, existe un porcentaje alto de pacientes que abandonan el tratamiento, colocando en riesgo su salud y ayudando a la enfermedad a propagarse.

La resistencia a los fármacos se produce cuando ocurren mutaciones en los microorganismos como respuesta al mal uso indiscriminado del medicamento convirtiéndolo en un método ineficaz para combatir la enfermedad; esta resistencia produce un incremento en los costos médicos, prolongada estancia en los centros hospitalarios y una considerable alza de mortalidad (Serra, 2017). Gracias al avance de la tecnología y a la disposición de información, es posible tomar un nuevo rumbo para la creación de fármacos con la finalidad de hacerle frente a este problema de resistencia.

En la actualidad, el modelado de farmacóforos es una de las herramientas exitosamente utilizadas en el diseño de medicamentos asistidos por computadora (Computer-Aided Drug Design - CADD) desde la identificación de distintas aplicaciones para compuestos existentes y el hallazgo de nuevos compuestos, por ejemplo: El descubrimiento de ocho derivados de isoflavonas ( $IC_{50} = 6.9 - 4.8\mu M$ ) como inhibidores potenciales no esteroideos de la  $5\alpha$ -reductasa en ratas (Chen, *et al.* 2001), La detección virtual de inhibidores de la aldosa reductasa humana para evitar complicaciones en la diabetes crónica obteniendo seis inhibidores viables ( $IC_{50} < 1\mu M$ ) (Kraemer, *et al.* 2004), La búsqueda y descubrimiento de nuevos inhibidores de CDK1, quinasa dependiente de ciclina 1, mediante la combinación de modelos de farmacóforos, análisis QSAR y tamizaje virtual *in silico* seguido de bioensayo *in vitro* para medir la inhibición de la enzima (Mahmoud, *et al.* 2010), La detección virtual de nuevos inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico contra el cáncer de mama, siendo los compuestos seleccionados examinados *in vitro* para determinar su actividad anticancerígena contra la línea celular de cáncer de mama Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) y obteniendo como resultado 2 compuestos capaces de inhibir significativamente la proliferación de estas células con valores de  $IC_{50}$  de 327nM y 370 nM respectivamente (Mahernia, *et al.* 2017).

Un nuevo modelo de farmacóforo para el diseño de ligandos Sigma-1, proteína chaperona, los cuales fueron validados en un gran conjunto de datos experimentales (Pascual, *et al.* 2019), Diseño de fármacos basados en farmacóforos para la identificación de nuevos inhibidores de

Butirilcolinesterasa contra el Alzheimer (Jiang, *et al.* 2018), entre otros.

Un antecedente de gran importancia en este proyecto es el de Caballero, *et al.* 2018, ya que realiza una investigación exhaustiva y detallada de las características estructurales de las Proteínas quinasas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTPKns) centrándose en su sitio de unión con el ATP y revelando los residuos más importantes para establecer interacciones químicas con sus inhibidores.

A pesar de no tener completamente esclarecidos los mecanismos de *Mtb* al momento de inhibir la formación fagolisosomal, Walburger, *et al.* en 2004 utilizando a *M.bovis* y *M.smegmatis* apuntaron los primeros indicios al demostrar luego de una serie de experimentos que PknG es un factor de virulencia el cual es secretado en el fagosoma del macrófago y a su vez modula la señalización e impide la fusión entre el fagosoma y el lisosoma ayudando a la supervivencia de la micobacteria. También se ha logrado demostrar que para asegurar esta supervivencia dentro del macrófago otro mecanismo es la autofosforilación de PknG (Scherr, *et al.* 2009).

## **VII. HIPOTESIS**

Los modelos farmacofóricos 3D y el tamizaje virtual masivo de moléculas permiten en forma rápida y eficiente la búsqueda de potenciales nuevos inhibidores de PknG de *Mycobacterium tuberculosis*.

## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Lugar de ejecución**

El proyecto se llevó a cabo en el Centro de Investigación e Innovación, en la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Lima, Perú.

### **8.2 Tipo y diseño de investigación**

Trabajo de tipo experimental. Los experimentos in silico consistieron en simulaciones de procesos biológicos. Se logró mediante:

- Diseño de modelos farmacofóricos 3D.
- Selección del mejor modelo farmacofórico.
- Uso de modelos en los tamizajes.
- Tamizajes finales para el descubrimiento de inhibidores de PknG.

Objetivos específicos	Variable	Indicador
Diseñar modelos farmacofóricos 3D para la búsqueda de inhibidores de PknG de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizando las aproximaciones “Basado en el receptor” y “Basado en el ligando”	Información estructural de la proteína PknG para la construcción de modelos farmacofóricos	Información tridimensional (coordenadas x, y, z) sobre los aminoácidos que conforman el sitio catalítico y activo de la proteína. Información extraída de los respectivos archivos PDB (archivos .pdb)
	Ligandos inhibidores de proteína G	Compuestos orgánicos con acción inhibitoria comprobada en PknG mediante ensayos in vitro. Estructuras químicas almacenadas en archivos SMILES, SDF y PDB (archivos .smi, .sdf y .pdb)
	Características del farmacóforo	Conjunto de características estéricas y electrónicas responsables de una actividad biológica específica. Estas pueden ser:  Donadores de puentes de hidrógeno, aceptores de puente de hidrógeno, área ionizable positiva, área ionizable negativa, Interacciones hidrofóbicas, anillo aromático, ubicación de enlace de hierro, ubicación de enlace de zinc, ubicación de enlace de magnesio,

		<p>ubicación de enlace de manganeso, donador de enlaces halógenos y volumen de exclusión.</p> <p>Estas características se representan gráficamente mediante esferas y flechas de colores</p>
Refinar y validar en forma teórica los modelos generados mediante el uso de compuestos señuelos e información disponible en la literatura (Verdaderos Positivos y Verdaderos Negativos)	Tolerancia de características farmacofóricas	<p>Puntuación numérica de ajuste tridimensional el cual permite calcular el “Pharmacophore fit”. Valores amplios permitirán un alineamiento más fácil (más permisivo). Valores pequeños hacen más estricto y preciso el alineamiento</p>
Seleccionar y evaluar in silico los potenciales nuevos inhibidores producto del uso de los modelos farmacofóricos refinados y el tamizaje masivo de bibliotecas virtuales	Matching Features	Consenso visual de aparición de las características farmacofóricas. Estas características se representan gráficamente mediante cuadrados de colores
	Pharmacophore Fit	Puntuación numérica de ajuste tridimensional entre los ligandos y el farmacóforo. Este considera el alineamiento espacial de las características farmacofóricas

### 8.3 Variables

- Información estructural de la proteína PknG para la construcción de modelos farmacofóricos
- Ligandos inhibidores de proteína G
- Características del farmacóforo
- Tolerancia de características farmacofóricas
- Matching Features
- Pharmacophore Fit

### 8.4 Operacionalización de las variables y muestreo

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Nivel de medición</b>
Información estructural de la proteína PknG para la construcción de modelos farmacofóricos	Las proteínas quinasas fosforilan las proteínas de su sustrato en la célula y de esta manera activa o inhiben un proceso biológico o bioquímico	Cualitativa	Nominal
Ligandos inhibidores de proteína G	Ligandos con información experimental inhibitoria a PknG	Cualitativa	Nominal
Características del farmacóforo	Conjunto de características estéricas y electrónicas responsables de una actividad biológica específica. Estas pueden ser:	Cualitativa	Nominal

	Donadores de puentes de hidrógeno, aceptores de puente de hidrógeno, área ionizable positiva, área ionizable negativa, Interacciones hidrofóbicas, anillo aromático, ubicación de enlace de hierro, ubicación de enlace de zinc, ubicación de enlace de magnesio, ubicación de enlace de manganeso, donador de enlaces halógenos y volumen de exclusión		
Tolerancia de características farmacofóricas	Puntuación numérica de ajuste tridimensional el cual permite calcular el "Pharmacophore fit". Valores amplios permitirán un alineamiento más fácil (más permisivo). Valores pequeños hacen más estricto y preciso el alineamiento	Numérica	Razón
Matching Features	Dato identificado mediante el Software LigandScout que representa las características propias del Farmacóforo.	Cualitativa	Nominal
Pharmacophore Fit	Valor numérico identificado mediante el software LigandScout, que mide el nivel de ajuste del farmacóforo	Numérica	Razón

## 8.5 Metodología

### 8.5.1 Hardware y software

El diseño y refinamiento de los modelos farmacofóricos fueron realizados en una misma estación de trabajo Acer Aspire ES1-572 equipada con un procesador Intel® Core™ i3-6006U 2.00GHz de doble núcleo, 12 GB de RAM y con un sistema operativo de Windows 10 utilizando el software LigandScout 4.4 (Inte:Ligand, Viena, Austria).

La implementación del servidor “Drug Hunter” se realizó según la documentación oficial de LigandScout (para más detalles ver: <https://docs.inteligand.com/ls-remote/working-with-aws/>) (Kainrad, *et al.* 2018).

- A. Diseñar modelos farmacofóricos 3D para la búsqueda de inhibidores de PknG de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando las aproximaciones “Basado en el receptor” y “Basado en el ligando”.

### 8.5.2 Búsqueda bibliográfica

Se realizó la búsqueda de información científica utilizando las bases de datos bibliográficas Pubmed, Scopus, Elsevier, ACM Digital Library, ProQuest, Scielo y Mendeley empleando términos MeSH especializados tales como, *Mycobacterium tuberculosis*, fármacos antituberculosos, fármaco-resistencia, Proteína quinasa G, inhibición quinasa, farmacóforo, sitio activo, y tamizaje virtual masivo para la obtención de moléculas con actividad frente a PknG de *Mtb*.

El dibujo estructural de las moléculas encontradas junto con sus enantiómeros se realizó con el software ChemDraw 12.0.2 (Perkin Elmer Informatics, MA, USA).

### 8.5.3 Aproximación basada en el receptor

*Preparación del receptor.* La estructura cristalográfica de PknG en complejo con su inhibidor AX20017 fue obtenida del Protein Data Bank (PDB: 2PZI). Se usó el protocolo automatizado del software Molecular Operating Environment (MOE 2020.09) llamado QuickPrep. Este protocolo automatizado tiene como objetivo eliminar el solvente, añadir hidrógenos, arreglar enlaces,

calcular cargas y realizar un refinamiento inicial del sistema; en este protocolo se utilizaron las opciones por defecto.

*Acoplamiento molecular con Autodock VINA implementado en LigandScout.* Se hizo uso del cristal 2PZI previamente procesado en MOE como receptor de referencia dentro de LigandScout, el espacio de sitio de unión utilizado para el acoplamiento molecular fue el Pocket-grid perteneciente al sitio activo de PknG en donde se encontraba el inhibidor AX20017.

La lista de moléculas conformada por la Serie A-C en extensión .smi se convirtió a un archivo con formato SDF utilizando Open Babel, luego de su conversión, esta lista fue cargada al programa en la pestaña de Structure-based como una librería para luego ser utilizados junto con el receptor en el acoplamiento molecular haciendo uso de Autodock VINA integrado dentro del mismo software LigandScout 4.4.3 explorando los parámetros de exhaustiveness de 80 y 800 con 10 conformaciones como respuesta.

*Acoplamiento molecular con Autodock VINA local.* Utilizando el cristal 2PZI procesado por MOE dentro de la interfaz gráfica de Autodock Tools 1.5.6 (Michel, *et al.* 1999) se creó una caja de grid alrededor del sitio activo de la proteína. Las coordenadas tridimensionales (X,Y,Z) de la caja de grid fueron establecidas en 22.628, -10.021, -3.342 con un tamaño de 70, 60, 60, esta caja fue centrada a la macromolécula. Los compuestos derivados de aminopirimidinas fueron protonados y preparados en .pdbqt dentro del mismo software.

Una vez obtenidos los inputs, se utilizó Autodock VINA local desde el símbolo de sistema de Windows (CMD) para realizar el acoplamiento molecular explorando los parámetros de exhaustiveness de 80 y 800.

*Diseño de farmacóforo basado en el receptor.* Se analizaron las conformaciones resultantes del acoplamiento molecular de los ligandos con PknG para obtener toda la información estructural en cuanto a su orientación dentro del sitio activo e información de interacciones importantes basados en características como la formación de enlaces de hidrógeno y el contacto hidrófobo entre los átomos del ligando con el receptor que cumple la molécula de referencia AX20017. Una vez elegidas aquellas moléculas que cumplían con lo requerido se generaron sus farmacóforos para posteriormente crear un modelo fusionado que permitiera detectar a todos los integrantes de su serie química correspondiente.

#### **8.5.4 Aproximación basada en el ligando**

*Elección de moléculas.* Los ligandos obtenidos de la búsqueda bibliográfica junto con la información de sus IC<sub>50</sub> o su porcentaje de inhibición frente a PknG de *Mtb* fueron seleccionados

en el set de entrenamiento basándose en dos reglas teóricas como requisito: (a) Selección de las moléculas más activas en donde el  $IC_{50}$  sea  $< 5\mu M$  en la Serie A-C, o su porcentaje de inhibición a  $100\mu M$  sea  $> 34 \pm 6.10$  en los compuestos derivados de aminopirimidinas, no excediendo un número mayor a 3 moléculas por serie química (b) Presencia de aporte de variabilidad química en sus estructuras.

*Diseño de farmacóforo basado en el ligando.* En el software LigandScout, se empleó el módulo Expresso en la sección de Ligand-based. Tras haber definido las moléculas que pertenecen al set de Training dentro de cada familia, se utilizaron los valores por defecto de la configuración BEST para la creación de conformaciones de las moléculas. LigandScout generó 10 posibles modelos farmacofóricos dentro de los cuales se escogió al modelo que presentaba el mejor Pharmacophore-Fit para toda la familia de moléculas, así como también un buen alineamiento de las características del farmacóforo con las estructuras de los componentes de cada serie.

- B. Refinar y validar en forma teórica los modelos farmacofóricos generados mediante el uso de compuestos señuelos e información disponible en la literatura (Verdaderos Positivos y Verdaderos Negativos).

### **8.5.5 Refinamiento**

*Volúmenes de exclusión.* En la aproximación basada en el receptor, los volúmenes de exclusión fueron adicionados simulando lo más parecido posible el espacio tridimensional del sitio activo, mientras que en la aproximación basada en el ligando se crearon con la información proporcionada por las moléculas inactivas experimentales.

### **8.5.6 Validación teórica**

*Moléculas señuelo.* Para validar la capacidad de los modelos en detectar las moléculas activas dentro de una base de datos de moléculas activas e inactivas, se crearon los señuelos. Por cada molécula considerada activa se generaron 50 señuelos virtuales en la página de DUD-E. (<http://dude.docking.org/>) (Mysinger, *et al.* 2012). Estos fueron utilizados para ambas aproximaciones.

*Análisis de desempeño de los modelos.* Para calcular los parámetros teóricos se utilizaron los siguientes descriptores con el fin de evaluar el desempeño de los modelos (Vuorinen y Schuster,

2015, Lu, *et al.* 2011, Kratz, *et al.* 2014, Braga y Andrade, 2013).

- Factor de Enriquecimiento (EF) mide la densidad de activos encontrados en una base de datos ordenada en comparación a una selección aleatoria.
- Güinner-Henry score (GH) mide la precisión de selectividad que tiene el farmacóforo al encontrar moléculas activas en una base de datos que contiene activos e inactivos.
- Curva Roc (ROC) muestra el rendimiento de un modelo en una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad.
- Area bajo la curva ROC (AUC) mide toda el área bidimensional por debajo de la curva ROC.
- Sensibilidad (Se) mide la proporción de los compuestos verdaderos positivos recuperados con respecto a todos los compuestos activos en la base de datos.
- Especificidad (Sp) mide la proporción de los compuestos determinados como verdaderos negativos con respecto a todos los compuestos negativos en la base de datos.

C. Seleccionar y evaluar in silico los potenciales nuevos inhibidores producto del uso de los modelos farmacofóricos refinados y el tamizaje masivo de bibliotecas virtuales.

### **8.5.7 Tamizaje masivo usando modelos basados en el receptor**

*Bases de datos.* La creación de las bases de datos en LigandScout se realizó a partir de archivos con extensión .smi, para ello se cargaron los archivos al programa a partir de la opción “Crear librería de tamizaje”, se escogió la opción BEST para la generación de conformaciones utilizando sus valores por defecto los cuales son 200 conformaciones con 0.8 RMS obteniendo como resultado la base de datos con extensión .lbd para ser utilizada.

Se realizaron tamizajes masivos en el clúster virtual implementado en el AWS empleando dos bases de datos: (a) La base de datos de ChEMBL21 conformada por 1,578,014 moléculas (Davies, *et al.* 2015) y (b) La base de datos de Productos Naturales (ProdNat) de la compañía Inte:Ligand conformada por 111,000 moléculas. Esta segunda base solo fue utilizada en la aproximación basada en el receptor por colaboración con la empresa, en la aproximación basada en el ligando no fue empleada.

*Tamizaje masivo y moléculas seleccionadas.* El tamizaje masivo fue realizado con el uso de los parámetros por defecto los cuales fueron: utilizar el Pharmacophore fit como score, coincidir todas las características farmacofóricas, el modo de detección detenido después de la primera conformación de coincidencia y volúmenes de exclusión comprobados durante el proceso de

tamizaje. Las moléculas detectadas (hits) por los modelos farmacofóricos producto del tamizaje virtual masivo fueron filtradas a través del acoplamiento molecular con el receptor 2PZI previamente procesado en MOE dentro del software LigandScout para asegurar a aquellos “hits” que realizaban las interacciones de importancia en el sitio activo y presentaban una buena orientación espacial.

*Análisis de candidatos finales.* La información recopilada de los hits aprobados del filtro anterior fue depositada en un Excel. Se creó una tabla en donde se colocó la información de cada hit referente a: estructura 2D, score de VINA, Pharmacophore Fit-Score de LigandScout, conformación de la molécula que realiza las interacciones importantes, número de Matching features, tipos de Matching features e información proveniente de la base de ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) como su actividad biológica, presencia en proyectos, publicaciones y disponibilidad comercial. Con el uso de filtros dentro de la tabla creada se llevó a cabo el análisis de candidatos dando prioridad a aquellos que se encontraran disponibles comercialmente seguido de su score de VINA.

## 8.6 Aspecto ético

El presente trabajo de investigación consistió en realizar simulaciones computacionales (ensayos *in silico*) donde, las principales herramientas fueron softwares especializados (ChemDraw 12.0.2, Open Babel, Autodock Tools 1.5.6, Autodock VINA, MOE 2020, LigandScout 4.4.3) y ordenadores.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, lo cual aseguró la total reproducibilidad y calidad de los datos obtenidos. De esta forma, los aspectos éticos ligados a la calidad académica están asegurados.

## IX. RESULTADOS

- A. Diseñar modelos farmacofóricos 3D para la búsqueda de inhibidores de PknG de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando las aproximaciones “Basado en el receptor” y “Basado en el ligando”.

### 9.1 Búsqueda bibliográfica

Producto de la búsqueda bibliográfica haciendo uso de los términos MeSH: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, fármacos antituberculosos, fármaco-resistencia, Proteína quinasa G, inhibición quinasa, farmacóforo, sitio activo, acoplamiento molecular y tamizaje virtual masivo, en las bases de datos Pubmed, Scopus, Elsevier, ACM Digital Library, ProQuest, Scielo y Mendeley, se lograron encontrar 141 moléculas evaluadas frente a la quinasa PknG de *Mtb* (Fancelli, *et al.* 2002, Bacher, *et al.* 2003, Walburger, *et al.* 2004, Pató, *et al.* 2004, Scherr, *et al.* 2007, Székely, *et al.* 2008, Hegymegi-Barakonyi, *et al.* 2008, Pató, *et al.* 2009, Missio, *et al.* 2009, Anand, *et al.* 2012, Sipos, *et al.* 2015, Caballero, *et al.* 2018, Kanehiro, *et al.* 2018).

Además, se logró establecer una línea cronológica de los hallazgos más relevantes en el campo del descubrimiento de inhibidores de PknG de *Mtb* (Gráficos 1 y 2). Destacan los estudios de Walburger, *et al.* 2004 por investigar de manera *in vitro* el rol de PknG de *Mtb* dentro de los macrófagos confirmando que AX20017 bloquea la actividad quinasa de PknG sin afectar al crecimiento de los macrófagos, Scherr, *et al.* 2007 por demostrar la alta selectividad de AX20017 para inhibir a PknG y reportar su estructura cristalográfica en el Protein Data Bank (PDB:2PZI) en el cual se da más detalle estructural de los dominios que lo conforman y el sitio activo, y Caballero, *et al.* 2018 por resumir, estudiar estructuralmente algunos inhibidores de PknG y proporcionar un esquema de los aminoácidos de importancia que conforman su sitio activo.

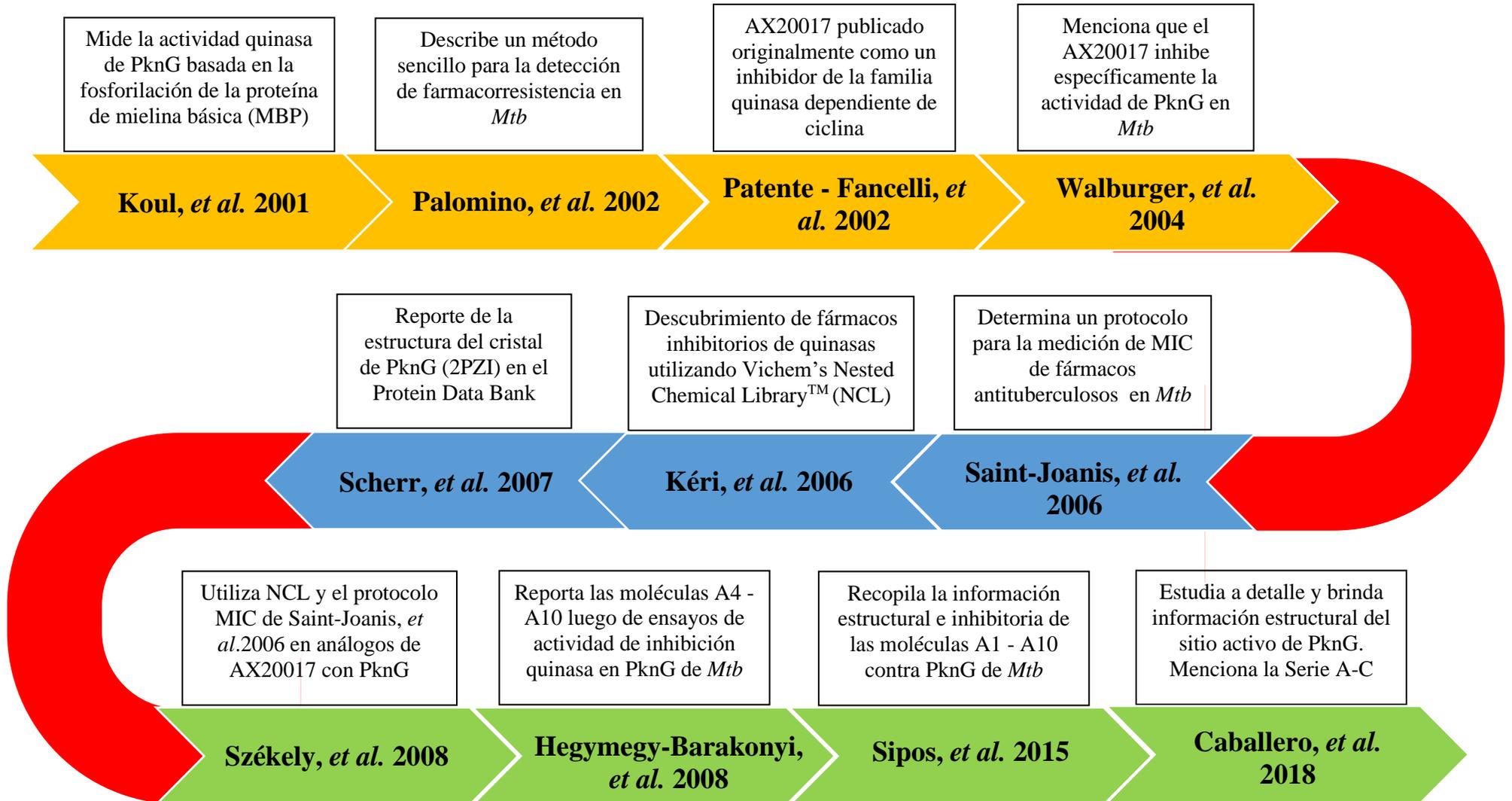
Dentro de las moléculas encontradas destacan las Series A y C, denominadas de esta manera por Caballero, *et al.* 2018, ambos derivados sintéticos con un núcleo de tetrahydrobenzotiofeno (Tablas 1 y 2). La serie A se encuentra compuesta por un total de 16 moléculas, tomando en cuenta sus enantiómeros, destacando a A1 (AX20017) por ser la molécula que a menudo se ha tomado como referencia debido a los numerosos estudios y resultados que posee con PknG y A9 por ser el único en presentar como novedad química un benzodioxol como sustituyente en toda la serie A, ambas tienen valores de IC<sub>50</sub> de 0.38 μM y 0.01 μM (Tabla 1). La serie C cuenta con 16 moléculas resaltando C270 y C286 dado que presentan los menores valores de IC<sub>50</sub> de ~ 0.9 μM y ~ 2 μM (Tabla 2).

Así mismo se encontraron 17 compuestos derivados de aminopirimidinas, las cuales presentan un porcentaje inhibición a la actividad quinasa de PknG de *Mtb* en el rango de 53.61 - 3.65 a 100

$\mu\text{M}$ , siendo las moléculas 6\_2, 6\_9 y 6\_11 clasificadas como el top3 más activo según su autor Anand, *et al.* 2012, por lo que se tomaron en cuenta dentro del estudio (Tabla 3).

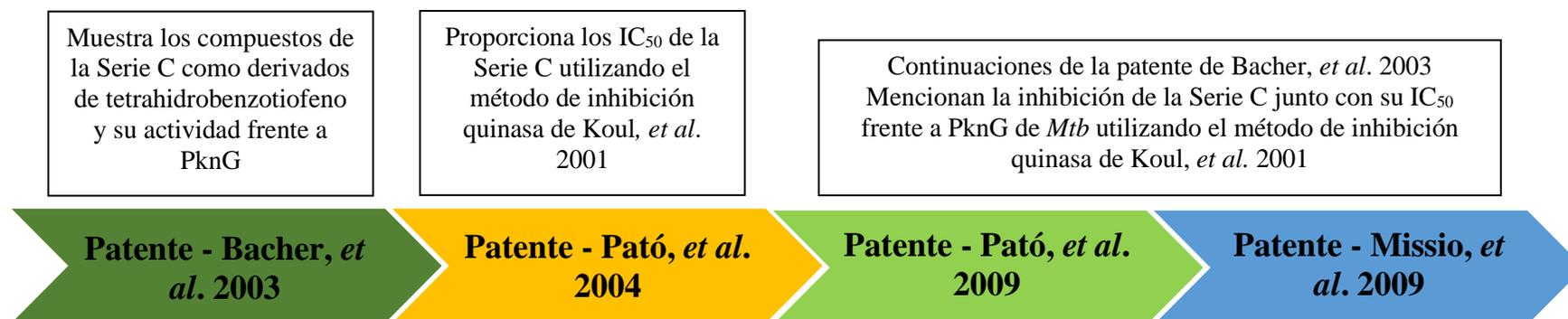
## Gráfico 1

Linea cronológica perteneciente a la Serie A

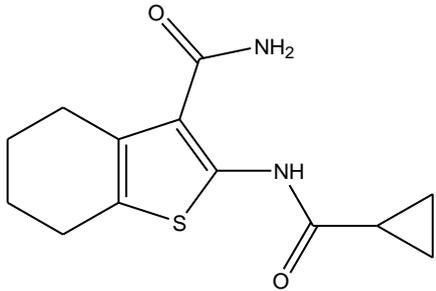
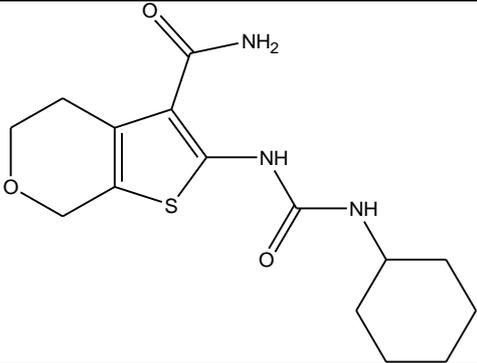
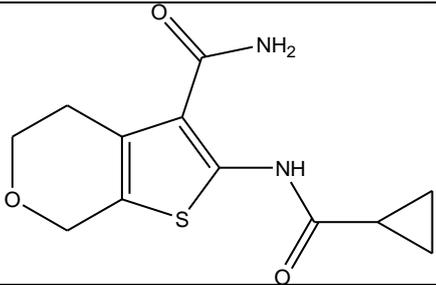
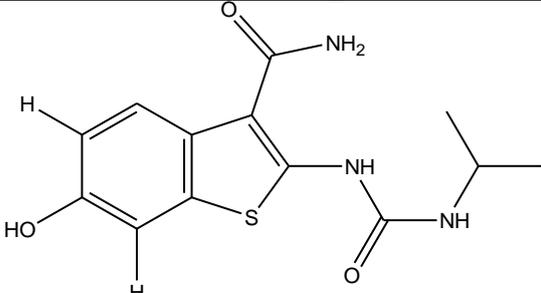


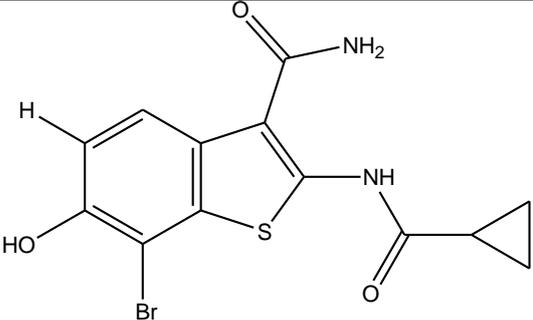
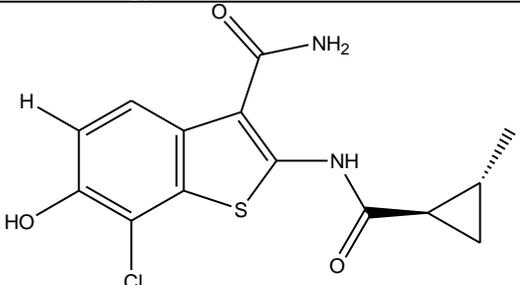
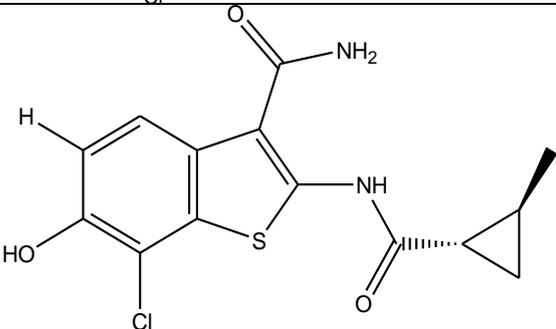
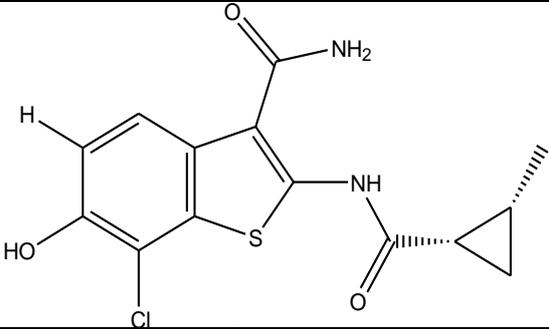
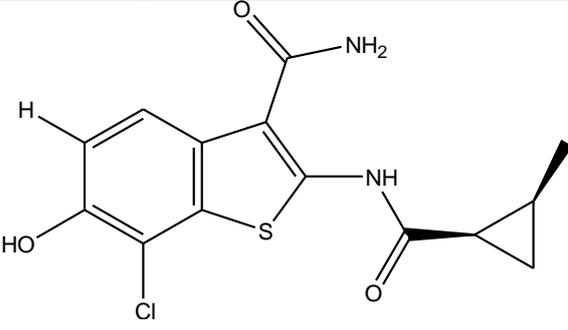
## Gráfico 2

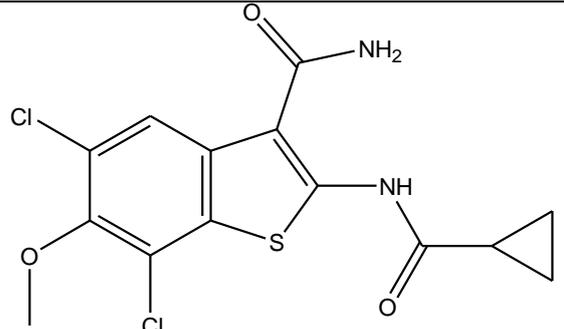
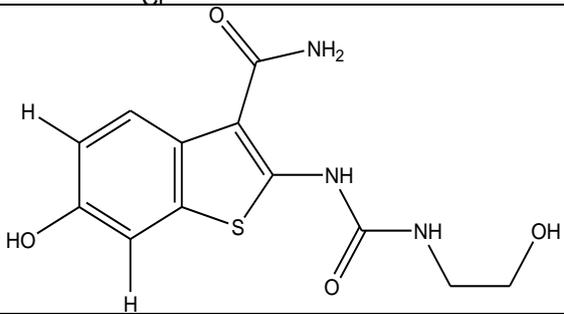
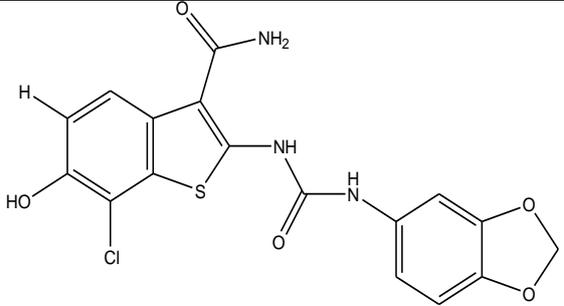
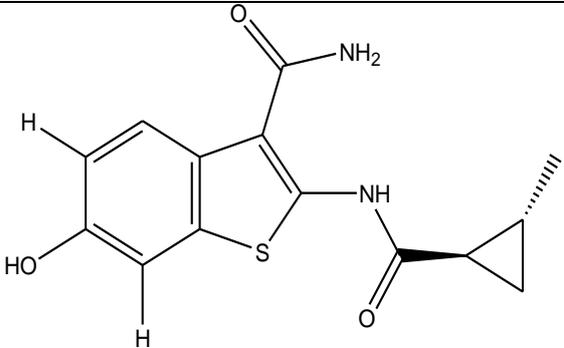
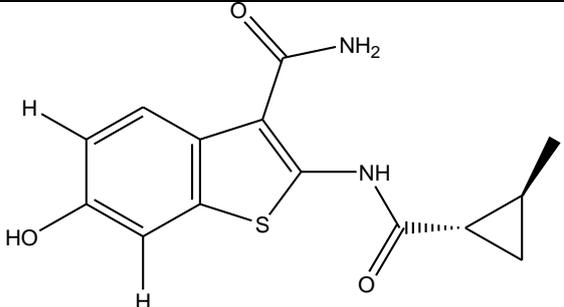
*Linea cronológica perteneciente a la Serie C*

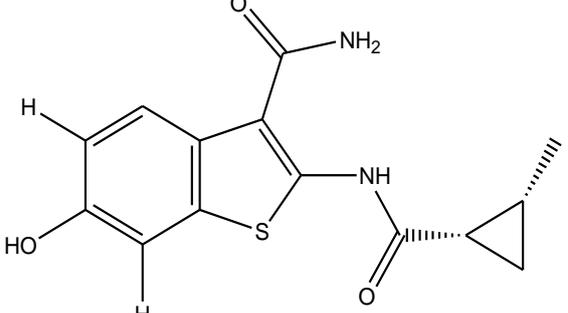
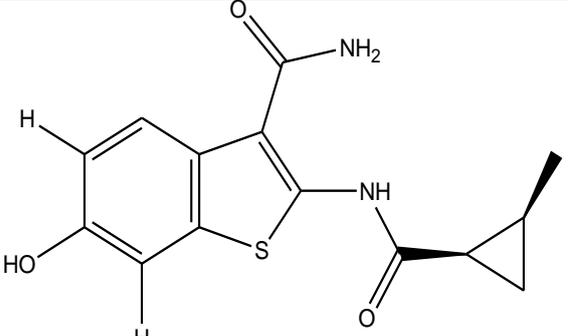


**Tabla 1***Moléculas que conforman la Serie A*

Serie A			
Código	Estructura química	Actividad Inhibitoria (IC <sub>50</sub> μM)	Referencia bibliográfica
A1 (AX20017)		0.38	Fancelli, <i>et al.</i> 2002 (15) Walburger, <i>et al.</i> 2004 (65) Scherr, <i>et al.</i> 2007 (54) Székely, <i>et al.</i> 2008 (62) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
A2		0.68	Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
A3		0.53	Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
A4		0.03	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)

A5		0.02	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
SR_A6		0.02	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
RS_A6		0.02	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
RR_A6		0.02	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
SS_A6		0.02	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)

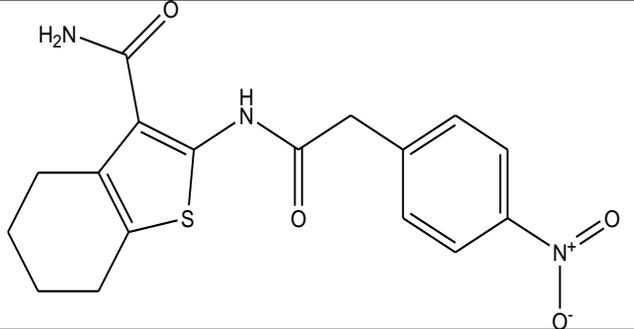
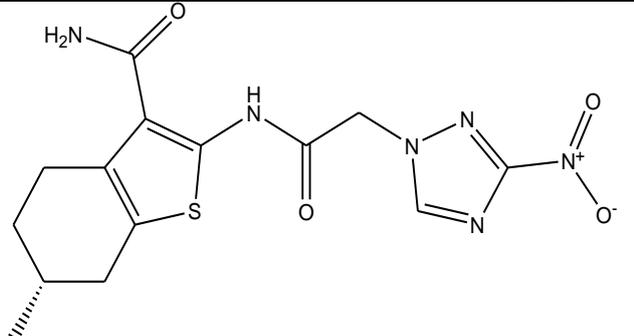
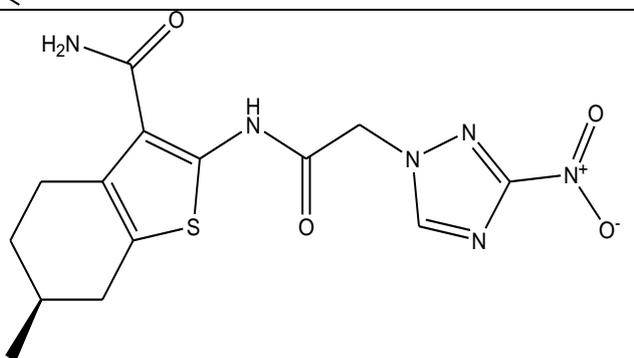
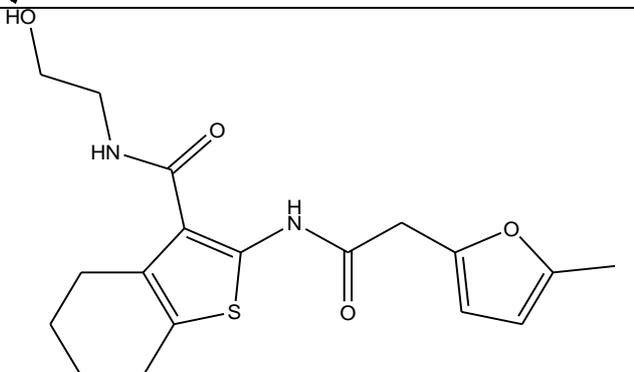
A7		0.04	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
A8		0.05	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
A9		0.01	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
SR_A10		0.05	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
RS_A10		0.05	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)

RR_A10		0.05	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)
SS_A10		0.05	Hegymegi-Barakonyi, <i>et al.</i> 2008 (16) Sipos, <i>et al.</i> 2015 (60) Caballero, <i>et al.</i> 2018 (8)

*Nota.* Se muestran las moléculas de la Serie A junto con sus IC<sub>50</sub> correspondientes, así mismo se incluyen sus enantiómeros y referencias.

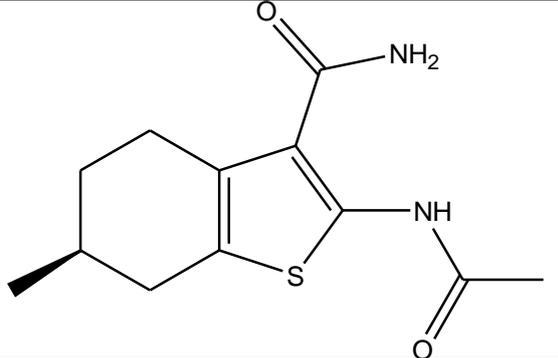
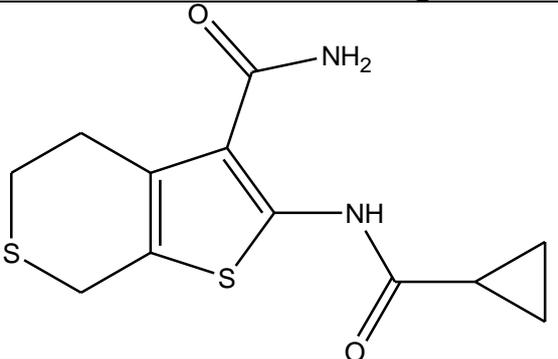
**Tabla 2**

*Moléculas que conforman la Serie C*

Serie C			
Código	Estructura química	Actividad Inhibitoria (IC <sub>50</sub> μM)	Referencia bibliográfica
C238		~ 5	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
R_C239		> 30	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
S_C239		> 30	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
C240		~ 16	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)

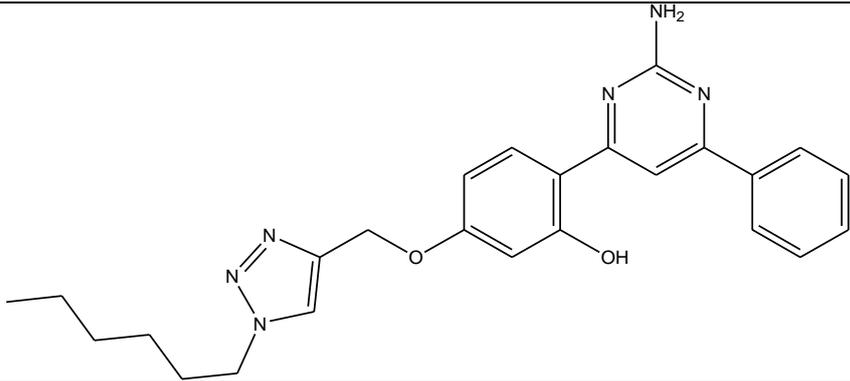
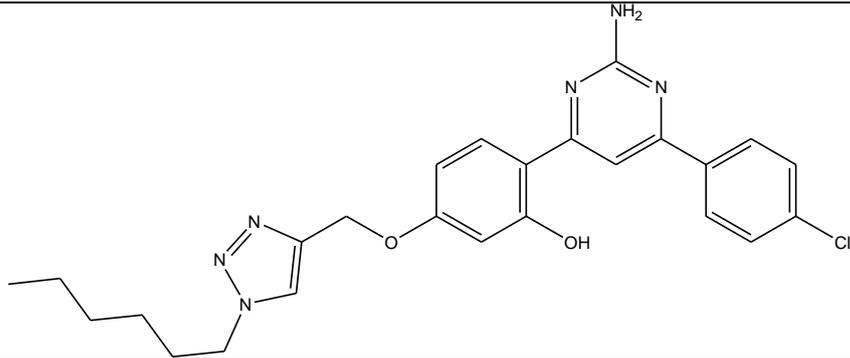
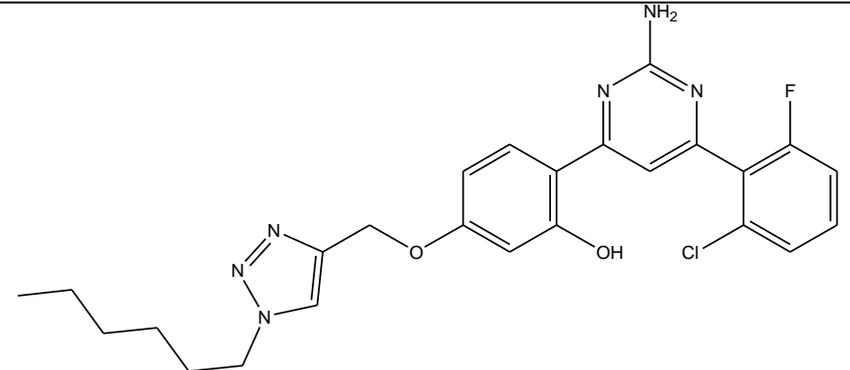
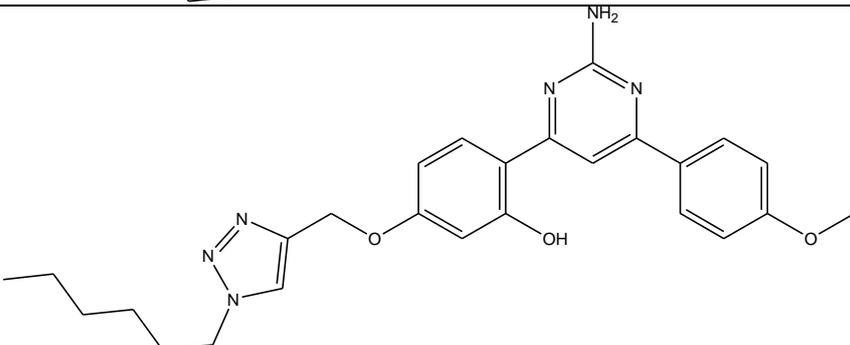
C250		> 30	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
C252		~ 19	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
C255		~ 3	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
C256		> 30	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
C266		~ 3	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)

R_C26 7		~ 17	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (3)
S_C26 7		~ 17	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
R_C27 0		~ 0.9	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
S_C27 0		~ 0.9	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (38)
R_C28 4		~ 12	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)

S_C28 4		~ 12	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)
C286		~ 2	Bacher, <i>et al.</i> 2003 (5) Pató, <i>et al.</i> 2004 (47) Pató, <i>et al.</i> 2009 (48) Missio, <i>et al.</i> 2009 (39)

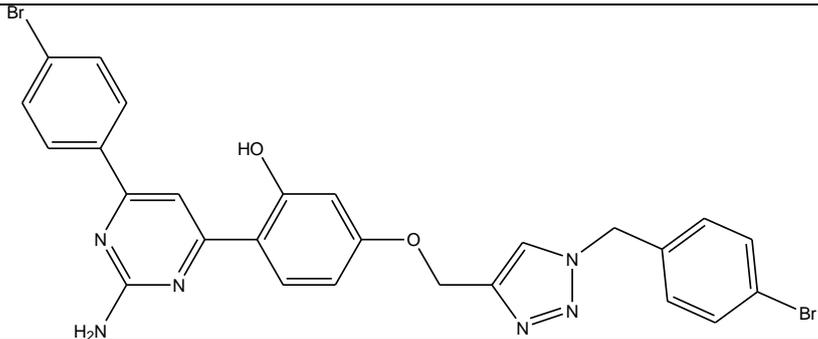
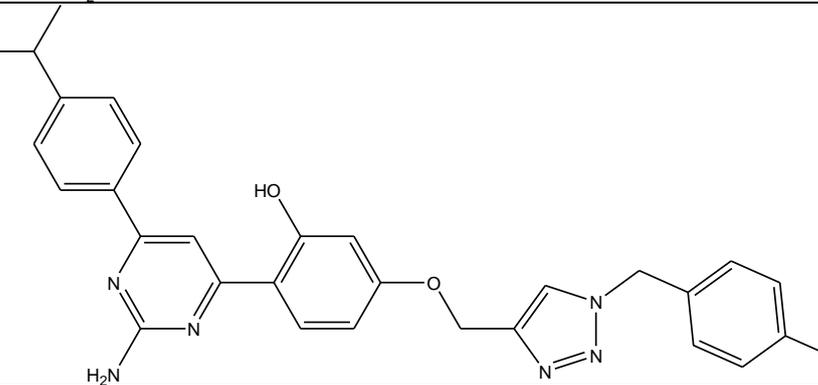
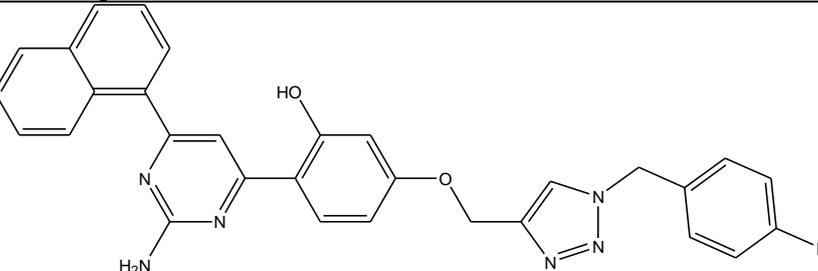
*Nota.* Se muestran las moléculas de la Serie C junto con sus IC<sub>50</sub> correspondientes, así mismo se incluyen sus enantiómeros y referencias.

**Tabla 3***Moléculas derivadas de las aminopirimidinas*

Aminopirimidinas			
Código	Estructura química	Porcentaje de inhibición a 100 $\mu$ M	Referencia bibliográfica
6_1		$23 \pm 1.86$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_2		$43 \pm 2.94$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_3		$11 \pm 0.32$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_4		$4 \pm 0.35$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)

6_5		$5 \pm 0.78$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_6		$17 \pm 0.27$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_7		$11 \pm 0.76$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_8		$29 \pm 3.03$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_9		$53 \pm 0.61$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)

6_10		$12 \pm 0.34$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_11		$43 \pm 0.61$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_12		$28 \pm 4.20$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_13		$35 \pm 5.97$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_14		$41 \pm 0.78$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)

6_15		$19 \pm 5.84$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_16		$5 \pm 0.41$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)
6_17		$34 \pm 6.10$	Anand, <i>et al.</i> 2012 (4)

*Nota.* Se muestra las moléculas derivadas de Aminopirimidinas junto con sus porcentajes de inhibición y su autor de referencia.

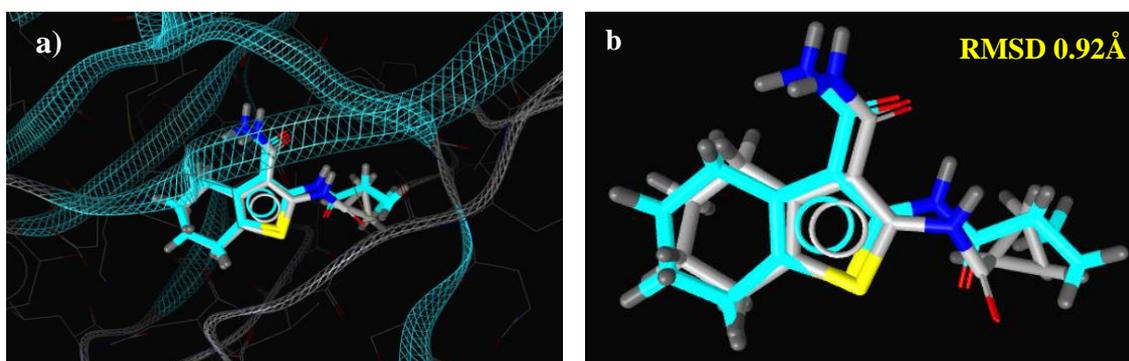
## 9.2 Aproximación basada en el receptor

### 9.2.1 Validación del protocolo de acoplamiento molecular para la Serie A-C

La validación del protocolo de acoplamiento molecular para la Serie A-C se realizó usando una implementación de Autodock Vina dentro del programa LigandScout (Inte:Ligand, Viena, Austria). Esta validación consistió en la reconstrucción o reproducción de la información experimental depositada en el Protein Data Bank bajo el código 2PZI (PDB: 2PZI), el cual presenta al inhibidor AX20017 y la proteína quinasa G de *Mtb* (PknG) formando un complejo. La orientación del cálculo teórico en el sitio activo de PknG, resultado del acoplamiento molecular, reportó una buena superposición espacial con las coordenadas de los átomos del cálculo experimental de la molécula AX20017 (Figura 1) obteniendo valores de RMSD de 0.92Å en promedio (Tabla 4). Los experimentos fueron realizados por triplicado para asegurar la reproducibilidad del protocolo y del ordenador en uso, de estos experimentos se demostró que el parámetro 800 de exhaustiveness fue suficiente para reconstruir el complejo experimental, además, la conformación teórica logró reproducir las interacciones intermoleculares del compuesto AX20017 en el sitio activo de PknG reportadas experimentalmente en el cristal 2PZI (Scherr, *et al.* 2007) (Figura 2).

#### Figura 1

Validación del protocolo de acoplamiento molecular para la Serie A-C



*Nota.* (a) Vista general de los complejos PknG de *Mtb* y AX20017; en color gris conformación calculada por acoplamiento molecular de AX20017 y en turquesa la hallada experimental; (b) RMSD calculado entre la conformación experimental y las conformaciones obtenidas por acoplamiento molecular de AX20017.

**Tabla 4**

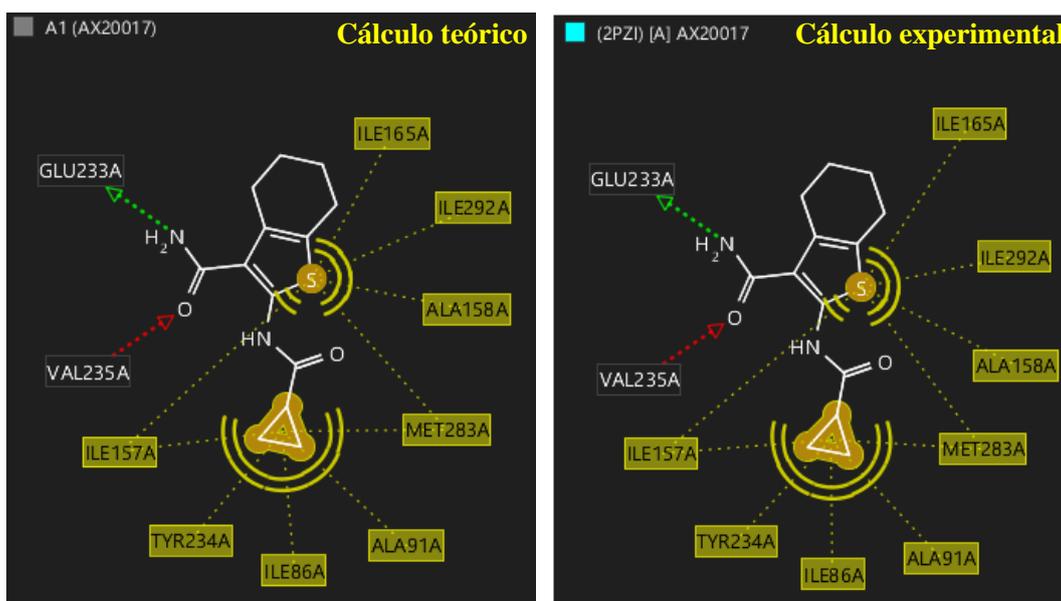
*RMSD de validación del protocolo de acoplamiento molecular para la Serie A-C*

Validación del protocolo de acoplamiento molecular - Serie A-C			
Molécula	Cálculo 1 (RMSD)	Cálculo 2 (RMSD)	Cálculo 3 (RMSD)
A1 (AX20017)	0.53	1.12	1.12

*Nota.* Valores de RMSD obtenidos por los cálculos por triplicado para la validación del protocolo de acoplamiento molecular entre AX20017 y PknG de Mtb utilizando Autodock Vina integrado en LigandScout.

**Figura 2**

*Mapas de interacciones intermoleculares entre el compuesto AX20017 y la proteína PknG de Mtb*



*Nota.* Interacciones halladas a partir del cálculo de acoplamiento molecular con Autodock Vina implementado en LigandScout (izquierda) e interacciones encontradas del análisis del cristal 2PZI (derecha).

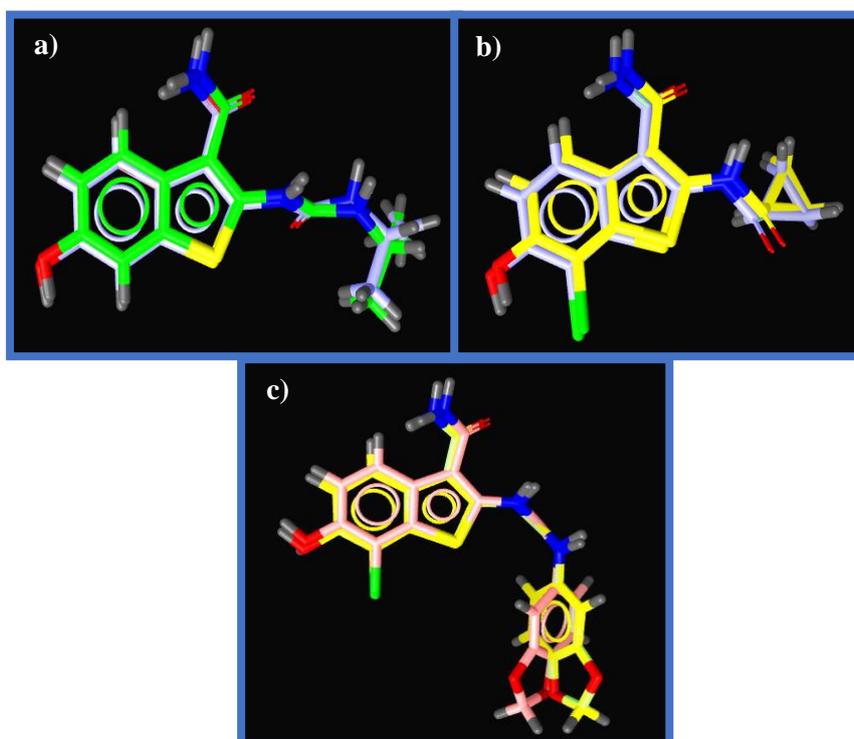
## 9.2.2 Diseño de farmacóforo para Serie A-C

### 9.2.2.1 Cálculos de acoplamiento y análisis de las interacciones moleculares para la Serie A-C

Validado el protocolo de acoplamiento molecular de la Serie A-C, se procedió a estudiar los respectivos modos de unión de cada uno de los miembros de las familias frente a PknG de *Mtb*. Para este objetivo se realizaron en total 96 cálculos de acoplamiento molecular debido a que cada cálculo de un compuesto fue ejecutado por triplicado para poder apreciar la reproducibilidad, de estos 96 cálculos, 48 fueron para la serie A y 48 para la serie C debido a que ambas series se encuentran conformadas por 16 moléculas cada una. Como ejemplos representativos se muestran las conformaciones obtenidas del acoplamiento molecular para las moléculas A4, A5 y A9 (Figura 3) las cuales según la literatura hallada presentan  $IC_{50s}$  de  $0.03\mu M$ ,  $0.02\mu M$  y  $0.01\mu M$  respectivamente. (para más información ver anexos)

#### Figura 3

*Reproducibilidad de los cálculos triplicados de acoplamiento molecular para moléculas de la Serie A-C frente a PknG de Mtb*



*Nota.* (a) Superposición de cálculos de la molécula A4; (b) Superposición de cálculos de la molécula A5; (c) Superposición de cálculos de la molécula A9.

Se establecieron criterios de corte para poder agrupar a las moléculas de la Serie A-C como activas e inactivas. Los criterios usados fueron:

- 1) La correcta disposición tridimensional del resultado del acoplamiento molecular dentro del sitio activo y sitio catalítico.
- 2) Las interacciones moleculares de cada molécula en comparación al AX20017.
- 3) La energía de unión proporcionada por LigandScout.

Tomando como referencia o molécula control las interacciones moleculares realizadas por el inhibidor AX20017 con PknG, se pudo apreciar como las moléculas con un  $IC_{50} < 5 \mu M$  lograban recrear la red de interacciones moleculares indispensables para reportar inhibición *in vitro*. Estas interacciones fueron indispensables para obtener valores bajos de  $IC_{50}$ . Del análisis y aplicación de los criterios antes mencionados se logró apreciar a dos grupos claramente marcados y denominados como moléculas “activas” y moléculas “inactivas”. El primero caracterizado por presentar  $IC_{50}$  de  $>5 \mu M$  e interacciones similares a AX20017. El segundo dominado por  $IC_{50}$  de  $<5 \mu M$  e interacciones diferentes a AX20017 (Tablas 5 y 6). Dentro del sitio activo de PknG, la disposición tridimensional de los integrantes de la Serie A-C respaldan lo antes mencionado (Figuras 4 y 5).

**Tabla 5**

*Moléculas activas de la Serie A-C con sus respectivos  $IC_{50}$  reportados en la literatura.*

Moléculas ACTIVAS			
Serie A		Serie C	
Moléculas	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	Moléculas	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
AXX2017(A1)	0.3		
A2	0.68	C255	~ 3
A3	0.53		
A4	0.03		
A5	0.02	C266	~ 3
A6*	0.02		
A7	0.04		
A8	0.05	C286	~ 2
A9	0.01		
A10*	0.05	C270*	~ 0.9

*Nota.* (\*) moléculas que presentan enantiómeros.

**Tabla 6**

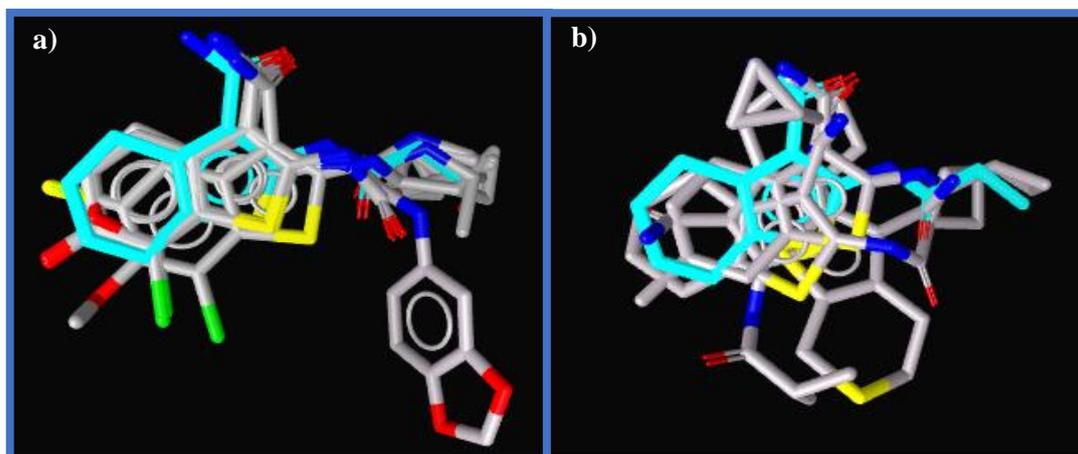
*Moléculas inactivas de la Serie C con sus respectivos IC<sub>50</sub> reportados en la literatura*

Moléculas INACTIVAS - Serie C	
Molécula	IC <sub>50</sub> (μM)
C238	~ 5
C239*	>30
C240	~16
C250	>30
C252	~19
C256	>30
C267*	~17
C284*	~12

*Nota.* (\*) moléculas que presentan enantiómeros.

**Figura 4**

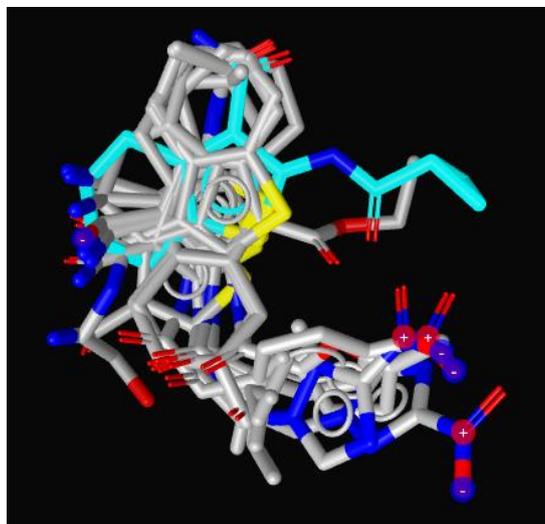
*Disposición tridimensional de acoplamiento molecular dentro del sitio activo de PknG de las moléculas denominadas como ACTIVAS*



*Nota.* (a) Serie A; (b) Serie C; en color turquesa se muestra el inhibidor AX20017 experimental.

### Figura 5

*Disposición tridimensional de acoplamiento molecular dentro del sitio activo de PknG de las moléculas denominadas como INACTIVAS en la Serie C*



*Nota.* En color turquesa se muestra el inhibidor AX20017 experimental.

Se destaca el haber podido recrear lo encontrado en la literatura llevando a cabo un registro de los tipos de interacciones moleculares que presentaron cada una de las moléculas activas siendo todas las primeras conformaciones de los resultados del acoplamiento molecular adecuadas para poder cumplir con las interacciones moleculares características del AX20017, así como también potenciales nuevas interacciones (Tabla 7).

**Tabla 7**

*Interacciones moleculares de las moléculas ACTIVAS de la Serie A-C unidas al sitio activo de PknG mediante acoplamiento molecular*

Molécula	Aminoácidos que conforman el sitio activo/sitio catalítico de PknG																
	ILE86	ASP87	ALA91	LEU92	ILE157	ALA158	ILE165	VAL179	LYS181	MET232	GLU233*	TYR234	VAL235*	ASN281	MET283	ILE292	ASP293
AX20017 (A1)	Yellow		Yellow		Yellow	Yellow	Yellow				Green	Yellow	Red		Yellow	Yellow	
A2										Green			Red			Yellow	
A3	Yellow		Yellow								Green	Yellow	Red		Green	Yellow	
A4	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green		Green	Red		Yellow	Green
A5	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
A6	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
RS_A6									Red	Yellow					Green		Green
RR_A6									Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	Green
SR_A6									Red	Yellow	Green		Green	Red		Yellow	Green
SS_A6	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
A7	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
A8	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
A9	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
A10	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
RS_A10									Red	Yellow	Green		Green	Red		Yellow	
RR_A10	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	Green
SR_A10	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green		Green	Red		Yellow	Green
SS_A10	Yellow		Yellow						Red	Yellow	Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
C255																Yellow	
C266	Yellow		Yellow									Yellow			Green	Yellow	
R_C270								Yellow		Yellow			Yellow	Green	Yellow	Yellow	
S_C270			Yellow								Green	Yellow	Green	Red		Yellow	
C286								Yellow		Yellow				Red	Green	Yellow	

*Nota.* Los aminoácidos en color negro son aquellos reportados por la literatura en PknG (Caballero, *et al.* 2018); aminoácidos de color rojo muestran potenciales

nuevas interacciones detectadas en LigandScout. El color amarillo representa interacciones hidrofóbicas, color rojo aceptores de enlaces de hidrógeno, color verde donadores de enlaces de hidrógeno y color blanco ausencia de interacción con el aminoácido. (\*) aminoácidos importantes esenciales para una buena interacción.

Del mismo modo se muestra el registro de los tipos de interacciones moleculares que presentan las moléculas denominadas como inactivas de la Serie C (Tabla 8)

**Tabla 8**

*Interacciones moleculares de las moléculas INACTIVAS de la Serie C unidas al sitio activo de PknG mediante acoplamiento molecular.*

Molécula	Aminoácidos que conforman el sitio activo/sitio catalítico de PknG																
	ILE86	ASP87	ALA91	LEU92	ILE157	ALA158	ILE165	VAL179	LYS181	MET232	GLU233*	TYR234	VAL235*	ASN281	MET283	ILE292	ASP293
AX20017 (A1)	Yellow		Yellow		Yellow	Yellow	Yellow				Green	Yellow	Red		Yellow	Yellow	
C238					Yellow	Yellow	Yellow								Yellow	Yellow	
C240					Yellow	Yellow	Yellow		Red						Yellow	Yellow	
C250					Yellow	Yellow	Yellow		Red						Yellow	Yellow	
C252					Yellow	Yellow	Yellow		Red						Yellow	Yellow	
C256			Yellow		Yellow		Yellow			Yellow		Yellow			Yellow	Yellow	
R_C239					Yellow	Yellow	Yellow		Red				Yellow	Green	Yellow	Yellow	
S_C239					Yellow	Yellow	Yellow		Red	Yellow			Yellow		Yellow	Yellow	
R_C267					Yellow	Yellow	Yellow		Red						Yellow	Yellow	
S_C267					Yellow	Yellow	Yellow		Red						Yellow	Yellow	
R_C284					Yellow	Yellow	Yellow						Red		Yellow	Yellow	
S_C284					Yellow	Yellow	Yellow						Red		Yellow	Yellow	

*Nota.* A pesar de que los enantiómeros de la molécula C284 forman una interacción molecular de importancia con VAL235, la disposición tridimensional de

ambos dentro del sitio activo de PknG es incorrecta incumpliendo así con el primer criterio de selección. El color amarillo representa interacciones hidrofóbicas, color rojo aceptores de enlaces de hidrógeno, color verde donadores de enlaces de hidrógeno y color blanco ausencia de interacción con el aminoácido. AX20017 se muestra como control. (\*) aminoácidos importantes esenciales para una buena interacción.

### 9.2.2.2 Creación de farmacóforo para la Serie A-C

En el módulo de aproximación “Structure-Based”, primero se procedió a crear los modelos farmacofóricos para cada integrante de la familia para posteriormente crear un modelo unificado o fusionado, sin embargo, este modelo general no logró detectar a todos los integrantes de la familia dado que sólo llegó a detectar cinco de dieciséis moléculas (5/16). Por esta razón se procedió a ver qué modelos lograban detectar a la mayoría de moléculas tomando a los más activos como referencia para su creación (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Matriz de combinaciones de modelos farmacofóricos fusionados testeados para la detección de los integrantes de la Serie A.*

	A1	A4	A5	RS_A6	SR_A6	RR_A6	SS_A6	A7	A8	A9
A1	X	0/16	2/16	8/16	14/16	6/16	7/16	0/16	0/16	0/16
A4	0/16	X	1/2016	1/16	1/16	1/16	0/16	0/16	0/16	0/16
A5	2/16	1/16	X	1/16	1/16	1/16	0/16	0/16	0/16	0/16
RS_A6	8/16	1/16	1/16	X	X	X	X	1/16	0/16	0/16
SR_A6	14/16	1/16	1/16	X	X	X	X	0/16	1/16	0/16
RR_A6	6/16	1/16	1/16	X	X	X	X	1/16	1/16	0/16
SS_A6	7/16	0/16	0/16	X	X	X	X	0/16	0/16	0/16
A7	0/16	0/16	0/16	1/16	0/16	1/16	0/16	X	0/16	0/16
A8	0/16	0/16	0/16	0/16	1/16	1/16	0/16	0/16	X	0/16
A9	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	X

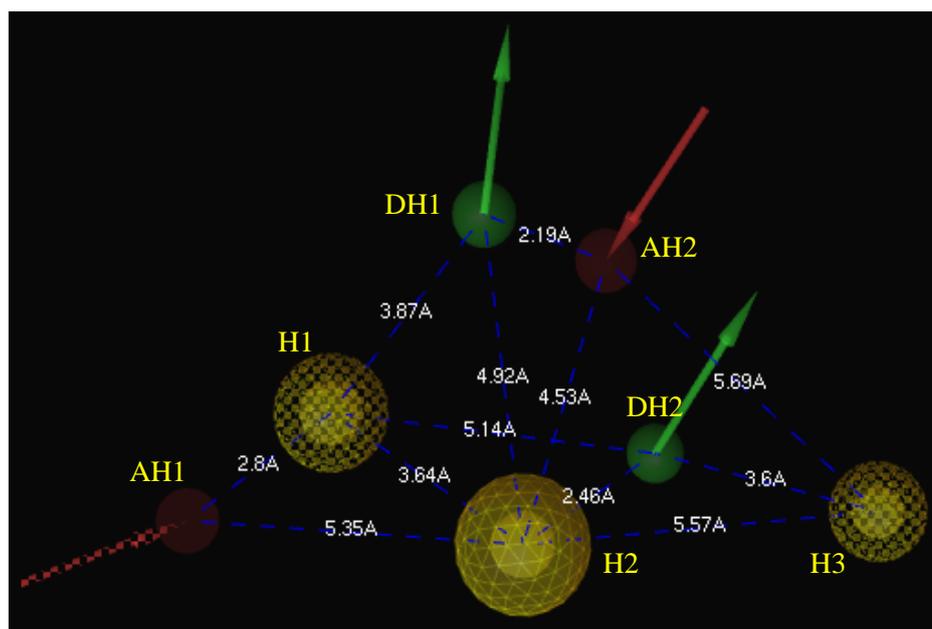
*Nota.* Sombreado en amarillo la combinación que detecta la mayoría de las moléculas; (X) combinaciones no realizadas por tratarse de la misma molécula.

Tomando los modelos farmacofóricos de las moléculas A1 (AX20017) y SR\_A6 se procedió a crear el farmacóforo de la Serie A-C. Este nuevo farmacóforo involucra 7 características farmacofóricas (Tabla10) con una disposición espacial específica (Figura 6).

**Tabla 10***Composición del farmacóforo para la Serie A-C.*

Nombre de la característica farmacofórica	Tipo de característica farmacofórica	Coordenadas tridimensionales			Tamaño de Tolerancia
		X	Y	Z	
H1	Hidrófobo	24.19	-11.49	-6.68	0.9
H2	Hidrófobo	21.25	-9.69	-5.48	1.0
H3	Hidrófobo	18.07	9.15	-0.94	0.75
AH1	Aceptor de enlaces de hidrógeno	25.23	-11.95	-12.35	1.5
AH2	Aceptor de enlaces de hidrógeno	24.06	-11.28	0.73	1.5
DH1	Donador de enlaces de hidrógeno	24.94	-11.66	-2.89	1
DH2	Donador de enlaces de hidrógeno	20.86	-9.97	-3.07	0.90

*Nota.* Se hace mención de sus características farmacofóricas junto con sus coordenadas tridimensionales y tamaño de tolerancia.

**Figura 6***Disposición espacial del farmacóforo creado para la Serie A-C.*

*Nota.* Las características farmacofóricas se encuentran codificadas por colores: hidrófobo

(amarillo), aceptores de enlaces de hidrógeno (rojo), donadores de enlaces de hidrógeno (verde); los tamaños de las características indican el cambio de tamaño de tolerancia. Se muestra también las distancias entre cada una de ellas en ángstroms (Å).

Al realizar el tamizaje inicial sólo con las moléculas activas de la Serie A-C el farmacóforo logró detectar a todas estas moléculas logrando una tasa de aciertos del 100%

El orden descendente de la lista de hits clasificado por el Pharmacophore-Fit Score guarda similitud con lo reportado experimentalmente con valores de IC<sub>50</sub> en ensayos *in vitro* para estas moléculas frente a PknG lo que indica que el farmacóforo no sólo es capaz de detectar todas las moléculas activas, sino que identifica y organiza en primer lugar a las moléculas más activas dentro de la misma serie (Figura 7).

### Figura 7

Tasa de aciertos del farmacóforo de la Serie A-C en la aproximación basada en el receptor.

Hits for Query »Merged [AX20017, 6]« Hitrate: 100.00% (20 of 20)   Filter:					
	Name	Matching Features	Pharmacophore-Fit Score	Active/Decoy	Score
1	A5		73.56	active	73.56
2	A4		73.41	active	73.41
3	RS_A6		73.32	active	73.32
4	SS_A10		72.90	active	72.90
5	SR_A10		72.57	active	72.57
6	SR_A6		72.54	active	72.54
7	A7		64.85	active	64.85
8	RR_A10		64.42	active	64.42
9	RR_A6		64.14	active	64.14
10	RS_A10		63.82	active	63.82
11	A9		63.49	active	63.49
12	SS_A6		63.49	active	63.49
13	A8		63.47	active	63.47
14	C286		63.13	active	63.13
15	A2		54.93	active	54.93
16	A3		53.95	active	53.95
17	C266		53.30	active	53.30
18	C255		52.89	active	52.89
19	S_C270		52.41	active	52.41
20	A1		51.82	active	51.82

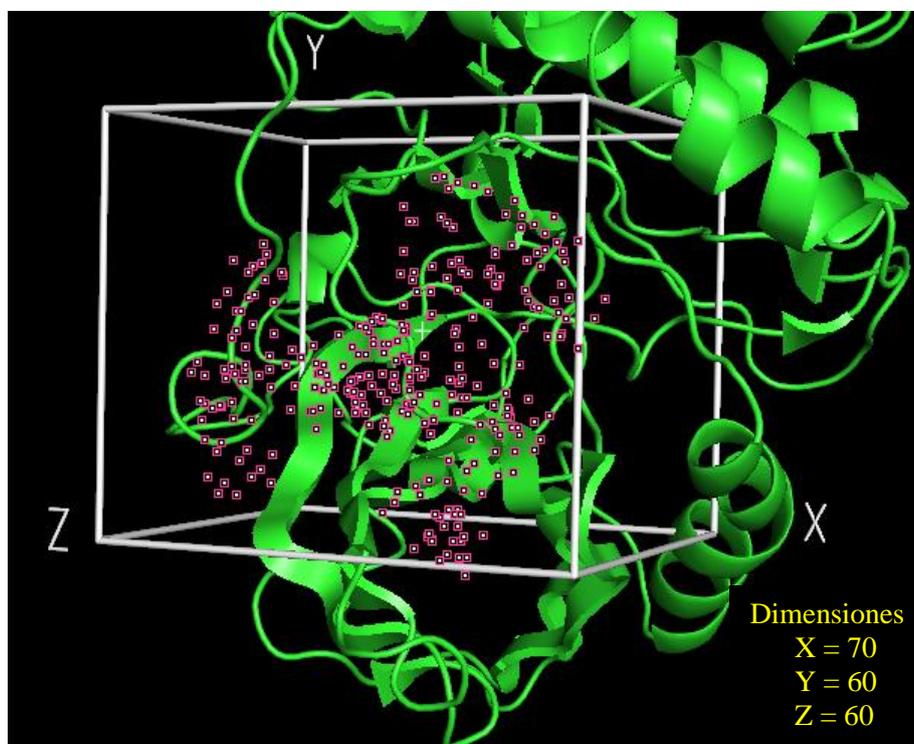
*Nota.* Los Matching Features corresponden a la distribución del patrón de características farmacofóricas codificadas por colores que coinciden en su disposición con las moléculas; se observa también el Pharmacophore-Fit Score, la naturaleza de las moléculas dentro de la librería siendo separadas en activas o señuelos y el Score.

### 9.2.3 Validación del protocolo de acoplamiento molecular para las Aminopirimidinas

La validación del protocolo de acoplamiento molecular para los compuestos derivados de aminopirimidinas se realizó utilizando Autodock Vina local. Esta validación consistió en la creación de una caja de grid utilizando la interfaz gráfica de Autodock Tools 1.5.6 abarcando el sitio activo de PknG para la reproducción del cristal 2PZI (Figura 8) y posteriormente el acoplamiento molecular haciendo uso de Autodock Vina local desde el símbolo del sistema (CMD de Windows). El resultado del acoplamiento molecular reportó una buena superposición espacial de las coordenadas experimentales del AX20017 co-cristalizado en 2PZI, y las calculadas, AX20017 acoplado molecularmente con la caja de grid creada (Figura 9) obteniendo valores de RMSD de 0.71Å en promedio (Tabla 11). Los experimentos fueron realizados por triplicado para asegurar la reproducibilidad del protocolo y del ordenador en uso. De estos experimentos se demostró que el parámetro 80 de exhaustiveness fue suficiente para confirmar que la caja de grid creada fue idónea al lograr reconstruir con éxito el complejo del cristal 2PZI tanto en orientación espacial como en la reproducción de las interacciones intermoleculares del compuesto AX20017 en el sitio activo de PknG reportadas experimentalmente (Scherr, *et al.* 2007) (Figura 10).

**Figura 8**

*Caja de Grid creada en Autodock Tools 1.5.6*

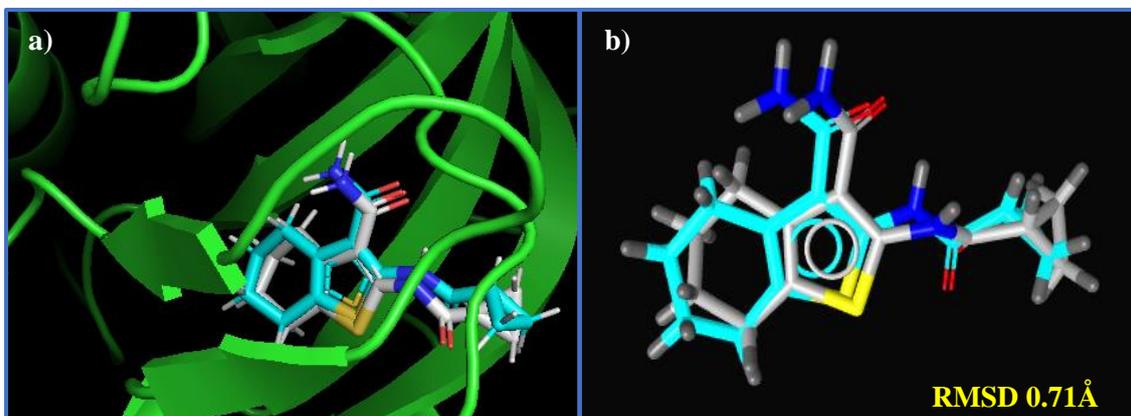


*Nota.* Se creó la caja de grid abarcando los aminoácidos del sitio activo de PknG (cuadros rosados) para el acoplamiento molecular de compuestos derivados de aminopirimidinas. Así mismo se

muestran las dimensiones de la caja de grid en los ejes X, Y, Z.

### Figura 9

*Validación del protocolo de acoplamiento molecular para los derivados de aminopirimidinas*



*Nota.* (a) Vista general de los complejos PknG de *Mtb* y AX20017; en color gris conformación calculada por acoplamiento molecular de AX20017 y en turquesa la hallada experimental; (b) RMSD calculado entre la conformación experimental y las conformaciones obtenidas por acoplamiento molecular de AX20017.

### Tabla 11

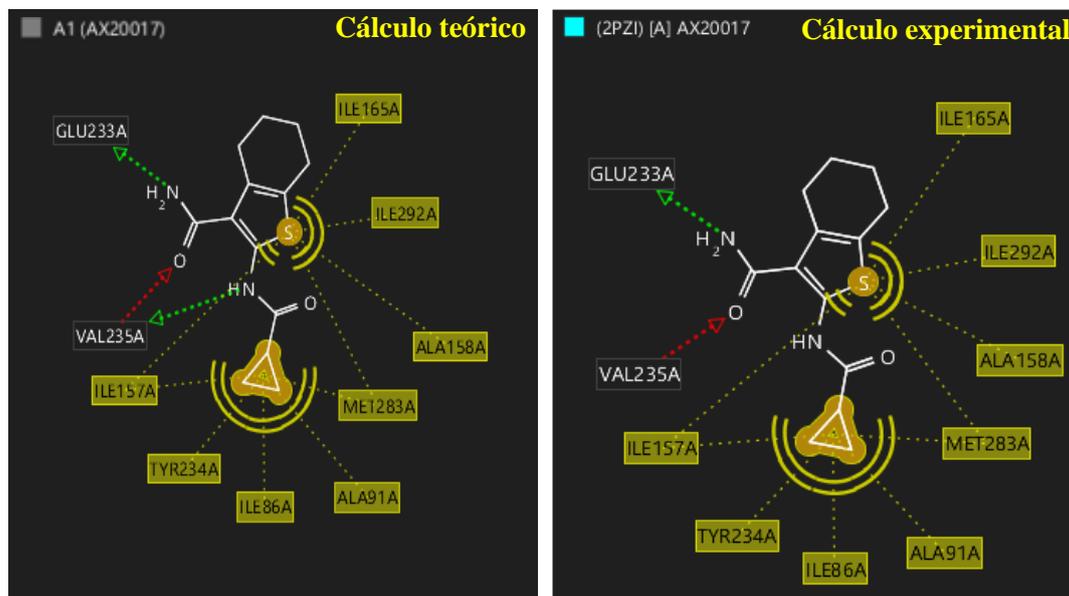
*RMSD de validación de la caja de grid*

Validación del protocolo de acoplamiento molecular - aminopirimidinas			
Conformación	Cálculo 1 (RMSD)	Cálculo 2 (RMSD)	Cálculo 3 (RMSD)
1	0.713	0.715	0.728

*Nota.* Valores de RMSD obtenidos por los cálculos por triplicado para la validación de la caja de grid y del protocolo de acoplamiento molecular entre AX20017 y PknG de *Mtb* en Autodock Vina local.

**Figura 10**

*Mapas de interacciones intermoleculares entre el compuesto AX20017 y la proteína PknG de Mtb*



*Nota.* Interacciones halladas a partir del cálculo de acoplamiento molecular con Autodock Vina local (izquierda) e interacciones encontradas del análisis del cristal 2PZI (derecha).

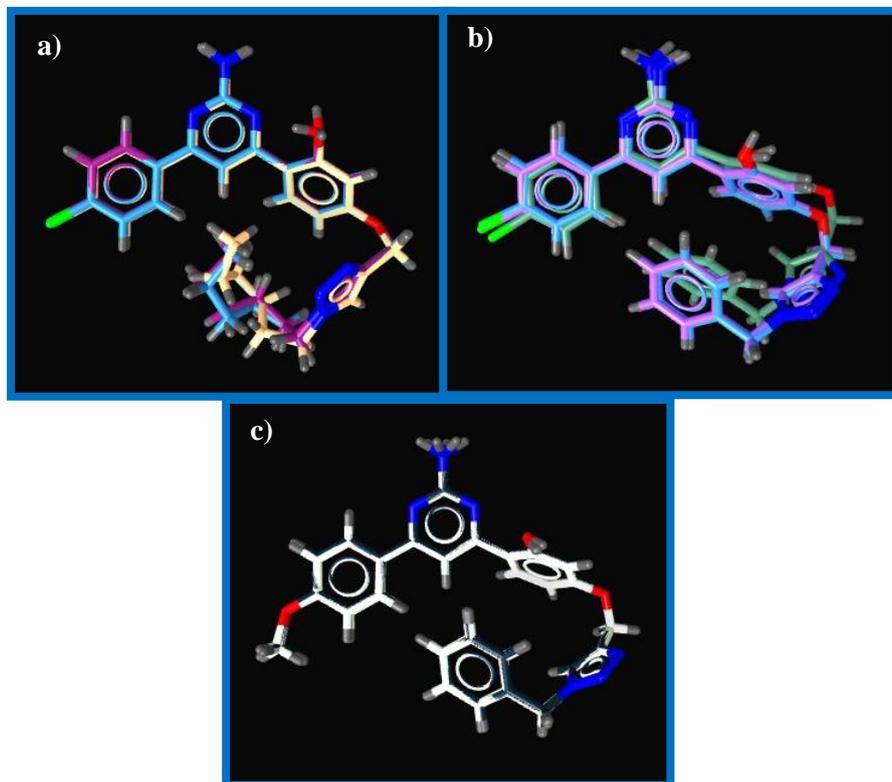
## 9.2.4 Diseño de farmacóforo para Aminopirimidinas

### 9.2.4.1 Cálculos de acoplamiento y análisis de interacciones moleculares para Aminopirimidinas

Una vez validado el protocolo de acoplamiento molecular de los derivados de aminopirimidinas, se estudiaron los modos de unión de estas moléculas frente a PknG, para ello se realizaron 51 cálculos de acoplamiento molecular en total siendo cada cálculo realizado por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Como ejemplos representativos se muestran las conformaciones obtenidas del acoplamiento molecular de las moléculas 6\_2, 6\_9 y 6\_11 (Figura 11) las cuales presentan porcentajes de inhibición a 100 $\mu$ M de 43 $\pm$ 2.94%, 53 $\pm$ 0.61% y 43 $\pm$ 0.61% respectivamente. Estas moléculas fueron las tres más activas de un total de diecisiete moléculas (para más información ver anexos).

### Figura 11

*Reproducibilidad de los cálculos triplicados de acoplamiento molecular para moléculas de los compuestos derivados de aminopirimidinas frente a PknG de Mtb*

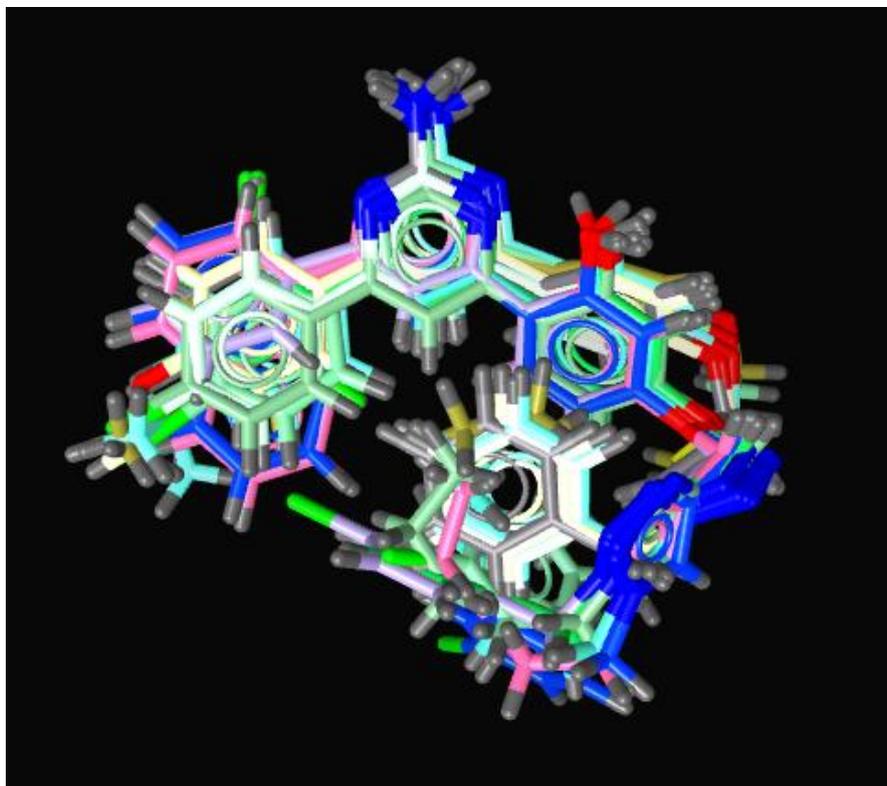


*Nota.* (a) Superposición de cálculos de la molécula 6\_2; (b) Superposición de cálculos de la molécula 6\_9; (c) Superposición de cálculos de la molécula 6\_11.

Tomando como referencia las interacciones moleculares realizadas por el inhibidor AX20017 con PknG, se pudo comprobar que todos los derivados de aminopirimidinas a pesar de disminuir en su porcentaje de inhibición lograron recrear la red de interacciones moleculares indispensables por lo que se tomaron a todas como activas. (Figura 12).

## Figura 12

*Resultados de acoplamiento molecular para moléculas de los compuestos derivados de aminopirimidinas frente a PknG de Mtb*



*Nota.* Todos los compuestos derivados de aminopirimidinas presentan la misma orientación espacial dentro del sitio activo de PknG.

Se llevó un registro de los tipos de interacciones moleculares que realizan cada una de los derivados de aminopirimidinas en el sitio activo de PknG (Tabla 12).

**Tabla 12**

*Interacciones moleculares de los derivados de Aminopirimidinas unidas al sitio activo de PknG mediante acoplamiento molecular*

Molécula	Aminoácidos que conforman el sitio activo/sitio catalítico de PknG																		
	ILE 86	ASP 87	ALA 91	LEU 92	ILE 157	ALA 158	ILE 165	VAL 179	LYS 181	MET 232	GLU 233*	TYR 234	VAL 235*	GLY 237	GLN 238	SER 239	MET 283	ILE 292	ASP 293
AX20017																			
6_1																			
6_2																			
6_3																			
6_4																			
6_5																			
6_6																			
6_7																			
6_8																			
6_9																			
6_10																			
6_11																			
6_12																			
6_13																			
6_14																			
6_15																			
6_16																			
6_17																			

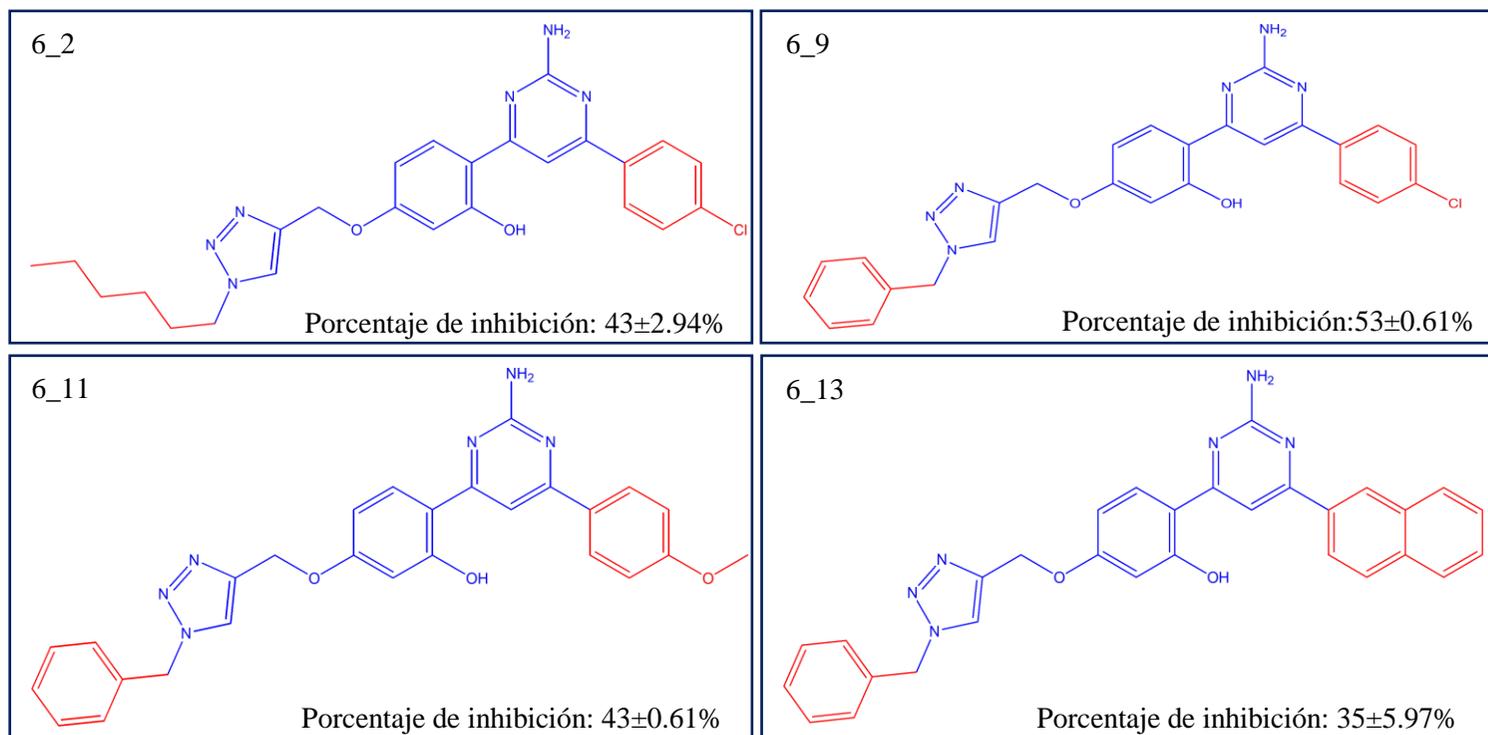
*Nota.* Los aminoácidos en color negro son aquellos reportados por la literatura de PknG (Caballero, *et al.* 2018); aminoácidos de color rojo muestran potenciales nuevas interacciones detectadas en LigandScout. El color amarillo representa interacciones hidrofóbicas, color rojo aceptores de enlaces de hidrógeno, color verde donadores de enlaces de hidrógeno y color blanco ausencia de interacción con el aminoácido. AX20017 se muestra como control. (\*) aminoácidos importantes esenciales para una buena interacción

### 9.2.4.2 Creación de farmacóforo para Aminopirimidinas

En el módulo de aproximación “Structure-based”, se procedió a crear los modelos farmacofóricos para cada integrante de la familia para posteriormente crear un modelo unificado o fusionado tomando como referencia las moléculas más activas de la serie: es decir, las moléculas con mayor porcentaje de inhibición frente a PknG. Estas a su vez fueron seleccionadas al aportar variabilidad química dentro del núcleo principal de aminopirimidinas (Figura 13).

**Figura 13**

*Moléculas usadas para la creación del farmacóforo de la serie de aminopirimidinas*



*Nota.* Se muestra su porcentaje de inhibición y los respectivos sustituyentes químicos (color rojo) alrededor del núcleo de la familia (color azul).

A continuación, se realizó una matriz para evaluar el desempeño de los modelos farmacofóricos fusionados en la detección de los compuestos derivados de aminopirimidinas (Tabla 13).

**Tabla 13**

*Matriz de combinaciones de modelos farmacofóricos fusionados para la detección de los derivados de aminopirimidinas*

	6_9	6_2	6_11	6_13
6_9	X	0/17	7/17	12/17
6_2	0/17	X	0/17	0/17
6_11	6/17	0/17	X	6/17
6_13	11/17	0/17	6/17	X

*Nota.* Sombreado en amarillo la combinación que detecta la mayoría de las moléculas. (X) combinaciones no realizadas por tratarse de la misma molécula.

Tomando los modelos farmacofóricos de las moléculas 6\_9 y 6\_13 se procedió a crear el farmacóforo de los derivados de aminopirimidinas. Este nuevo farmacóforo involucra 9 características farmacofóricas (Tabla 14) con una disposición espacial específica (Figura 14).

**Tabla 14**

*Composición del farmacóforo para los derivados de aminopirimidinas*

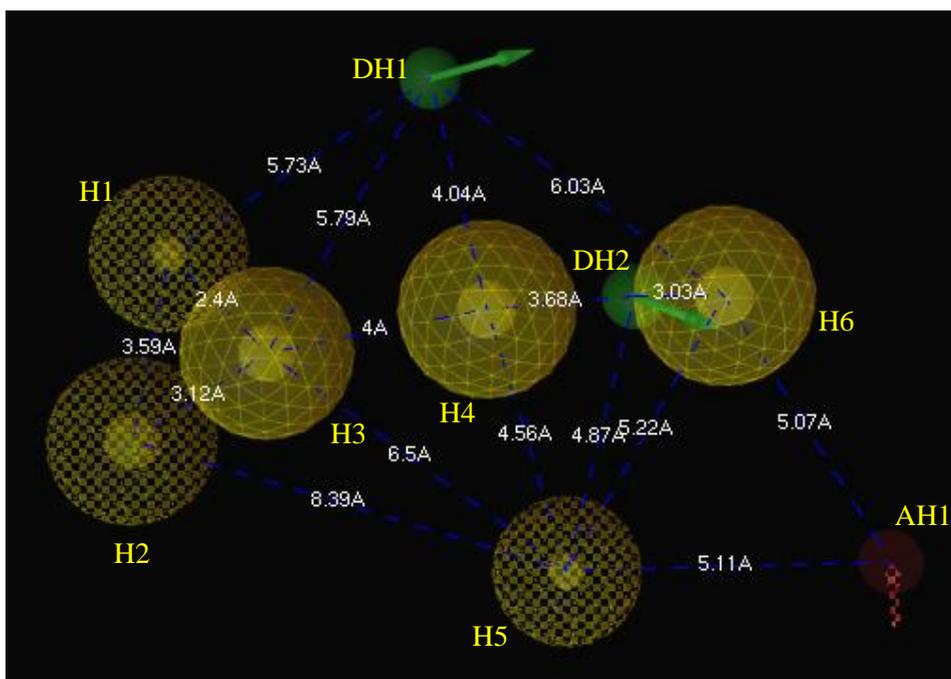
Nombre de la característica farmacofórica	Tipo de característica farmacofórica	Coordenadas tridimensionales			Tamaño de Tolerancia
		X	Y	Z	
H1	Hidrófobo	24.25	-10.45	-7.24	1.35
H2	Hidrófobo	23.33	8.87	-10.33	1.5
H3	Hidrófobo	22.18	-9.25	-7.45	1.5
H4	Hidrófobo	19.68	-8.93	-4.35	1.5
H5	Hidrófobo	17.62	-5.04	-5.51	1.2
H6	Hidrófobo	16.67	-8.59	-1.80	1.5
AH1	Aceptor de enlaces de hidrógeno	15.64	-1.98	-0.87	1
DH1	Donador de enlaces de hidrógeno	22.30	-10.76	-1.87	1

DH2	Donador de enlaces de hidrógeno	19.15	-6.93	-1.30	1
-----	---------------------------------	-------	-------	-------	---

*Nota.* Se hace mención de sus características farmacofóricas junto con sus coordenadas tridimensionales y tamaño de tolerancia.

### Figura 14

*Disposición espacial del farmacóforo creado para los derivados de aminopirimidinas*



*Nota.* Las características farmacofóricas se encuentran codificadas por colores: hidrófobo (amarillo), aceptores de enlaces de hidrógeno (rojo), donadores de enlaces de hidrógeno (verde); los tamaños de las características indican el cambio de tamaño de tolerancia. Se muestra también las distancias entre cada una de ellas en ángstroms (Å).

Al modificar los tamaños de tolerancias y realizar el tamizaje inicial, este modelo farmacofórico logró detectar a los 17 derivados de aminopirimidinas dando como resultado una tasa de aciertos del 100% (Figura 15).

**Figura 15**

*Tasa de aciertos del farmacóforo de Aminopirimidinas en la aproximación basada en el receptor*

	Name	Matching Features	Pharmacophore-Fit Score	Active/Decoy	Score
1	6_12	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	75.87	active	75.87
2	6_16	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	66.42	active	66.42
3	6_8	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	66.14	active	66.14
4	6_4	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	65.85	active	65.85
5	6_1	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	65.78	active	65.78
6	6_6	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	65.76	active	65.76
7	6_14	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	65.72	active	65.72
8	6_13	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	65.67	active	65.67
9	6_11	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	61.60	active	61.60
10	6_15	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	61.34	active	61.34
11	6_3	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	56.14	active	56.14
12	6_10	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	56.13	active	56.13
13	6_7	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	56.03	active	56.03
14	6_5	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	55.66	active	55.66
15	6_9	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	55.54	active	55.54
16	6_2	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	55.54	active	55.54
17	6_17	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	55.43	active	55.43

*Nota.* Los Matching Features corresponden a la distribución del patrón de características farmacofóricas codificadas por colores que coinciden en su disposición con las moléculas; se observa también el Pharmacophore-Fit Score, la naturaleza de las moléculas dentro de la librería siendo separadas en activas o señuelos y el Score.

### 9.3 Aproximación basada en el ligando

#### 9.3.1 Diseño de farmacóforo para la Serie A-C

##### 9.3.1.1 Elección de moléculas

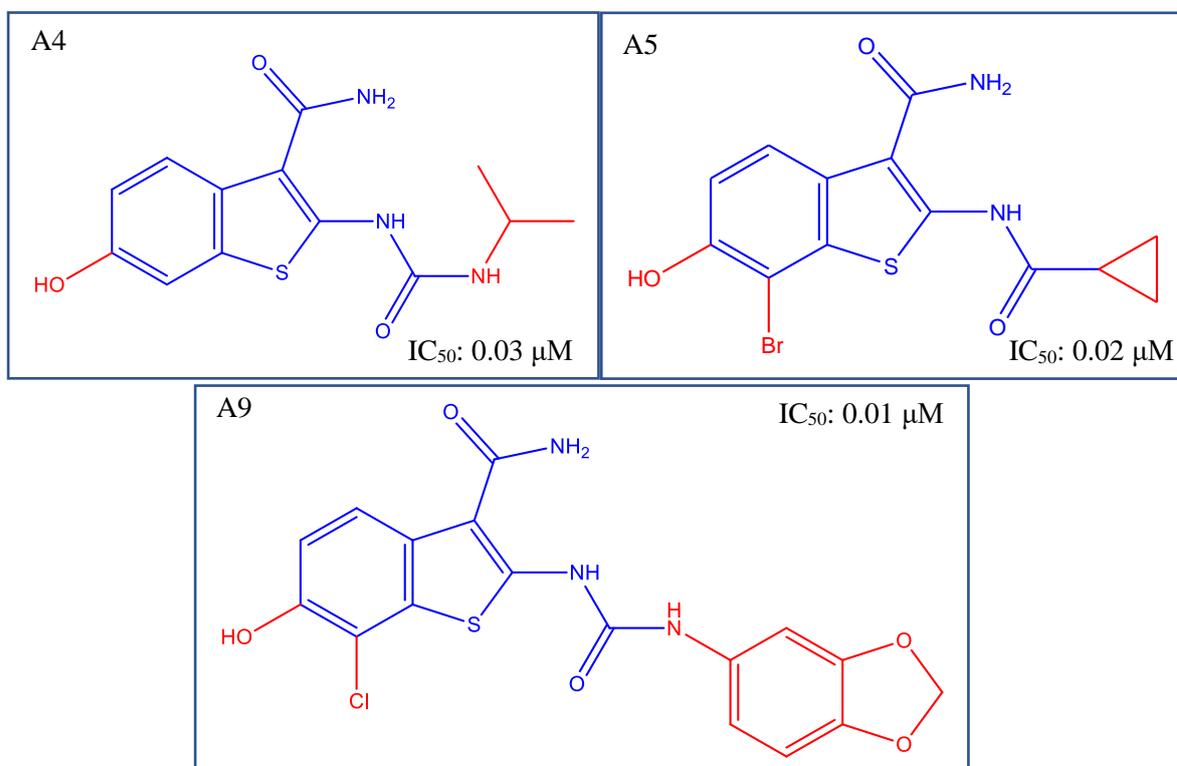
Para la elección de las moléculas en el conjunto de entrenamiento en la aproximación basada en el ligando de la Serie A-C se establecieron dos reglas teóricas como requisito:

1. Selección de las moléculas más activas en base al  $IC_{50}$  frente a PknG. Siendo además un número no mayor de 3 moléculas.
2. Presencia de aporte de variabilidad química en sus estructuras.

Haciendo uso de estas reglas teóricas las moléculas escogidas en el conjunto de entrenamiento fueron A4, A5 y A9 (Figura 16).

## Figura 16

Moléculas que conforman el conjunto de entrenamiento para la generación de un farmacóforo de la Serie A-C con sus  $IC_{50}$  reportados



*Nota.* En color azul se indica el núcleo de la familia y en color rojo los sustituyentes químicos de cada molécula.

Las otras trece moléculas restantes de la serie A fueron colocadas en el conjunto de prueba para que una vez creado el modelo farmacofórico automáticamente este sea probado con todas ellas para poder así observar su funcionamiento y puntuación con el Pharmacophore Fit-Score (Figura 17).

**Figura 17**

*Conjunto de entrenamiento y conjunto de prueba*

	Active		Name	Type
1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	A9	Training
2	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	A5	Training
3	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	A4	Training
4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SS_A10	Test
5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	RR_A10	Test
6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	RS_A10	Test
7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SR_A10	Test
8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SS_A6	Test
9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	RR_A6	Test
10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	RS_A6	Test
11	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SR_A6	Test
12	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A8	Test
13	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A7	Test
14	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A3	Test
15	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A2	Test
16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A1	Test

*Nota.* Las moléculas A4, A5 y A9 fueron seteadas como entrenamiento y los demás integrantes de esta serie como prueba.

### 9.3.1.2 Creación de farmacóforo para la Serie A-C

Se utilizó el tipo de farmacóforo fusionado, mejor conocido como “merge”, para el módulo basado en el ligando. Dentro de los 10 modelos que proporciona LigandScout como respuesta en esta aproximación (Figura 18) a pesar de que el modelo número 4 presenta un score de 0.9198 éste fue escogido por el buen alineamiento que presentan sus características farmacofóricas con todos los integrantes de la serie A, así como la posición del ranking de actividad de las moléculas y su alto Pharmacophore-Fit Score que oscila entre 144.75 a 87.13 (Figura 19).

**Figura 18**

*Modelos que proporciona LigandScout en respuesta a la aproximación “Ligand-based” de la Serie A-C*

Name	Score
Modelo_SerieA_C_1	0.9240
Modelo_SerieA_C_2	0.9236
Modelo_SerieA_C_3	0.9219
Modelo_SerieA_C_4	0.9198
Modelo_SerieA_C_5	0.9190
Modelo_SerieA_C_6	0.9169
Modelo_SerieA_C_7	0.9158
Modelo_SerieA_C_8	0.9142
Modelo_SerieA_C_9	0.8931
Modelo_SerieA_C_10	0.8908

*Nota.* Se muestran los 10 modelos de respuesta con sus scores respectivos.

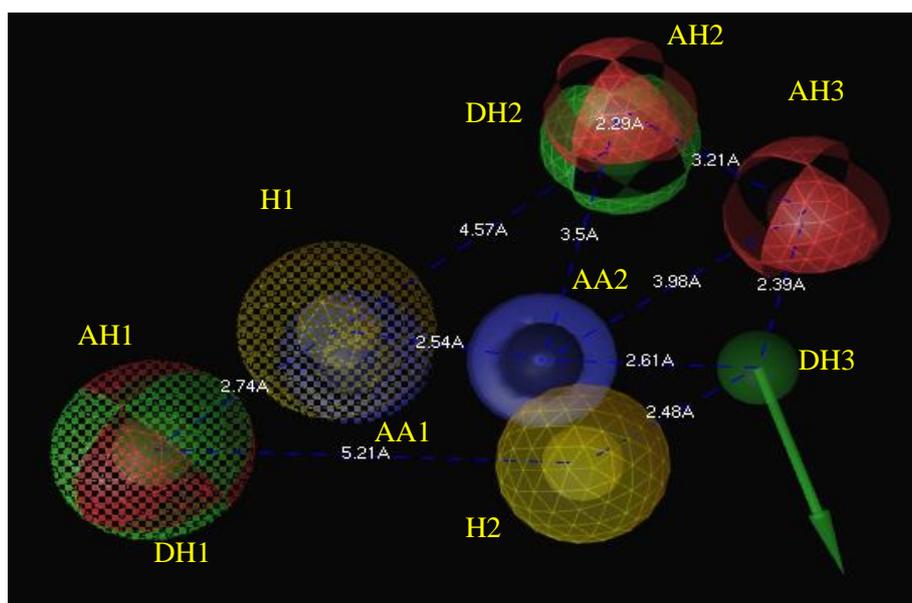


AH3	Aceptor de enlaces de hidrógeno	2.00	0.18	0.78	1.05
DH1	Donador de enlaces de hidrógeno	-5.36	0.56	5.42	1.2
DH2	Donador de enlaces de hidrógeno	1.55	-0.17	3.32	1.05
DH3	Donador de enlaces de hidrógeno	-0.24	0.64	0.06	1.05

*Nota.* Se hace mención de sus características farmacofóricas junto con sus coordenadas tridimensionales y tamaño de tolerancia.

### Figura 20

*Disposición espacial del farmacóforo optimizado para la Serie A-C*



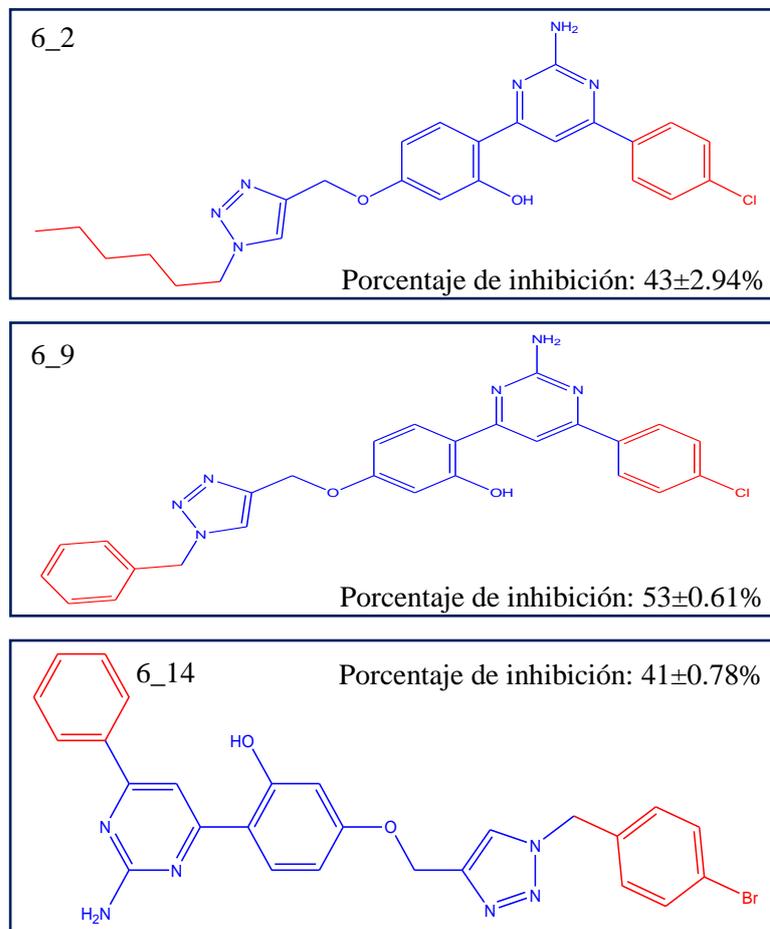
*Nota.* Las características farmacofóricas se encuentran codificadas por colores: hidrófobo (amarillo), aceptores de enlaces de hidrógeno (rojo), donadores de enlaces de hidrógeno (verde), anillos aromáticos (azul); los tamaños de las características indican el cambio de tamaño de tolerancia. Se muestra también las distancias entre cada una de ellas en ángstroms (Å).

Al realizar el tamizaje inicial con las moléculas activas de la Serie A-C, este modelo farmacofórico logró detectar a las 16 moléculas de la serie A y las 4 moléculas de la serie C dando como resultado una tasa de aciertos del 100% (Figura 20). El orden descendente de la lista de hits clasificado por el Pharmacophore-Fit Score guarda similitud con lo reportado experimentalmente



## Figura 21

Moléculas escogidas para el conjunto de entrenamiento de derivados de aminopirimidinas.



*Nota.* Se presentan las estructuras de las moléculas escogidas como entrenamiento junto con sus porcentajes de inhibición. En color azul se indica el núcleo de la familia y en color rojo los sustituyentes químicos de cada molécula.

El conjunto de entrenamiento de los derivados de aminopirimidinas en LigandScout quedó de la siguiente manera (Figura 22).

## Figura 22

Conjunto de entrenamiento de los derivados de aminopirimidinas.

	Active		Name	Type
1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6_14	Training
2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6_9	Training
3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6_2	Training

Nota. Las moléculas 62, 6\_9 y 6\_14 fueron seteadas en el conjunto de entrenamiento.

### 9.3.2.2 Creación de farmacóforo para Aminopirimidinas

Utilizando el tipo de farmacóforo fusionado, se obtuvieron 10 modelos de respuesta proporcionados por LigandScout en esta aproximación (Figura 23) a pesar de que el modelo número 3 presenta un score de 0.9192 éste fue escogido por el buen alineamiento que presentan sus características farmacofóricas con los derivados de aminopirimidinas, así como la posición del ranking de actividad de las moléculas y su alto Pharmacophore-Fit Score que oscila entre 175.19 a 161.80 (Figura 24).

## Figura 23

Modelos que proporciona LigandScout en respuesta a la aproximación "ligand-based" de los derivados de aminopirimidinas.

Name	Score
Modelo_Aminopirimidinas_1	0.9404
Modelo_Aminopirimidinas_2	0.9224
Modelo_Aminopirimidinas_3	0.9192
Modelo_Aminopirimidinas_4	0.9167
Modelo_Aminopirimidinas_5	0.9142
Modelo_Aminopirimidinas_6	0.9056
Modelo_Aminopirimidinas_7	0.8980
Modelo_Aminopirimidinas_8	0.8910
Modelo_Aminopirimidinas_9	0.8816
Modelo_Aminopirimidinas_10	0.8810

Nota. Se muestran los 10 modelos de respuesta con sus scores respectivos.

**Figura 24**

*Modelo farmacofórico número 3 proporcionado por LigandScout*

Name	Type	Matching Features	Pharmacophore-Fit <sup>T</sup>
6_9	Training		175.19
6_2	Training		161.85
6_14	Training		161.80

*Nota.* Se observa el alto Pharmacophore-Fit Score oscilando entre 175.19 a 161.80. La codificación de los Matching Features por colores pertenecen a: anillo aromático (azul), hidrófobo (amarillo), aceptores de enlaces de hidrógeno (rojo), donadores de enlaces de hidrógeno (verde), donador de enlace de halógeno (morado).

Posterior al análisis de todas las características farmacofóricas generales del modelo 3, aprovechando el buen alineamiento que presenta, se eliminaron 3 características para conseguir establecer un mejor ajuste, quedando conformado finalmente por 15 características farmacofóricas (Tabla 16) con una disposición espacial específica (Figura 25).

**Tabla 16**

*Composición del farmacóforo para los derivados de aminopirimidinas en la aproximación basada en el ligando*

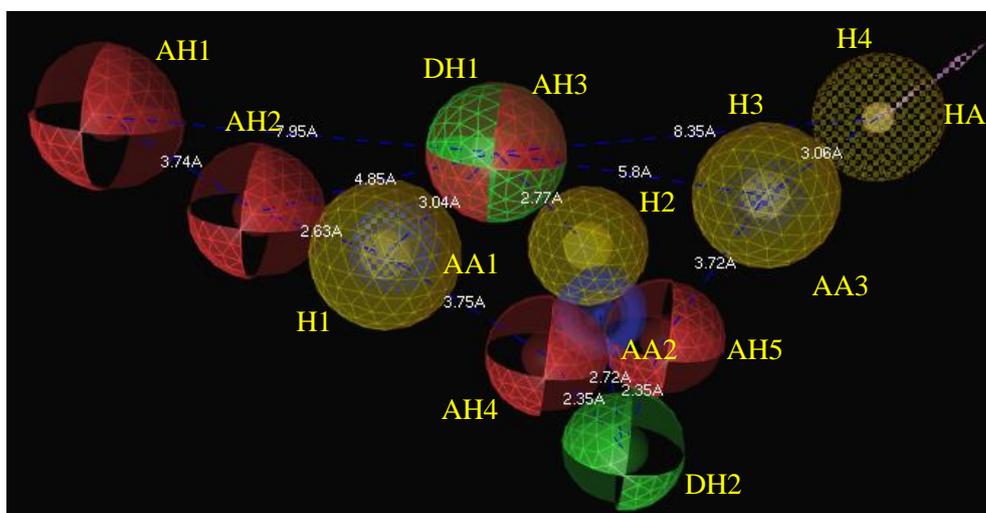
Nombre de la característica farmacofórica	Tipo de característica farmacofórica	Coordenadas tridimensionales			Tamaño de Tolerancia
		X	Y	Z	
H1	Hidrófobo	-3.05	0.02	1.96	1.5
H2	Hidrófobo	-7.01	0.63	1.46	1.2
H3	Hidrófobo	-10.51	1.74	0.26	1.5
H4	Hidrófobo	-12.75	2.98	-1.42	1.35
AA1	Anillo aromático	-3.24	0.02	1.75	0.89
AA2	Anillo aromático	-7.39	0.01	2.64	0.89
AA3	Anillo aromático	-10.47	1.72	0.29	0.89
HA1	Donador de enlaces de halógeno	-12.75	2.98	-1.42	1.2
AH1	Aceptor de enlaces de hidrógeno	2.87	1.00	0.08	1.5

AH2	Aceptor de enlaces de hidrógeno	-0.49	0.00	1.38	1.35
AH3	Aceptor de enlaces de hidrógeno	-5.01	0.02	-0.36	1.35
AH4	Aceptor de enlaces de hidrógeno	-6.45	-0.57	3.45	1.2
AH5	Aceptor de enlaces de hidrógeno	-8.72	-0.03	3.00	1.2
DH1	Donador de enlaces de hidrógeno	-5.01	0.02	-0.36	1.35
DH2	Donador de enlaces de hidrógeno	-8.14	-1.20	4.95	1.2

*Nota.* Se hace mención de sus características farmacofóricas junto con sus coordenadas tridimensionales y tamaño de tolerancia.

### Figura 25

*Disposición espacial del farmacóforo optimizado para los derivados de aminopirimidinas*



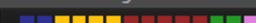
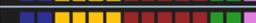
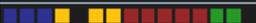
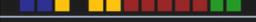
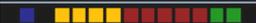
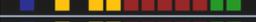
*Nota.* Las características farmacofóricas se encuentran codificadas por colores: hidrófobo (amarillo), aceptores de enlaces de hidrógeno (rojo), donadores de enlaces de hidrógeno (verde), anillos aromáticos (azul), donador de enlaces de halógeno (morado); los tamaños de las características indican el cambio de tamaño de tolerancia. Se muestra también las distancias entre cada una de ellas en ángstroms (Å).

A realizar el tamizaje inicial, este modelo fue capaz de detectar a todos los integrantes de los

derivados de aminopirimidinas dando como resultado una tasa de aciertos del 100% (Figura 25).

### Figura 25

*Tasa de aciertos del farmacóforo de los derivados de aminopirimidinas en la aproximación basada en el ligando*

Hits for Query »Model-3«		Hitrate: 100.00% (17 of 17)	Filter:   		
	Name	Matching Features <sup>T</sup>	Pharmacophore-Fit Score <sup>F</sup>	Active/Decoy <sup>T</sup>	Score <sup>F</sup>
1	6_9		141.67	active	141.67
2	6_2		141.15	active	141.15
3	6_10		138.08	active	138.08
4	6_1		128.47	active	128.47
5	6_14		128.23	active	128.23
6	6_17		128.09	active	128.09
7	6_13		128.09	active	128.09
8	6_8		126.50	active	126.50
9	6_12		123.10	active	123.10
10	6_16		123.05	active	123.05
11	6_5		122.97	active	122.97
12	6_11		116.61	active	116.61
13	6_15		116.55	active	116.55
14	6_7		116.49	active	116.49
15	6_4		116.48	active	116.48
16	6_3		116.43	active	116.43
17	6_6		116.27	active	116.27

*Nota.* Los Matching Features corresponden a la distribución del patrón de características farmacofóricas codificadas por colores que coinciden en su disposición con las moléculas; se observa también el Pharmacophore-Fit Score, la naturaleza de las moléculas dentro de la librería siendo separadas en activas o señuelos y el Score.

- B. Refinar y validar en forma teórica los modelos farmacofóricos generados mediante el uso de volúmenes de exclusión, compuestos señuelos, información disponible en la literatura (Verdaderos Positivos y Verdaderos Negativos) y análisis de desempeño

#### 9.4 Modelos en la aproximación basados en el receptor

##### 9.4.1 Serie A-C

###### 9.4.1.1 Refinamiento

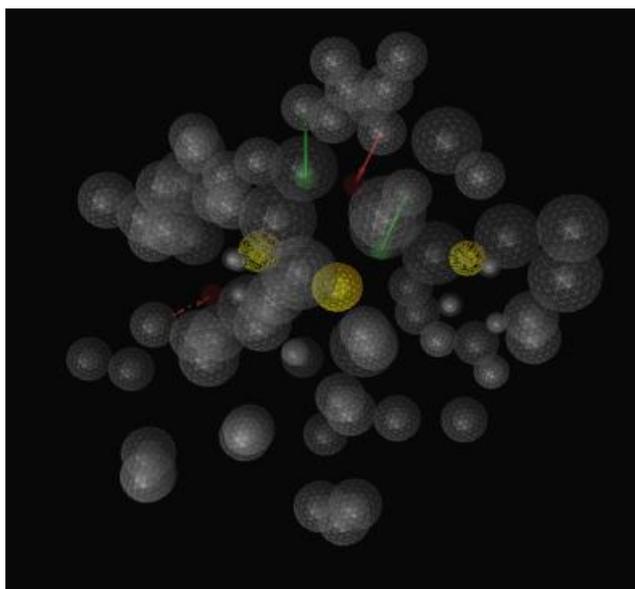
El refinamiento de los modelos se realizó mediante la adición de volúmenes de exclusión. Para la validación teórica de los modelos se utilizaron moléculas señuelo y moléculas experimentalmente activas e inactivas frente a PknG de *Mtb*.

###### 9.4.1.1.1 Uso de volúmenes de exclusión

Los volúmenes de exclusión (EXVOL's) fueron adicionados tratando de imitar la cavidad correspondiente al sitio activo y catalíticos de la PknG de *Mtb*. Estos volúmenes tuvieron la función de impedir estéricamente el emparejamiento no deseado de alguna molécula inactiva con el farmacóforo creado inicialmente (farmacóforo sin refinar). Estos volúmenes de exclusión son complementarios a las demás características farmacofóricas (Figura 26), además de ser únicos para cada modelo en su espacio tridimensional (Tabla 17).

#### Figura 26

*Volúmenes de exclusión*



*Nota.* Adicionados al farmacóforo creado inicialmente para la Serie A-C (esferas en gris) usando la aproximación basada en el receptor.

**Tabla 17**

*Coordenadas tridimensionales de los volúmenes de exclusión adicionados al farmacóforo creado inicialmente para la Serie A-C.*

<b>EXVOLs</b>	<b>Coordenadas (X, Y, Z)</b>
EXVOL1	25.98, -0.50, -12.98
EXVOL2	25.86, -2.00, -12.97
EXVOL3	24.97, -2.49, -14.09
EXVOL4	23.93, 13.44, -15.34
EXVOL5	25.49, -14.12, -16.32
EXVOL6	19.09, -1.66, -10.97
EXVOL7	18.79, -0.30, -10.30
EXVOL8	18.92, -0.28, -9.54
EXVOL9	26.06, -10.45, 3.73
EXVOL10	29.47, -12.65, -4.60
EXVOL11	33.33, -3.08, -5.97
EXVOL12	19.56, -9.33, -13.41
EXVOL13	13.91, -10.45, -4.02
EXVOL14	27.55, -14.74, -6.82
EXVOL15	16.55, -16.42, -11.25

*Nota.* Coordenadas en la aproximación basado en el receptor.

#### **9.4.1.2 Validación Teórica**

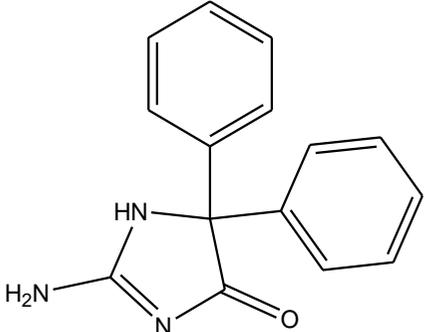
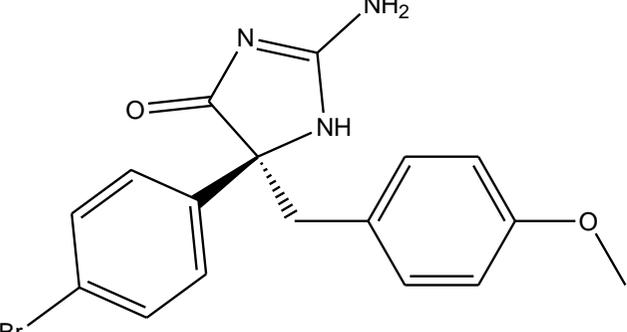
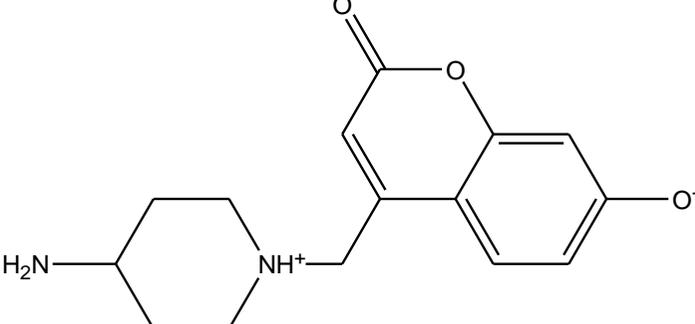
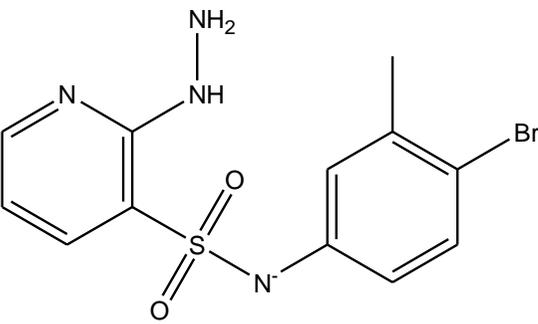
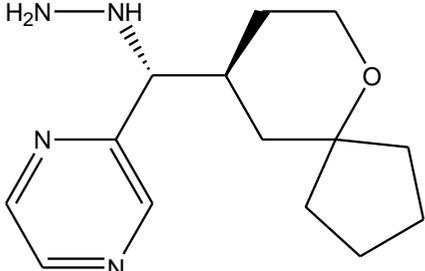
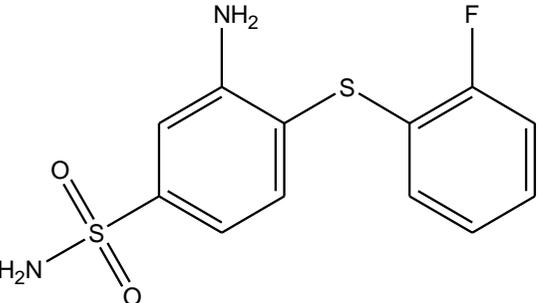
Una vez terminado el refinamiento de un modelo se procedió a examinar su desempeño bajo condiciones controladas; es decir, conociendo de ante mano el número de moléculas activas e inactivas.

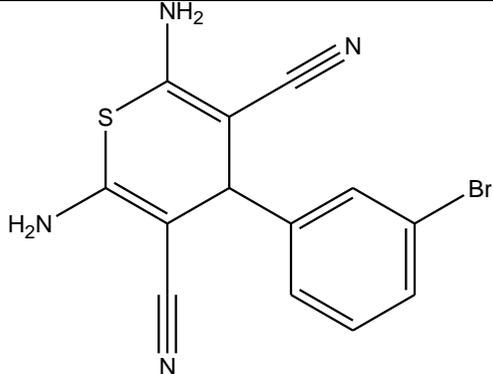
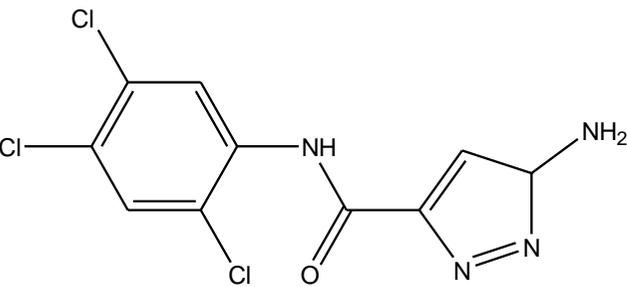
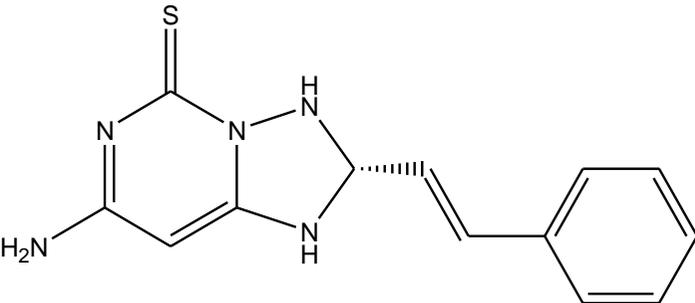
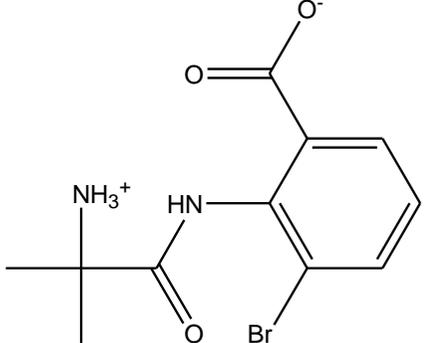
##### **9.4.1.2.1 Uso de moléculas señuelo**

Según literatura, a cada molécula considerada como activa le corresponde generar 50 señuelos. Para la Serie A (16 moléculas activas) y Serie C (4 moléculas activas) se crearon 1000 señuelos virtuales (20 moléculas x 50 señuelos virtuales) provenientes de la página de DUD-E. Se muestran como ejemplo los originados a partir de la molécula A5 (Tabla 18). La información completa de los señuelos utilizados puede ser encontrados en la sección de anexos como archivo SMILE. Nótese la diferencia estructural con los activos de PknG.

**Tabla 18**

Moléculas clasificadas como señuelos virtuales originadas a partir de la molécula A5

C12376028		C71974989	
C36754171		C35358189	
C97502636		C36926849	

C19597295		C80652908	
C40176448		C62826953	

*Nota.* Cincuenta en total, para el ejemplo solo se muestran 10. Se puede notar que estas no comparten similitud estructural



Para obtener los parámetros teóricos estos fueron validados utilizando diferentes descriptores como: Sensibilidad, Especificidad, Factor de desempeño (EF) Güñner-Henry score (GH), ROC (Curva ROC) y AUC (Área bajo la curva). Estos parámetros estadísticos sobre el desempeño del modelo fueron calculados (para más detalles revisar marco teórico, página 15) (Tabla 20 y Figura 28), destacando la sensibilidad y especificidad de 1 y 0.994 respectivamente. Además de un EF de 43.21, un GH de 0.8218 y un AUC de 1.

**Tabla 20**

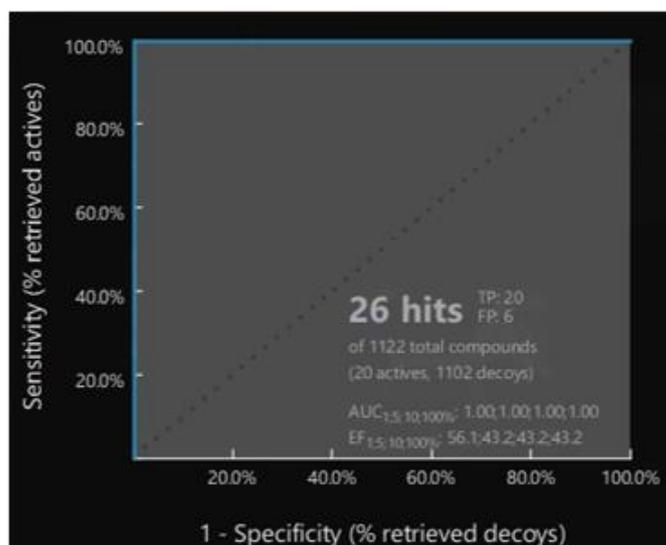
*Análisis de desempeño del farmacóforo optimizado para la Serie A-C*

Parámetros	Aproximación basado en el receptor
N° total de moléculas en la base de datos ( <b>D</b> )	1122
N° total de moléculas de activos en la base de datos ( <b>A</b> )	20
N° total de moléculas de inactivos en la base de datos ( <b>I</b> )	1102
Hits totales ( <b>Ht</b> )	26
Verdaderos positivos ( <b>Tp</b> )	20
Verdaderos negativos ( <b>Tn</b> )	1102
Falsos positivos ( <b>Fp</b> )	6
Falsos negativos ( <b>Fn</b> )	0
Sensibilidad ( <b>Se</b> )	1
Especificidad ( <b>Sp</b> )	0.994
% Rendimiento de activos ( <b>YA x 100</b> )	76.9%
% Ratio de activos ( <b>RA x 100</b> )	100%
Factor de enriquecimiento ( <b>EF</b> )	43.21
Güñner - Henry score ( <b>GH</b> )	0.8218
AUC	1

*Nota.* Se pueden observar los descriptores como Factor de Enriquecimiento (EF), Güñner - Henry Score (GH), Sensibilidad, Especificidad, entre otros.

**Figura 28**

*Curva ROC del farmacóforo optimizado de la Serie A-C*



*Nota.* Se aprecia que al realizar el tamizaje, este modelo obtuvo una curva ROC ideal.

## 9.4.2 Aminopirimidinas

### 9.4.2.1 Refinamiento

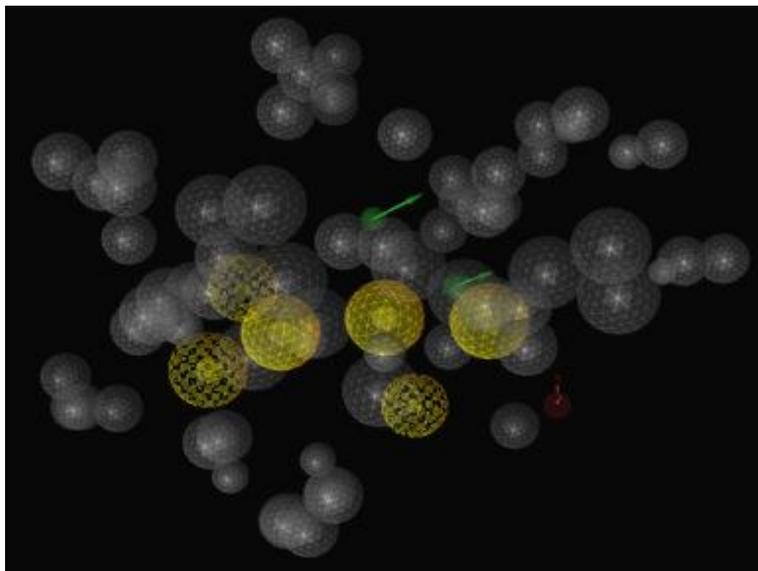
El refinamiento de los modelos se realizó mediante la adición de volúmenes de exclusión. Para la validación teórica de los modelos se utilizaron moléculas señuelo.

#### 9.4.2.1.1 Uso de volúmenes de exclusión

Los volúmenes de exclusión se adicionaron tratando de imitar la cavidad correspondiente al sitio activo y catalíticos de la PknG de *Mtb* para evitar de manera estérica el emparejamiento de moléculas inactivas con el farmacóforo sin refinar. Estos volúmenes de exclusión son complementarios a las demás características farmacofóricas (Figura 29), además de ser únicos para cada modelo en su espacio tridimensional (Tabla 21).

### Figura 29

*Volúmenes de exclusión*



*Nota.* Adicionados al farmacóforo creado inicialmente para los derivados de aminopirimidinas (esferas en gris) usando la aproximación basada en el receptor

**Tabla 21**

*Coordenadas tridimensionales de los volúmenes de exclusión adicionados al farmacóforo creado inicialmente para los derivados de aminopirimidinas*

<b>EXVOLs</b>	<b>Coordenadas ( X, Y, Z )</b>
EXVOL1	30.12, -6.61, 1.46
EXVOL2	28.57, -5.25, -0.08
EXVOL3	20.45, -6.63, 6.51
EXVOL4	23.90, -9.95, 1.55
EXVOL5	26.23, -20.10, 1.38
EXVOL6	10.78, -10.88, 5.80
EXVOL7	33.33, -3.08, -5.97
EXVOL8	18.79, 0.30, -10.30
EXVOL9	28.32, 1.24, -7.18
EXVOL10	24.96, -15.09, -16.98

*Nota.* Coordenadas en la aproximación basado en el receptor.

#### **9.4.2.2 Validación Teórica**

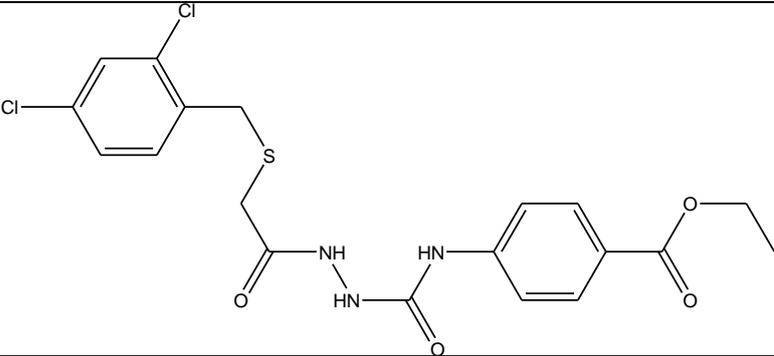
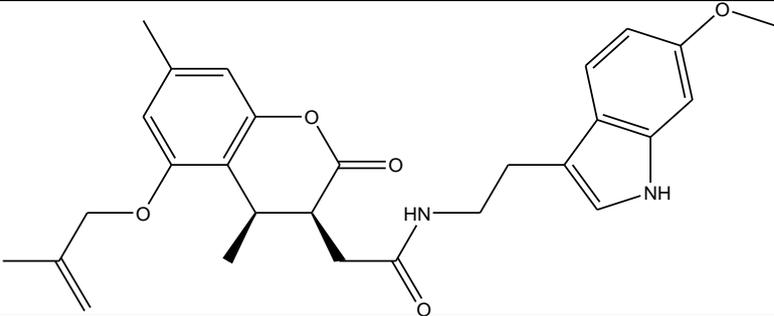
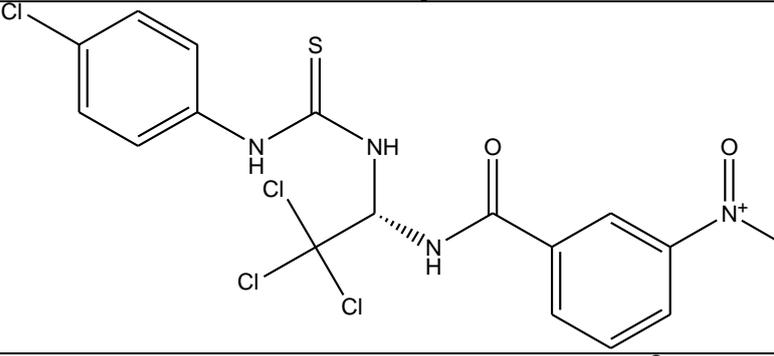
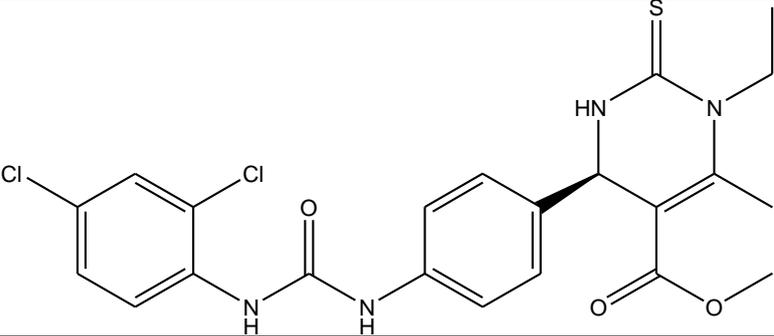
Al acabar el refinamiento del modelo se examinó su desempeño bajo condiciones controladas.

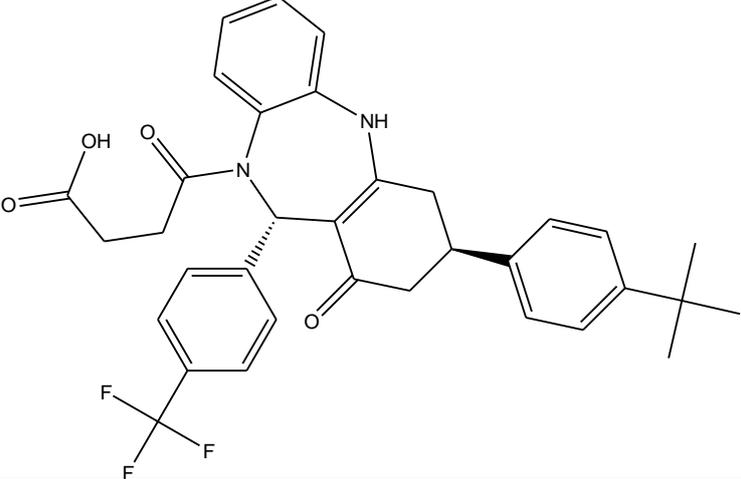
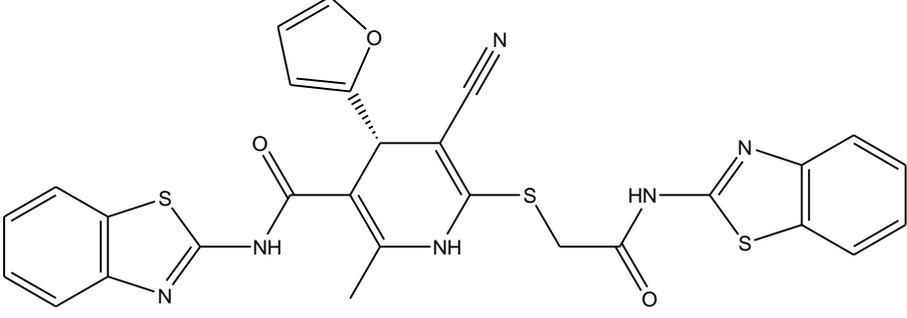
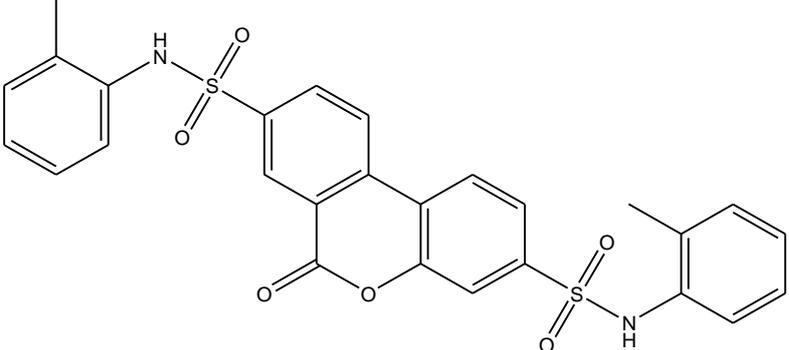
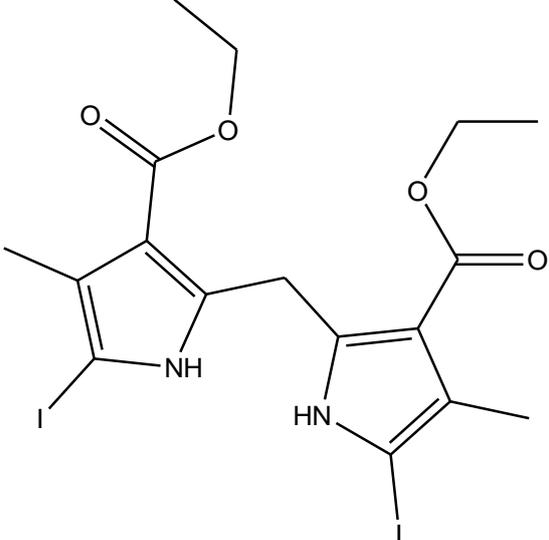
##### **9.4.2.2.1 Uso de moléculas señuelo**

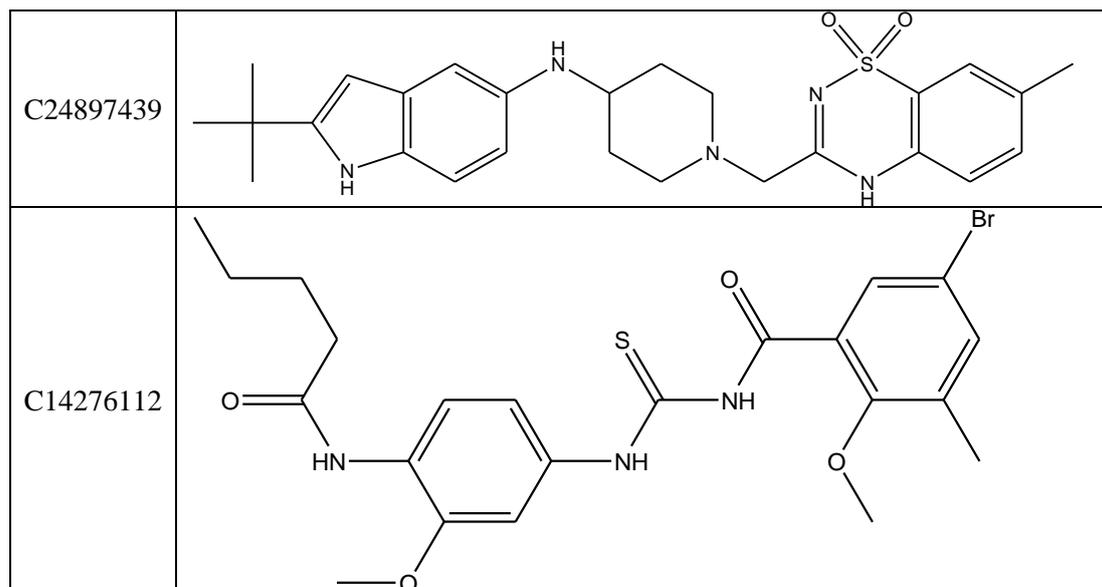
A cada molécula considerada como activa le corresponde generar 50 señuelos. Para los derivados de aminopirimidinas (17 moléculas activas) se crearon 850 señuelos virtuales (17 moléculas x 50 señuelos virtuales) provenientes de la página de DUD-E. Se muestran como ejemplo los originados a partir de la molécula 6\_3 (Tabla 22). La información completa de los señuelos utilizados puede ser encontrados en la sección de anexos como archivo SMILE. Nótese la diferencia estructural con los activos de PknG.

**Tabla 23**

Moléculas clasificadas como señuelos virtuales originadas a partir de la molécula 6\_3

C02851050	
C38573620	
C04017467	
C16610643	

C97948655	
C96934302	
C02877994	
C98228316	



*Nota.* Cincuenta en total, para el ejemplo solo se muestran 10. Se puede notar que estas no comparten similitud estructural.

#### 9.4.2.2.2 Análisis del desempeño

El farmacóforo optimizado con volúmenes de exclusión fue puesto a prueba utilizando las librerías de moléculas activas de los derivados de aminopirimidinas y la librería de moléculas señuelo (Tabla 24).

**Tabla 24**

*Librerías utilizadas para tamizaje de validación teórica del farmacóforo optimizado de los derivados de aminopirimidinas*

Librerías	Número de moléculas
Aminopirimidinas - moléculas activas	17
Señuelos virtuales - Aminopirimidinas	850

El farmacóforo optimizado de los derivados de aminopirimidinas detectó las 17 moléculas activas y 2 falsos positivos. A pesar de haber detectado 2 falsos positivos entre los señuelos virtuales, estos fueron posicionados en los últimos lugares de la lista por el Pharmacophore-Fit Score (Figura 30).

**Figura 30**

Tamizaje de validación teórica para el farmacóforo optimizado de la Serie A-C

Hits for Query »Merged [6_13, 6_9]« Hitrate: 2.19% (19 of 867)   Filter:						
	Mark	Name	#	Matching Features	Score	F
1	<input type="checkbox"/>	6_12	8		75.87	
2	<input type="checkbox"/>	6_16	13		66.42	
3	<input type="checkbox"/>	6_8	7		66.14	
4	<input type="checkbox"/>	6_4	1		65.85	
5	<input type="checkbox"/>	6_1	3		65.78	
6	<input type="checkbox"/>	6_6	2		65.76	
7	<input type="checkbox"/>	6_14	14		65.72	
8	<input type="checkbox"/>	6_13	17		65.67	
9	<input type="checkbox"/>	6_11	10		61.60	
10	<input type="checkbox"/>	6_15	15		61.34	
11	<input type="checkbox"/>	6_3	6		56.14	
12	<input type="checkbox"/>	6_10	12		56.13	
13	<input type="checkbox"/>	6_7	9		56.03	
14	<input type="checkbox"/>	6_5	5		55.66	
15	<input type="checkbox"/>	6_9	11		55.54	
16	<input type="checkbox"/>	6_2	4		55.54	
17	<input type="checkbox"/>	6_17	16		55.43	
18	<input type="checkbox"/>	C41006239P62238180	19		54.86	
19	<input type="checkbox"/>	C59170708P89793054	18		52.72	

Nota. Nótese los valores adecuados del Pharmacophore-Fit Score para las moléculas activas

Los parámetros estadísticos sobre el desempeño del modelo fueron calculados (Tabla 25 y Figura 31), destacando la sensibilidad y especificidad de 1 y 0.997 respectivamente. Además de un EF de 45.64, un GH de 0.9188 y un AUC de 1.

**Tabla 25**

Análisis de desempeño del farmacóforo optimizado para los derivados de aminopirimidinas

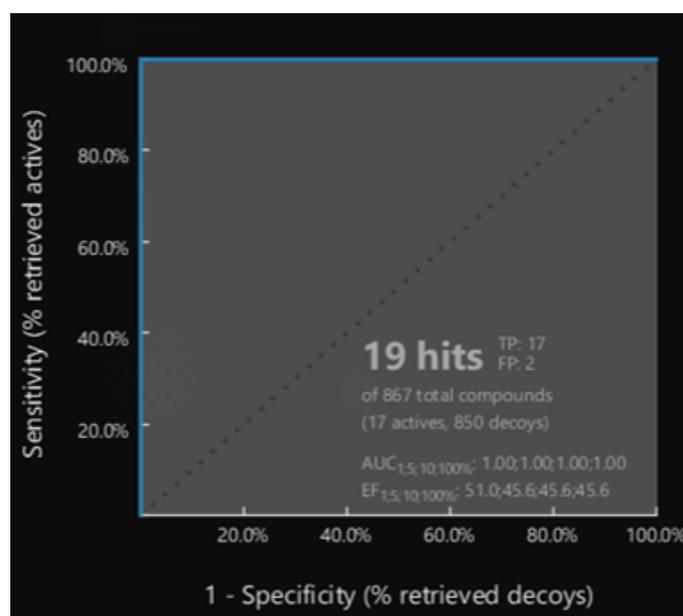
Parámetros	Aproximación basado en el receptor
N° total de moléculas en la base de datos ( <b>D</b> )	867
N° total de moléculas de activos en la base de datos ( <b>A</b> )	17
N° total de moléculas de inactivos en la base de datos ( <b>I</b> )	850
Hits totales ( <b>Ht</b> )	19
Verdaderos positivos ( <b>Tp</b> )	17
Verdaderos negativos ( <b>Tn</b> )	850
Falsos positivos ( <b>Fp</b> )	2
Falsos negativos ( <b>Fn</b> )	0
Sensibilidad ( <b>Se</b> )	1
Especificidad ( <b>Sp</b> )	0.997
% Rendimiento de activos ( <b>YA</b> x 100)	89.4%
% Ratio de activos ( <b>RA</b> x 100)	100%
Factor de enriquecimiento ( <b>EF</b> )	45.64

Günner - Henry score ( <b>GH</b> )	0.9188
AUC	1

*Nota.* Se pueden observar los descriptores como Factor de Enriquecimiento (EF), Günner - Henry Score (GH), Sensibilidad, Especificidad, entre otros.

**Figura 31**

*Curva ROC del fármacóforo optimizado de los derivados de aminopirimidinas*



*Nota.* Se aprecia que al realizar el tamizaje, este modelo obtuvo una curva ROC ideal.

## 9.5 Modelos en la aproximación basados en el ligando

### 9.5.1 Serie A-C

#### 9.5.1.1 Refinamiento

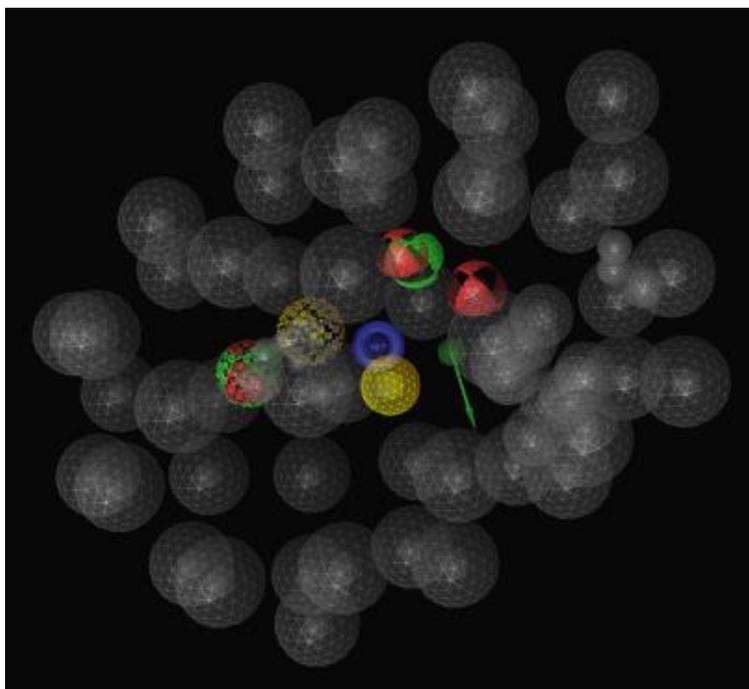
Al igual que la aproximación basada en el receptor, el refinamiento de los modelos se realizó mediante la adición de volúmenes de exclusión. Para la validación teórica de los modelos se utilizaron moléculas señuelo y moléculas experimentalmente inactivas frente a PknG de *Mtb*.

##### 9.5.1.1.1 Uso de volúmenes de exclusión

Los volúmenes de exclusión fueron adicionados utilizando la información tridimensional de las moléculas inactivas de la Serie C y de las moléculas negativas experimentales. Estos volúmenes tuvieron la función de impedir estéricamente el emparejamiento no deseado de alguna molécula inactiva con el farmacóforo creado inicialmente (farmacóforo sin refinar). Estos volúmenes de exclusión son complementarios a las demás características farmacofóricas (Figura 32), además de ser únicos para cada modelo en su espacio tridimensional (Tabla 26).

### Figura 32

*Volúmenes de exclusión*



*Nota.* Adicionados al farmacóforo creado inicialmente para la Serie A-C (esferas en gris) usando la aproximación basada en el ligando.

**Tabla 26**

*Coordenadas tridimensionales de los volúmenes de exclusión adicionados al farmacóforo creado inicialmente para la Serie A-C*

<b>EXVOLs</b>	<b>Coordenadas ( X, Y, Z )</b>
EXVOL1	-10.11, 4.33, -1.50
EXVOL2	-11.61, -1.67, 4.50
EXVOL3	-11.61, 1.33, 7.50
EXVOL4	3.39, -0.17, -7.50
EXVOL5	-5.61, 5.83, -1.50
EXVOL6	-4.11, -4.67, 9.00
EXVOL7	4.89, -7.67, 1.50
EXVOL8	-2.61, 7.33, 1.50
EXVOL9	0.39, -1.67, 9.00
EXVOL10	6.39, 1.33, 4.50

*Nota.* Coordenadas en la aproximación basado en el receptor.

### **9.5.1.2 Validación Teórica**

Finalizado el refinamiento del modelo se procedió a examinar su desempeño bajo condiciones controladas.

#### **9.5.1.2.1 Uso de moléculas señuelo**

Las moléculas señuelo empleadas fueron las mismas que se utilizaron en la aproximación basada en el receptor. Para más detalle revisar el apartado 9.4.1.2.1.

#### **9.5.1.2.2 Análisis de desempeño**

Las librerías utilizadas para este tamizaje fueron las mismas que se usaron con anterioridad en el tamizaje para el farmacóforo de la Serie A-C con aproximación basado en el receptor.

Se detectaron las 20 moléculas activas y 28 falsos positivos compuestos por 6 moléculas inactivas de la serie C ( R\_C267, S\_C267, C250, R\_C284, S\_C284, R\_C270) y 22 señuelos virtuales siendo colocados por debajo del puesto 15 en la lista de hits por su Pharmacophore-Fit Score (Figura 33).

**Figura 33**

*Tamizaje de validación teórica para el farmacóforo optimizado de la Serie A-C*

Hits for Query »Model-4« Hitrate: 4.28% (48 of 1122) Filter:				
	Mark	Name	Matching Features	Pharmacophore-Fit Score
1	<input type="checkbox"/>	A5		108.01
2	<input type="checkbox"/>	RR_A6		108.00
3	<input type="checkbox"/>	RS_A10		107.99
4	<input type="checkbox"/>	SR_A10		107.95
5	<input type="checkbox"/>	SS_A10		107.94
6	<input type="checkbox"/>	RS_A6		107.92
7	<input type="checkbox"/>	SR_A6		107.90
8	<input type="checkbox"/>	SS_A6		107.74
9	<input type="checkbox"/>	RR_A10		107.70
10	<input type="checkbox"/>	A4		107.34
11	<input type="checkbox"/>	A9		106.68
12	<input type="checkbox"/>	A8		106.06
13	<input type="checkbox"/>	A7		97.43
14	<input type="checkbox"/>	C286		77.68
15	<input type="checkbox"/>	A2		77.27
16	<input type="checkbox"/>	C37929628P56993846		77.04
17	<input type="checkbox"/>	C97629068P154741513		76.87
18	<input type="checkbox"/>	A3		76.54
19	<input type="checkbox"/>	C93198687P145911070		76.51
20	<input type="checkbox"/>	R_C267		68.29
21	<input type="checkbox"/>	S_C270		68.28
22	<input type="checkbox"/>	S_C267		68.20
23	<input type="checkbox"/>	C250		68.14
24	<input type="checkbox"/>	C266		68.12
25	<input type="checkbox"/>	C255		68.02
26	<input type="checkbox"/>	S_C284		67.91
27	<input type="checkbox"/>	A1		67.74
28	<input type="checkbox"/>	C70117461P108080948		67.41
29	<input type="checkbox"/>	C97992137P155633733		67.30
30	<input type="checkbox"/>	C83738983P130995440		67.11
31	<input type="checkbox"/>	R_C284		67.07
32	<input type="checkbox"/>	C85527967P133851350		67.05
33	<input type="checkbox"/>	C93199521P145911905		66.90
34	<input type="checkbox"/>	C93199399P145911783		66.90
35	<input type="checkbox"/>	C93199456P145911840		66.90
36	<input type="checkbox"/>	C93199587P145911971		66.89
37	<input type="checkbox"/>	C93199407P145911791		66.88
38	<input type="checkbox"/>	C93198577P145910960		66.85
39	<input type="checkbox"/>	C93199051P145911434		66.85
40	<input type="checkbox"/>	C93198476P145910859		66.83
41	<input type="checkbox"/>	C93198475P145910858		66.83
42	<input type="checkbox"/>	C93198908P145911291		66.83
43	<input type="checkbox"/>	C93198245P145910628		66.82
44	<input type="checkbox"/>	C93198946P145911329		66.82
45	<input type="checkbox"/>	C93198468P145910851		66.82
46	<input type="checkbox"/>	C93198875P145911258		66.82
47	<input type="checkbox"/>	R_C270		66.64
48	<input type="checkbox"/>	C37063635P55098447		66.38

*Nota.* Nótese los valores adecuados del Pharmacophore-Fit Score para las moléculas activas.

Los parámetros estadísticos sobre el desempeño del modelo fueron calculados (Tabla 27 y Figura 34), destacando la sensibilidad y especificidad de 1 y 0.975 respectivamente. Además de un EF de 23.40, un GH de 0.5484 y un AUC de 1.

**Tabla 27**

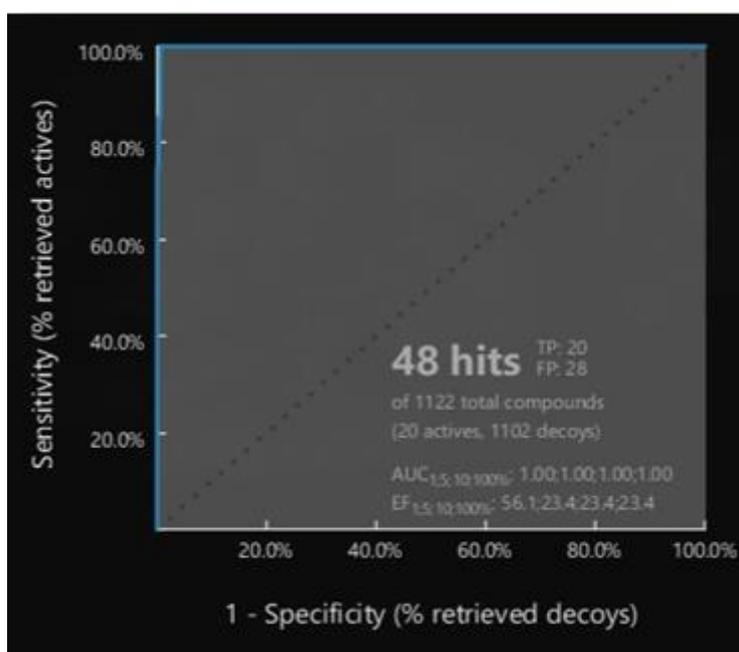
Análisis de desempeño del farmacóforo optimizado para la Serie A-C en la aproximación basada en el ligando

Parámetros	Aproximación basada en el ligando
N° total de moléculas en la base de datos ( <b>D</b> )	1122
N° total de moléculas de activos en la base de datos ( <b>A</b> )	20
N° total de moléculas de inactivos en la base de datos ( <b>I</b> )	1102
Hits totales ( <b>Ht</b> )	48
Verdaderos positivos ( <b>Tp</b> )	20
Verdaderos negativos ( <b>Tn</b> )	1102
Falsos positivos ( <b>Fp</b> )	28
Falsos negativos ( <b>Fn</b> )	0
Sensibilidad ( <b>Se</b> )	1
Especificidad ( <b>Sp</b> )	0.975
% Rendimiento de activos ( <b>YA x 100</b> )	41.6%
% Ratio de activos ( <b>RA x 100</b> )	100%
Factor de enriquecimiento ( <b>EF</b> )	23.40
Günner - Henry score ( <b>GH</b> )	0.5484
AUC	1

Nota. Se pueden observar los descriptores como Factor de Enriquecimiento (EF), Günner - Henry Score (GH), Sensibilidad, Especificidad, entre otros.

**Figura 34**

Curva ROC del farmacóforo optimizado de la Serie A-C



Nota. Se aprecia que al realizar el tamizaje, este modelo obtuvo una curva ROC ideal.

## 9.5.2 Aminopirimidinas

### 9.5.2.1 Refinamiento

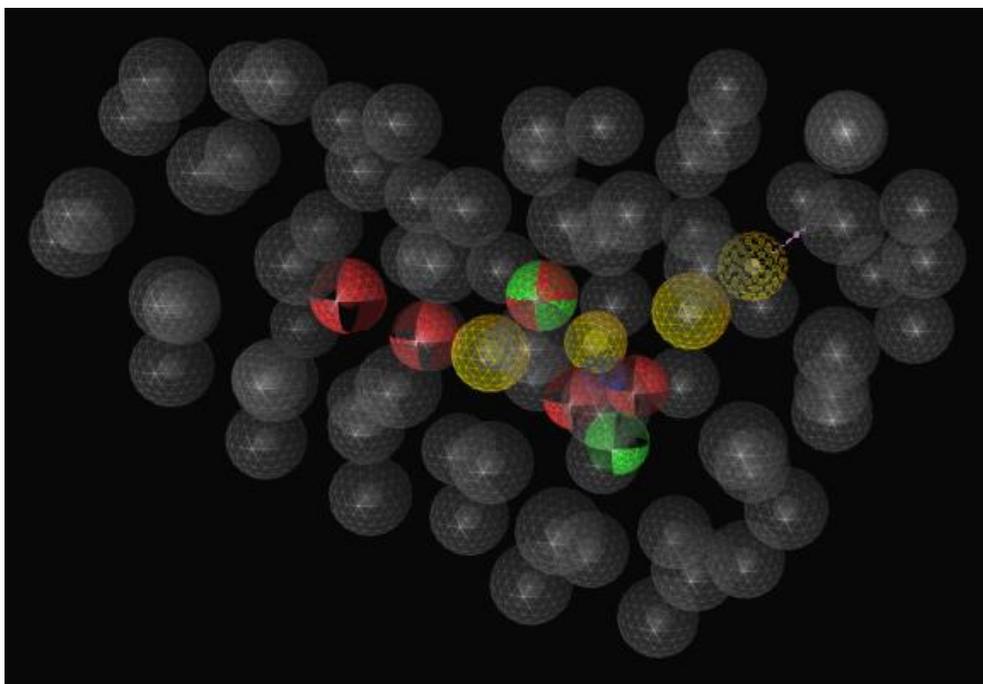
Del mismo modo que la aproximación basada en el receptor, el refinamiento de los modelos se realizó mediante la adición de volúmenes de exclusión y el cambio de tamaño de tolerancias y pesos de las características farmacofóricas. Para la validación teórica de los modelos se utilizaron moléculas señuelo.

#### 9.5.2.1.1 Uso de volúmenes de exclusión

El manto de volúmenes de exclusión fue adicionado por LigandScout al momento de la creación del modelo. Estos volúmenes tuvieron la función de impedir estéricamente el emparejamiento no deseado de alguna molécula inactiva con el farmacóforo creado inicialmente (farmacóforo sin refinar). Los volúmenes de exclusión son complementarios a las demás características farmacofóricas (Figura 35), además de ser únicos para cada modelo en su espacio tridimensional (Tabla 28).

### Figura 35

*Volúmenes de exclusión.*



*Nota.* Adicionados al farmacóforo creado inicialmente para los derivados de aminopirimidinas (esferas en gris) usando la aproximación basada en el ligando.

**Tabla 28**

*Coordenadas tridimensionales de los volúmenes de exclusión adicionados al farmacóforo creado inicialmente para los derivados de aminopirimidinas*

<b>EXVOLs</b>	<b>Coordenadas (X, Y, Z)</b>
EXVOL1	6.49, 0.35, -8.28
EXVOL2	10.99, 0.35, -6.78
EXVOL3	12.49, -2.65, -2.28
EXVOL4	7.99, -4.15, 2.22
EXVOL5	0.49, -4.15, 6.72
EXVOL6	-10.01, -2.65, 11.22
EXVOL7	-16.01, 0.35, 3.72
EXVOL8	-19.01, 0.35, -2.28
EXVOL9	-11.51, 3.35, -8.28
EXVOL10	-5.51, -2.65, -6.78
EXVOL11	3.49, 3.35, -6.78
EXVOL12	-7.01, 6.35, 0.72
EXVOL13	-5.51, -4.15, 0.72
EXVOL14	-2.51, -1.15, 8.22
EXVOL15	9.49, 0.35, 0.72

*Nota.* Coordenadas en la aproximación basado en el receptor.

### **9.5.2.2 Validación Teórica**

Concluido el refinamiento del modelo se procedió a examinar su desempeño bajo condiciones controladas.

#### **9.5.2.2.1 Uso de moléculas señuelo**

Las moléculas señuelo empleadas fueron las mismas que se utilizaron en la aproximación basada en el receptor. Para más detalle revisar el apartado 9.4.2.2.1.

#### **9.5.2.2.2 Análisis de desempeño**

Las librerías utilizadas para este tamizaje fueron las mismas que se usaron con anterioridad en el tamizaje para el farmacóforo de los derivados de aminopirimidinas con aproximación basado en el receptor. El farmacóforo fue capaz de detectar sólo a las moléculas activas dentro de la base de datos posicionando a las moléculas más activas en los primeros lugares en la lista de la lista de hits según su Pharmacophore-Fit Score (Figura 36).

**Figura 36**

Tamizaje de validación teórica para el farmacóforo optimizado de los derivados de aminopirimidinas

	Mark	Name	#	Matching Features	Score
1	<input type="checkbox"/>	6_9	7		151.42
2	<input type="checkbox"/>	6_2	2		141.15
3	<input type="checkbox"/>	6_14	11		138.02
4	<input type="checkbox"/>	6_1	1		128.47
5	<input type="checkbox"/>	6_17	16		128.14
6	<input type="checkbox"/>	6_13	15		126.67
7	<input type="checkbox"/>	6_11	12		126.58
8	<input type="checkbox"/>	6_8	6		126.50
9	<input type="checkbox"/>	6_16	17		123.05
10	<input type="checkbox"/>	6_5	10		122.97
11	<input type="checkbox"/>	6_12	13		122.91
12	<input type="checkbox"/>	6_15	14		116.55
13	<input type="checkbox"/>	6_7	4		116.49
14	<input type="checkbox"/>	6_4	5		116.48
15	<input type="checkbox"/>	6_3	3		116.43
16	<input type="checkbox"/>	6_10	9		116.30
17	<input type="checkbox"/>	6_6	8		116.27

Nota. Nótese los valores adecuados del Pharmacophore-Fit Score para las moléculas activas.

Los parámetros estadísticos sobre el desempeño del modelo fueron calculados (Tabla 29 y Figura 37), destacando la sensibilidad y especificidad de 1 en ambos. Además de un EF de 51.02, un GH de 1 y un AUC de 1.

**Tabla 29**

Análisis de desempeño del farmacóforo optimizado para la Serie A-C en la aproximación basada en el ligando

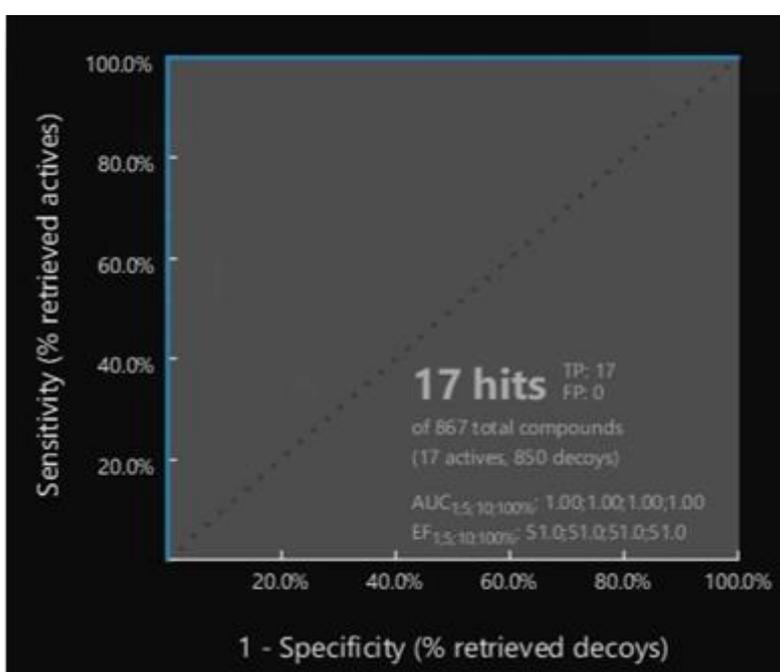
Parámetros	Aproximación basada en el ligando
N° total de moléculas en la base de datos ( <b>D</b> )	867
N° total de moléculas de activos en la base de datos ( <b>A</b> )	17
N° total de moléculas de inactivos en la base de datos ( <b>I</b> )	850
Hits totales ( <b>Ht</b> )	17
Verdaderos positivos ( <b>Tp</b> )	17
Verdaderos negativos ( <b>Tn</b> )	850
Falsos positivos ( <b>Fp</b> )	0
Falsos negativos ( <b>Fn</b> )	0
Sensibilidad ( <b>Se</b> )	1
Especificidad ( <b>Sp</b> )	1
% Rendimiento de activos ( <b>YA</b> x 100)	100%

% Ratio de activos ( <b>RA</b> x 100)	100%
Factor de enriquecimiento ( <b>EF</b> )	51.02
Günner - Henry score ( <b>GH</b> )	1
AUC	1

*Nota.* Se pueden observar los descriptores como Factor de Enriquecimiento (EF), Günner - Henry Score (GH), Sensibilidad, Especificidad, entre otros.

**Figura 37**

*Curva ROC del farmacóforo optimizado de los derivados de Aminopirimidinas*



*Nota.* Se aprecia que al realizar el tamizaje, este modelo obtuvo una curva ROC ideal.

- C. Seleccionar y evaluar in silico los potenciales nuevos inhibidores producto del uso de los modelos farmacofóricos refinados y el tamizaje masivo de bibliotecas virtuales.

## 9.6 Tamizaje masivo usando modelos basados en el receptor

Los farmacóforos de la aproximación basada en el receptor de la Serie A-C, así como de los derivados de Aminopirimidinas fueron utilizados en el tamizaje virtual masivo en las bases de datos de ChEMBL21 y de Productos naturales de la compañía IntelLigand haciendo uso del clúster virtual implementado en Amazon Web Service (AWS).

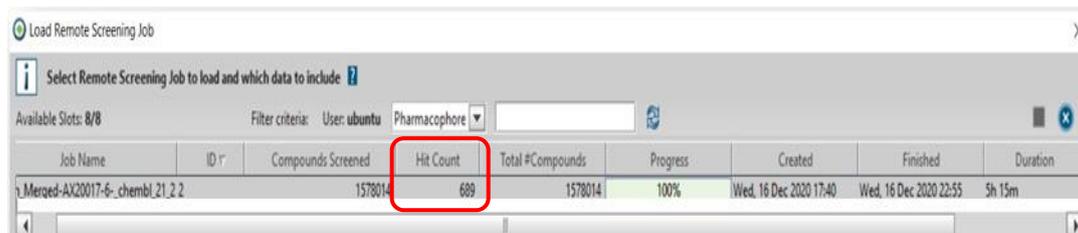
### 9.6.1 Serie A-C

#### 9.6.1.1 Tamizaje de la base de datos ChEMBL21

Se empleó el farmacóforo de la aproximación basada en el receptor de la Serie A-C en la base de datos de ChEMBL21 conformada por 1,578,014 de moléculas. El tamizaje tuvo una duración de 5 horas con 15 minutos dando como resultado la detección de 689 moléculas que se adecuaban a las características farmacofóricas de este modelo (Figura 38) este número de hits indica un porcentaje de aciertos de 0.043%.

#### Figura 38

Monitoreo del tamizaje virtual masivo de la base de datos ChEMBL21 usando el farmacóforo de la aproximación basada en el receptor de la Serie A-C



Job Name	ID	Compounds Screened	Hit Count	Total #Compounds	Progress	Created	Finished	Duration
Merzed-AX20017-6-chembl_21_2_2		1578014	689	1578014	100%	Wed, 16 Dec 2020 17:40	Wed, 16 Dec 2020 22:55	5h 15m

Nota. Producto de este tamizaje se obtuvieron 689 hits o aciertos.

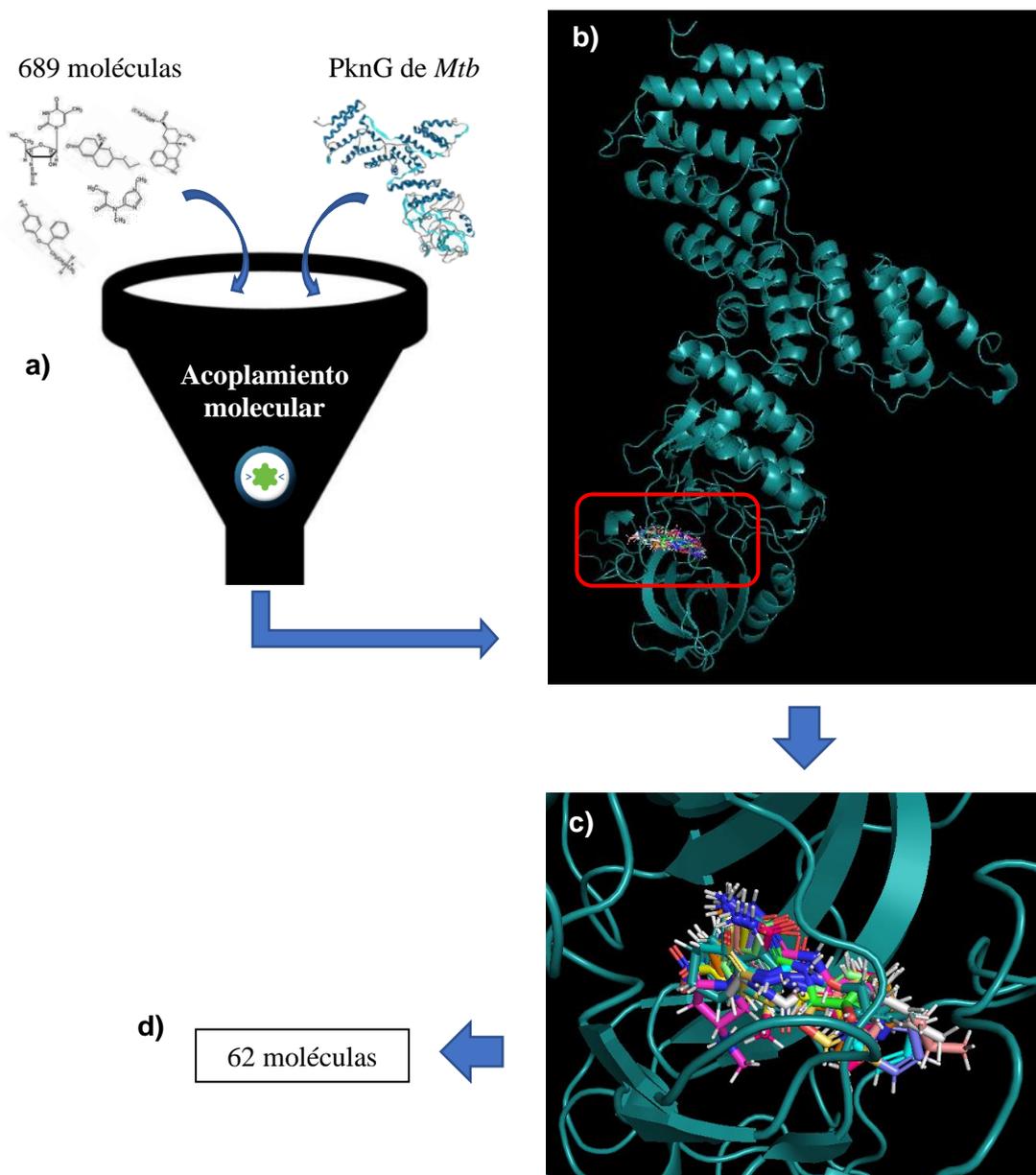
#### 9.6.1.1.1 Tamizaje masivo y moléculas seleccionadas

Las 689 moléculas, producto del tamizaje virtual con el farmacóforo en la base de datos ChEMBL21, fueron filtradas a través del acoplamiento molecular con PknG de *Mtb* en LigandScout (Figura 39a) y analizadas en todas sus conformaciones para asegurar aquellas moléculas que cumplieran tanto con la orientación espacial (Figuras 39b y 39c) así como con las

interacciones intermoleculares de importancia en el sitio activo que presenta el inhibidor control AX20017. Producto de este acoplamiento molecular y posterior análisis, el número de hits de 689 moléculas se redujo a 62 moléculas que cumplen con los requisitos correspondientes (Figura 39d).

### Figura 39

Primer filtro de los 689 hits obtenidos con el farmacóforo de aproximación basada en el receptor de la Serie A-C



Nota. a) Acoplamiento molecular; b y c) Orientación espacial dentro del sitio activo de PknG; d) Moléculas resultantes que tienen una buena orientación espacial dentro del sitio activo de PknG y realizan las interacciones moleculares importantes.

### 9.6.1.1.2 Análisis de candidatos finales

A pesar de haber reducido el número de hits estos eran un número considerablemente alto para realizar la evaluación *in vitro*, por lo tanto, las 62 moléculas resultantes del acoplamiento molecular en el sitio activo de PknG de *Mtb* fueron verificadas en la base de datos de ChEMBL para obtener información acerca de su actividad biológica sobre todo en quinasas, usos en proyectos, presencia en publicaciones y disponibilidad comercial, siendo este último criterio el de mayor importancia debido a su disponibilidad de adquisición. Este nuevo filtro permitió reducir de 62 moléculas a 27 moléculas candidatas.

Las 27 moléculas candidatas a su vez fueron sometidas a análisis que incluyeron el Pharmacophore Fit, energía de afinidad de Autodock VINA, número de características farmacofóricas (Matching features), tipos de Matching features, aporte de novedad química, correcta orientación espacial, buen acoplamiento molecular cumpliendo las interacciones de importancia dentro del sitio activo/sitio catalítico de PknG manteniendo a su vez scores apropiados y su disponibilidad comercial (Tabla 30). Dentro de estas 27 moléculas cabe destacar que 7 de ellas han sido reportadas como inhibidores de familias de quinasas.

**Tabla 30***Análisis de candidatos finales*

Moléculas	Energía VINA (kcal/mol)	Pharmacophore Fit-Score	Matching features e interacciones con aminoácidos del sitio activo/sitio catalítico de PknG				N° Total de Matching Features	Casa comercial
			Hidrófobo	H-aceptor	H-donador			
CHEMBL1571758*	-8.7	46.33	7	1 (VAL235)	2 (ASN281, ILE292)	10	Medchem	
CHEMBL1584623	-8.3	43.5	7	1 (TYR234)	1 (GLU233)	9	Mcule	
CHEMBL1530562*	-7.8	62.88	9	2 (VAL235)	1 (GLU233)	12	Santa Cruz Biotechnology	
CHEMBL1552058	-7.8	54.92	7	1 (VAL235)	2 (GLU233, VAL235)	10	ENAMINE	
CHEMBL3196042*	-7.8	43.97	10	1 (VAL235)	1 (GLU233)	12	ChemBridge Corporation	
CHEMBL1466996	-7.8	42.84	8	-	1 (GLU233)	9	Mcule	
CHEMBL3462040	-7.7	43.78	10	1 (VAL235)	1 (GLU233)	12	Mcule	
CHEMBL3237561*	-7.7	43.75	9	1 (VAL235)	2 (GLU233, VAL235)	12	Medchem	
CHEMBL1967564*	-7.7	51.48	10	1 (VAL235)	1 (GLU233)	12	Otava	
CHEMBL2152572	-7.6	43.93	8	1 (VAL235)	2 (GLU233, VAL235)	11	Mcule	
CHEMBL1309377	-7.5	43.48	8	1 (VAL235)	1 (GLU233)	10	Otava / Mcule	
CHEMBL2402488	-7.4	44.97	8	1 (VAL235)	1 (GLU233)	10	Key Organics / ABCR GmbH	
CHEMBL452800	-7.4	44.03	7	-	1 (GLU233)	8	Santa Cruz Biotechnology	
CHEMBL1402834	-7.3	43.98	8	-	1 (GLU233)	9	Mcule / ChemBridge Corporation	
CHEMBL1325582	-7.3	43.66	10	1 (VAL235)	2 (GLU233, VAL235)	13	Otava / Mcule	

CHEMBL1915540	-7	51.26	8	1 (VAL235)	1 (GLU233)	<b>10</b>	Medchem
CHEMBL3194991*	-6.9	44.23	8	2 (TYR234, VAL235)	1 (GLU233)	<b>11</b>	Mcule
CHEMBL3483331*	-6.9	42.27	8	1 (VAL235)	1 (GLU233)	<b>10</b>	Mcule
CHEMBL158113	-6.8	51.53	9	-	1 (GLU233)	<b>10</b>	ENAMINE
CHEMBL158466	-6.8	51.37	5	-	1 (GLU233)	<b>6</b>	ENAMINE
CHEMBL1610626	-6.6	44.28	7	-	2 (GLU233,283)	<b>9</b>	Otava
CHEMBL1582313	-6.5	52.27	9	-	1 (GLU233)	<b>10</b>	Otava
CHEMBL1995205	-6.4	51.92	9	2 (TYR234, VAL235)	1 (GLU233)	<b>12</b>	ENAMINE
CHEMBL1973465	-6.3	52.43	9	-	3 (GLU233, VAL235,ASN281)	<b>12</b>	Aurora Fine Chemicals
CHEMBL1723252	-5.9	45.14	8	1 (VAL235)	1 (GLU233)	<b>10</b>	ChemDiv, Inc.
CHEMBL1493170	-5.6	43.53	9	1 (VAL235)	2 (GLU233, VAL235)	<b>12</b>	Otava
CHEMBL1884808	-5.5	42.95	9	-	1 (GLU233)	<b>10</b>	ENAMINE

*Nota.* Se muestran las 27 moléculas candidatas con sus energías de afinidad proporcionadas por Autodock Vina producto del acoplamiento molecular con PknG de *Mtb*, el Pharmacophore Fit-Score de LigandScout, Matching Features en donde el color amarillo representa interacciones hidrofóbicas, color rojo aceptores de enlaces de hidrógeno y color verde donadores de enlaces de hidrógeno, conteo de Matching Features por cada tipo, conteo total de Matching Features y disponibilidad en una casa comercial. (\*) moléculas que han sido utilizadas en ensayos con quinasas. (-) carencia de interacción.

### 9.6.1.2 Tamizaje de la base de ProdNat (Inte:Ligand)

El farmacóforo de la aproximación basada en el receptor de la Serie A-C fue utilizado en la base de datos de Productos Naturales de la compañía Inte:Ligand conformada por 111,000 moléculas. Este tamizaje dio como resultado la detección de 222 moléculas que se adecuaban a las características farmacofóricas de este modelo (Figura 40) este número de hits indica un porcentaje de aciertos de 0.2%.

#### Figura 40

*Tamizaje virtual masivo de la base de datos ProdNat usando el farmacóforo de la aproximación basada en el receptor de la Serie A-C*



*Nota.* Producto de este tamizaje se obtuvieron 222 hits o aciertos.

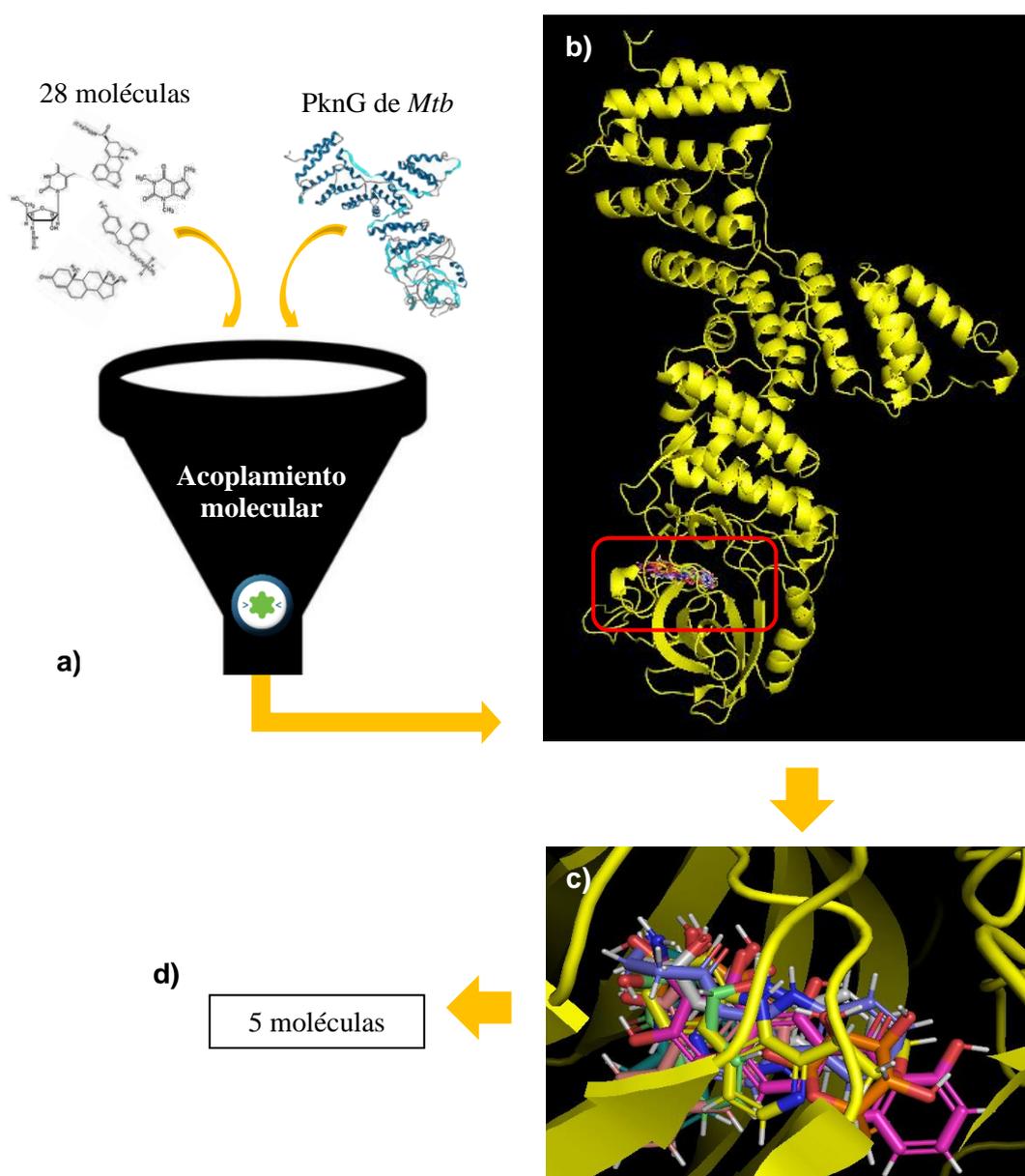
#### 9.6.1.2.1 Tamizaje masivo y moléculas seleccionadas

Las 222 moléculas obtenidas del tamizaje virtual con el farmacóforo en la base de datos Productos Naturales fueron estudiadas a través de un primer filtro de estructura el cual permitió eliminar a aquellas que no cumplían con el aporte de variedad química mínima para ser consideradas aptas

dando como resultado sólo 28 moléculas para analizar. Estas 28 moléculas fueron nuevamente filtradas (Figura 41) y resultado del acoplamiento molecular junto con el análisis de las conformaciones en el sitio activo de PknG, se logró reducir el número de 28 moléculas a 5 moléculas candidatas que cumplen con los requisitos correspondientes.

### Figura 41

*Segundo filtro de las 28 moléculas candidatas obtenidas luego de pasar el primer filtro de estructura de variedad química*



*Nota.* a) Acoplamiento molecular; b y c) Orientación espacial de las 28 moléculas candidatas dentro del sitio activo de PknG; d) Moléculas resultantes que tienen una buena orientación espacial dentro del sitio activo de PknG y realizan las interacciones moleculares importantes.

### 9.6.1.2.2 Análisis de candidatos finales

Las 5 moléculas resultantes del acoplamiento molecular en el sitio activo de PknG de *Mtb* fueron verificadas en la base de datos de ChEMBL para obtener información acerca de su actividad biológica, usos en proyectos, presencia en publicaciones y disponibilidad comercial siendo esta última información de mayor importancia. De igual manera fueron sometidas a los análisis complementarios de Pharmacophore Fit, energía de afinidad de Autodock VINA, número y tipos de Matching features, correcta orientación espacial y buen acoplamiento molecular cumpliendo las interacciones de importancia dentro del sitio activo/sitio catalítico de PknG manteniendo a su vez scores apropiados (Tabla 31).

**Tabla 31***Análisis de candidatos finales*

Molécula	Energía VINA (kcal/mol)	Pharmacophore Fit-Score	Matching features e interacciones con aminoácidos del sitio activo/sitio catalítico de PknG				N° Total de Matching Features	Casa comercial
			Hidrófobo	H-aceptor	H-donador			
Phthalimide	-6.80	43.92	6	1 (VAL235)	1 (GLU233)	8	NE	
1-(1-Hydroxyethyl)-carboline	-7.90	42.98	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	NE	
3-[2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl]-2,5-pyrrolidinedione	-6.10	43.29	6	1 (VAL235)	1 (GLU233)	8	NE	
1-(Carbolin-1-yl)-3-hydroxy-1-propanone	-7.30	44.62	7	1 (VAL235)	1 (GLU233)	9	NE	
Hymenialdisine	-7.80	55.06	3	1 (VAL235)	3 (GLU233, ILE292, ASP293)	7	NE	

*Nota.* Se presentan las 5 moléculas candidatas con sus energías de afinidad correspondientes proporcionadas por Autodock Vina producto del acoplamiento molecular con PknG de *Mtb*, el Pharmacophore Fit-Score de LigandScout, conteo de Matching Features por cada tipo (color amarillo representa interacciones hidrofóbicas, color rojo aceptores de enlaces de hidrógeno, color verde donadores de enlaces de hidrógeno) y conteo total de Matching Features. NE = No Especificada.

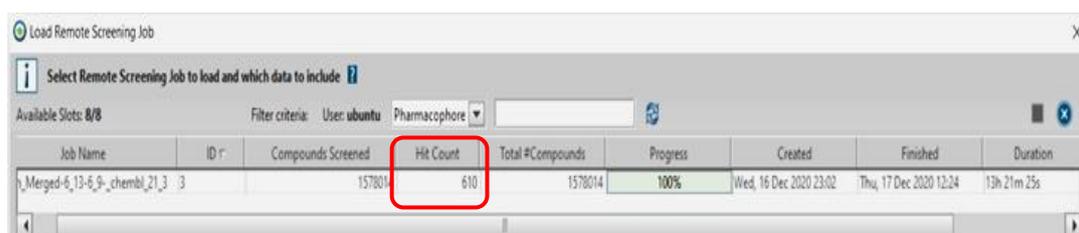
## 9.6.2 Aminopirimidinas

### 9.6.2.1 Tamizaje de la base de datos ChEMBL21

Se utilizó el farmacóforo de la aproximación basada en el receptor de los derivados de aminopirimidinas en la base de datos de ChEMBL21. El tamizaje tuvo una duración de 13 horas con 21 minutos dando como resultado la detección de 610 moléculas que se adecuaban a las características farmacofóricas del modelo farmacofórico (Figura 42), este número de hits indica un porcentaje de aciertos de 0.038%.

#### Figura 42

Monitoreo del tamizaje virtual masivo de la base de datos ChEMBL21 usando el farmacóforo de la aproximación basada en el receptor de los derivados de aminopirimidinas



Job Name	ID	Compounds Screened	Hit Count	Total #Compounds	Progress	Created	Finished	Duration
\\Merged-6_13-6_9_chembl_21_3	3	1578014	610	1578014	100%	Wed, 16 Dec 2020 23:02	Thu, 17 Dec 2020 12:24	13h 21m 25s

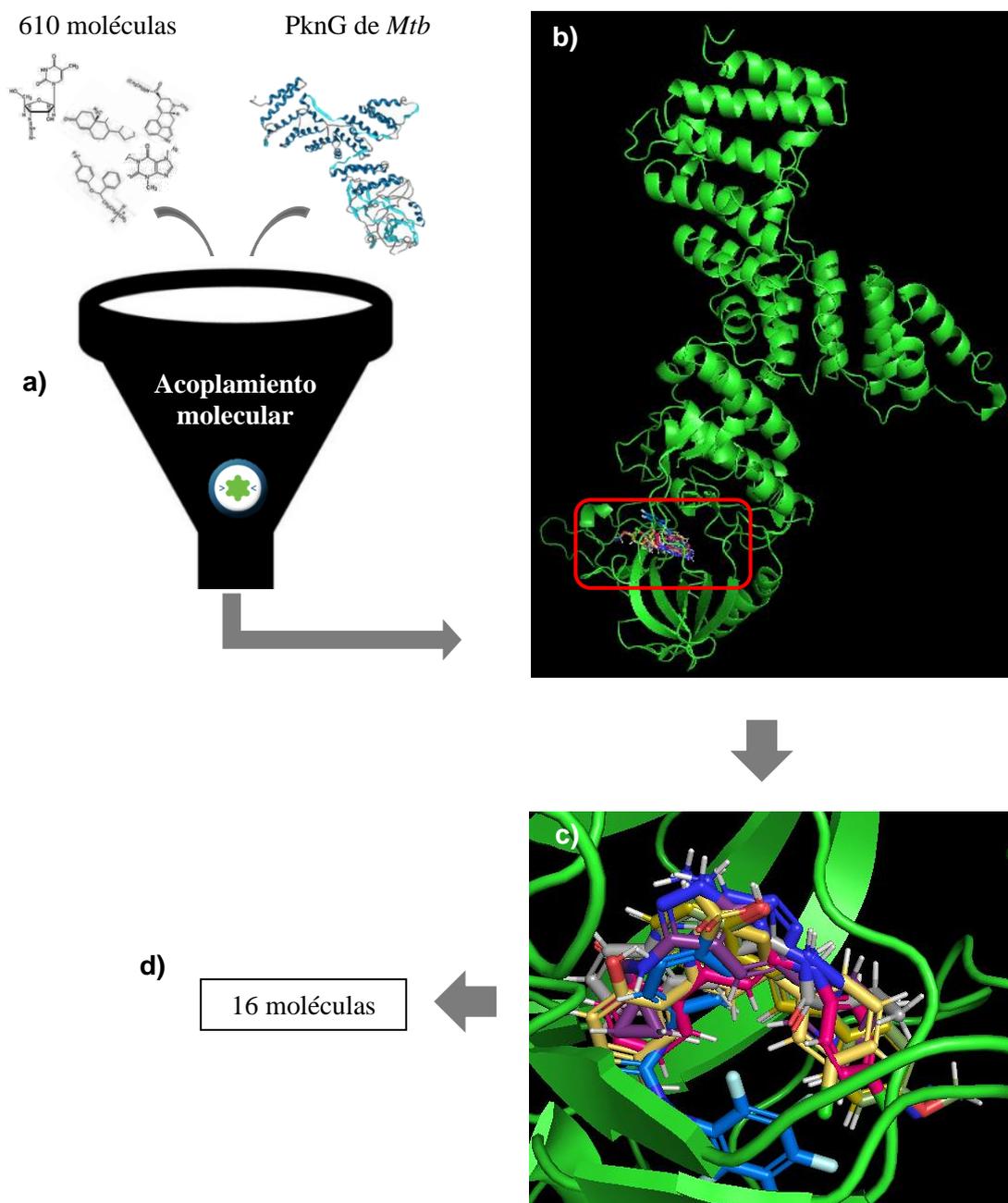
*Nota.* Producto de este tamizaje se obtuvieron 610 hits o aciertos.

#### 9.6.2.1.1 Tamizaje masivo y moléculas seleccionadas

Las 610 moléculas, producto del tamizaje virtual con el farmacóforo en la base de datos ChEMBL21, fueron filtradas a través del acoplamiento molecular con PknG de *Mtb* en LigandScout (Figura 43a) y analizadas en todas sus conformaciones para asegurar aquellas moléculas que cumplieran tanto con la orientación espacial (Figuras 43b y 43c) así como con las interacciones intermoleculares de importancia en el sitio activo. Resultado del acoplamiento molecular y posterior al análisis de las conformaciones obtenidas se logró reducir el número de 610 moléculas a 16 moléculas candidatas que cumplen con los requisitos correspondientes (Figura 43d).

## Figura 42

Filtro de los 610 hits obtenidos con el farmacóforo de aproximación basada en el receptor de los derivados de aminopirimidinas



Nota. a) Acoplamiento molecular; b y c) Orientación espacial de las 16 moléculas candidatas dentro del sitio activo de PknG; d) Moléculas resultantes que tienen una buena orientación espacial dentro del sitio activo de PknG y realizan las interacciones moleculares importantes.

### 9.6.2.1.2 Análisis de candidatos finales

Estas 16 moléculas resultantes del acoplamiento molecular en el sitio activo de PknG de *Mtb* fueron verificadas en la base de datos de ChEMBL para obtener información acerca de su actividad biológica sobre todo en quinasas, usos en proyectos, presencia en publicaciones y disponibilidad comercial. De igual manera fueron sometidas a los análisis complementarios de Pharmacophore Fit, energía de afinidad de Autodock VINA, número de características Matching features, tipos de Matching features, aporte de novedad química, correcta orientación espacial y buen acoplamiento molecular cumpliendo las interacciones de importancia dentro del sitio activo/sitio catalítico de PknG manteniendo a su vez scores apropiados (Tabla 32). Dentro de estas 16 moléculas destacan 3 de ellas que han sido reportadas como inhibidores de familias de quinasas.

**Tabla 32***Análisis de candidatos finales*

Molécula	Energía VINA (kcal/mol)	Pharmacophore Fit-Score	Matching features e interacciones con aminoácidos del sitio activo/sitio catalítico de PknG				N° Total de Matching Features	Casa Comercial
			Hidrófobo	H-aceptor	H-donador			
CHEMBL1972867	-8.8	65.5	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Aurora Chemicals	
CHEMBL362636	-8.2	61.45	5	1 (VAL235)	2 (232, GLU233)	8	Aurora Chemicals	
CHEMBL361827	-8	60.85	3	1 (VAL235)	2 (232, GLU233)	6	Aurora Chemicals	
CHEMBL1885349	-7.3	56.23	4	1 (VAL235)	1 (GLU233)	6	NE	
CHEMBL1941092	-8.3	55.69	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	NE	
CHEMBL2376939	-7.9	55.69	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Aurora Chemicals	
CHEMBL75791	-8.6	55.55	8	1 (VAL235)	1 (GLU233)	10	Aurora Chemicals	
CHEMBL307716	-9	54.21	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Aurora Chemicals	
CHEMBL424605	-8.1	54.17	8	1 (VAL235)	1 (GLU233)	10	Aurora Chemicals	
CHEMBL359492	-6.6	54.17	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Aurora Chemicals	
CHEMBL2234071	-10	54.02	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Aurora Chemicals	
CHEMBL74548	-9.2	53.94	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Aurora Chemicals	
CHEMBL3361193	-9.2	53.36	4	1 (VAL235)	1 (MET283)	6	Aurora Chemicals	
CHEMBL1667920*	-9	53.23	10	1 (VAL235)	1 (GLU233)	12	NE	
CHEMBL35785*	-8.1	53.13	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Aurora Chemicals	
CHEMBL1967564*	-7.5	52.81	9	1 (VAL235)	1 (GLU233)	11	Otava	

*Nota.* Se muestran las 16 moléculas candidatas finales con sus energías de afinidad proporcionadas por Autodock Vina producto del acoplamiento molecular con PknG de *Mtb*, el Pharmacophore Fit-Score de LigandScout, conteo de Matching Features por cada tipo (color amarillo representa interacciones hidrofóbicas,

color rojo aceptores de enlaces de hidrógeno, color verde donadores de enlaces de hidrógeno) y conteo total de Matching Features. (\*) moléculas que han sido utilizadas en ensayos con quinasas. NE = No Especificada.

## 9.7 Tamizaje masivo usando modelos basados en el ligando

Los farmacóforos de la aproximación basada en el ligando de la Serie A-C, así como de los derivados de Aminopirimidinas fueron también utilizados en el tamizaje virtual masivo en las bases de datos de ChEMBL21 haciendo uso del clúster virtual implementado en Amazon Web Service (AWS). La base de datos de Productos Naturales (Inteligand) no fue utilizada en esta aproximación debido a que no fue parte de la colaboración con la compañía Inteligand, dicha colaboración mencionada solo fue vinculada para la aproximación basada en el receptor.

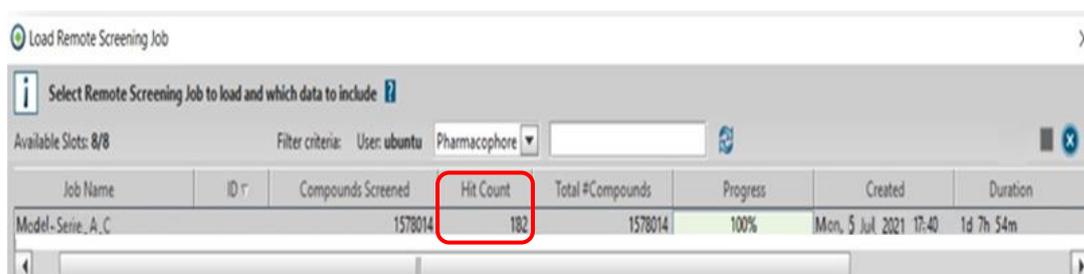
### 9.7.1 Serie A-C

#### 9.7.1.1 Tamizaje de la base de datos ChEMBL21

El farmacóforo de la aproximación basada en el ligando de la Serie A-C se utilizó en la base de datos de ChEMBL21. El tamizaje tuvo una duración de 1 día 7 horas y 54 minutos dando como resultado la detección de 182 moléculas que se adecuaban a las características farmacofóricas de este modelo (Figura 43), este número de hits indica un porcentaje de aciertos de 0.011%.

#### Figura 43

Monitoreo del tamizaje virtual masivo de la base de datos ChEMBL21 usando el farmacóforo de la aproximación basada en el ligando la Serie A-C



Job Name	ID	Compounds Screened	Hit Count	Total #Compounds	Progress	Created	Duration
Model-Serie_A_C		1578014	182	1578014	100%	Mon, 5 Jul 2021 17:40	1d 7h 54m

*Nota.* Producto de este tamizaje se obtuvieron 182 hits o aciertos.

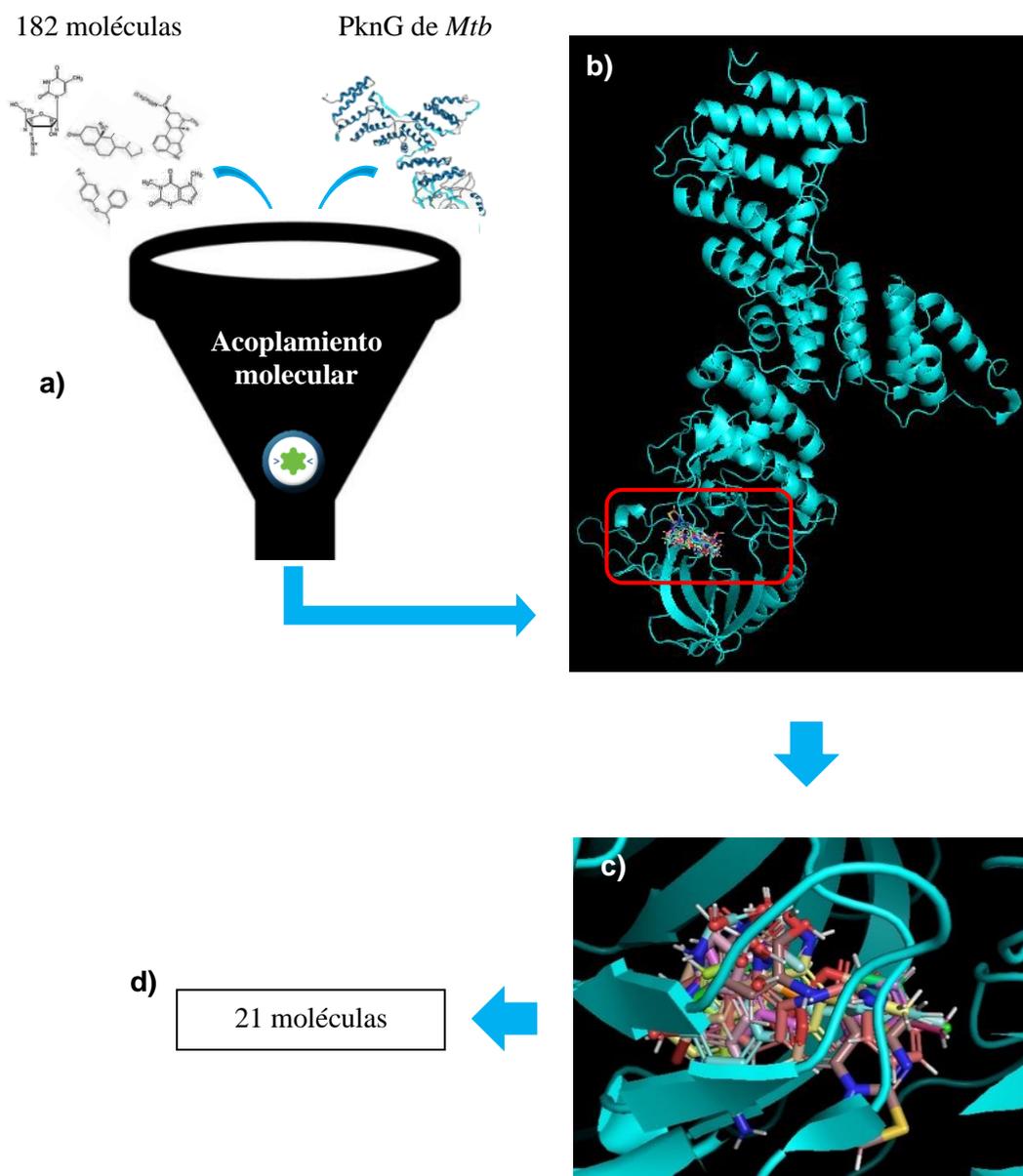
#### 9.7.1.1.1 Tamizaje masivo y moléculas seleccionadas

Las 182 moléculas, producto del tamizaje virtual con el farmacóforo en la base de datos ChEMBL21, fueron filtradas mediante el acoplamiento molecular de PknG en *Mtb* en LigandScout (Figura 44a) y analizadas en todas sus conformaciones asegurando las moléculas que cumplieran tanto la orientación espacial (Figuras 44b y 44c) ) así como con las interacciones

intermoleculares de importancia en el sitio activo. Resultado del acoplamiento molecular y del análisis de las conformaciones obtenidas se redujo el número de 182 moléculas a 21 moléculas candidatas que cumplen con los requisitos correspondientes (Figura 44d).

#### Figura 44

Filtro de los 182 hits obtenidos con el farmacóforo de aproximación basada en el ligando de la Serie A-C



*Nota.* a) Acoplamiento molecular; b y c) Orientación espacial de las 182 moléculas candidatas dentro del sitio activo de PknG; d) Moléculas resultantes que tienen una buena orientación espacial dentro del sitio activo de PknG y realizan las interacciones moleculares importantes.

### 9.7.1.1.2 Análisis de candidatos finales

Las 21 moléculas resultantes del acoplamiento molecular en el sitio activo de PknG de *Mtb* fueron verificadas en la base de datos de ChEMBL para obtener información acerca de su actividad biológica, usos en proyectos, presencia en publicaciones y disponibilidad comercial. Este nuevo filtro permitió reducir de 21 moléculas a 7 moléculas candidatas.

Las 7 moléculas candidatas a su vez fueron sometidas a análisis que incluyeron el Pharmacophore Fit, energía de afinidad de Autodock VINA, número de Matching features, tipos de Matching features, aporte de novedad química, correcta orientación espacial y buen acoplamiento molecular cumpliendo las interacciones de importancia dentro del sitio activo/sitio catalítico de PknG manteniendo a su vez scores apropiados (Tabla 33). Dentro de estas 7 moléculas cabe destacar que 1 de ellas ha sido reportada como inhibidor de familias de quinasas.

**Tabla 33***Análisis de candidatos finales*

Molécula	Energía VINA (kcal/mol)	Pharmacophore Fit-Score	Matching features e interacciones con aminoácidos del sitio activo/sitio catalítico de PknG				N° Total de Matching Features	Casa comercial
			Hidrófobo	H-aceptor	H-donador			
CHEMBL1422302	-7.50	86.11	6	1 (VAL235)	1 (GLU233)	8	Vitas-M	
CHEMBL1333331	-7.00	66.49	3	1 (VAL235)	1 (GLU233)	5	Chemspace	
CHEMBL1540685*	-5.90	76.82	8	1 (VAL235)	2 (VAL235, GLU233 )	11	Chemspace	
CHEMBL1362767	-7.20	76.73	9	2 (VAL235, TYR234)	1 (GLU233)	12	Molport	
CHEMBL3443281	-8.60	66.87	5	1 (VAL235)	2 (VAL235, GLU233 )	8	Chemspace	
CHEMBL3443280	-8.80	66.87	5	2 (VAL235, TYR234)	1 (GLU233)	8	Chemspace	
CHEMBL3732665	-6.20	65.34	8	1 (VAL235)	2 (VAL235, GLU233 )	11	Molport	

*Nota.* Se presentan las 7 moléculas candidatas resultantes con sus energías de afinidad proporcionadas por Autodock Vina producto del acoplamiento molecular con PknG de *Mtb*, el Pharmacophore Fit-Score de LigandScout, conteo de Matching Features por cada tipo (color amarillo representa interacciones hidrofóbicas, color rojo aceptores de enlaces de hidrógeno, color verde donadores de enlaces de hidrógeno) y conteo total de Matching Features. (\*) molécula que ha sido utilizada en ensayos con quinasas.

## 9.7.2 Aminopirimidinas

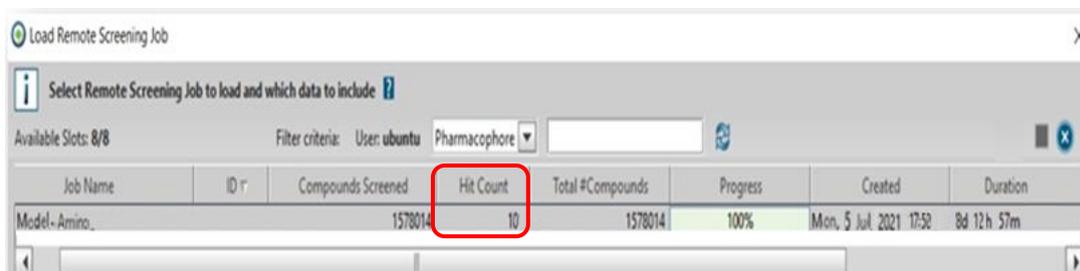
### 9.7.2.1 Tamizaje de la base de datos ChEMBL21

Se utilizó el farmacóforo de la aproximación basada en el ligando de los derivados de aminopirimidinas en la base de datos de ChEMBL21. El tamizaje tuvo una duración de 8 días 12 horas y 57 minutos dando como resultado la detección de 10 moléculas que se adecuaban a las características farmacofóricas del modelo farmacofórico (Figura 45), este número de hits representa un porcentaje de aciertos de 0.000631%.

Estos 10 hits fueron las mismas moléculas activas que se utilizaron en la creación del modelo en la aproximación basada en el ligando razón por la cual no se procedió a realizar los estudios de acoplamiento molecular en PknG de *Mtb* debido a que ninguna molécula fue considerada como candidata o novedosa.

#### Figura 45

*Monitoreo del tamizaje virtual masivo de la base de datos ChEMBL21 usando el farmacóforo de la aproximación basada en el ligando de los derivados de aminopirimidinas*



Job Name	ID	Compounds Screened	Hit Count	Total #Compounds	Progress	Created	Duration
Model-Amino		1578014	10	1578014	100%	Mon, 5 Jul 2021 17:50	8d 12h 57m

*Nota.* Producto de este tamizaje se obtuvieron 10 hits o aciertos.

## X. DISCUSIONES

El presente trabajo diseñó, optimizó, validó y evaluó *in silico* cuatro modelos farmacofóricos para los compuestos de la Serie A y C y aminopirimidinas. Los modelos fueron usados posteriormente en conjunto con el clúster virtual en AWS para realizar tamizajes virtuales usando las bases de datos ChEMBL21 de 1,578,014 moléculas y ProdNat de 111,000 moléculas. Los tamizajes arrojaron 689 hits en ChEMBL21 y 222 hits en ProdNat. Estos luego de ser analizados mediante cálculos de acoplamiento molecular, análisis de energía de unión, puntaje de Pharmacophore Fit-score, interacciones de importancia dentro del sitio activo y disponibilidad comercial fueron reducidos a 32 candidatos, 27 candidatos pertenecientes a ChEMBL21 y 5 candidatos a ProdNat.

El genoma de *Mtb* codifica 11 serina/treonina proteínas quinasa: PknA, PknB, PknD, PknE, PknF, PknG, PknH, PknI, PknJ, PknK, y PknL (Székely, *et al.* 2008). De estas 11 quinastas, PknG cumple el rol de actuar en la supervivencia de la micobacteria (Khan, *et al.* 2017) así como también en la prevención de la fusión del fagosoma con el lisosoma evitando de esta manera la degradación, permitiéndole vivir dentro de los macrófagos hasta que se den las condiciones adecuadas en el organismo del hospedero para volver a proliferar causando nuevamente la enfermedad (Hegymegi-Barakonyi, *et al.* 2008, Kanehiro, *et al.* 2018). Inclusive al momento que PknG fosforila a su sustrato GarA, inhibe la  $\alpha$ -cetoglutarato descarboxilasa (KGD) y la glutamato deshidrogenasa (GDH) mientras que a su vez activa la glutamato sintasa ajustando el ciclo del ácido tricarboxílico y el metabolismo del glutamato manteniendo la homeostasis redox celular, favoreciendo de esta forma considerablemente a la supervivencia de *Mtb* en condiciones de latencia (Khan, *et al.* 2017). El rol crucial que PknG tiene en el *Mtb* queda demostrado en los hallazgos de Walburger, *et al.* 2004 y Khan, *et al.* 2018. En el ensayo *in vitro* de Walburger, *et al.* 2004, los resultados les permitieron a los autores llegar a la conclusión que la inhibición de esta proteína quinasa conduce a la degradación de la micobacteria a través de la vía de degradación lisosomal dentro de los macrófagos. Khan, *et al.* 2021, utilizaron una cepa mutante de *Mtb* con delección de PknG que fue testada a la par con AX20017 en ensayos *in vitro* con macrófagos, demostrando que tanto la inhibición o la delección de PknG en *Mtb* influye en la supervivencia de la micobacteria en situaciones de estrés y acidificación emulando un estado de latencia. También en su ensayo *in vivo* utilizando al inhibidor AX20017 de PknG en conjunto con la adición de fármacos antituberculosos contra la latencia (Isoniazida, Rifapentina y Rifampicina) para las cepas MDR-TB, demuestran la disminución de la supervivencia de *Mtb*, así como la escasa reactivación de una TB latente. Es debido a esta relevancia de PknG que en los últimos años diferentes grupos de investigación en el mundo están enfocados en la búsqueda de potenciales inhibidores (Koul, *et al.* 2001, Scherr, 2008, Lisa, *et al.* 2015, Caballero, *et al.* 2018, Kan, *et al.* 2018) que permita eliminar al *Mycobacterium tuberculosis* en estado de latencia.

Para la validación de los protocolos de acoplamiento molecular empleados en el trabajo fue necesario utilizar tanto Autodock Vina implementado en LigandScout como Autodock Vina

ejecutado desde su archivo binario en el CMD de Windows. Las validaciones generaron RMSDs por debajo de 1Å coincidiendo con lo reportado anteriormente en otros estudios de acoplamiento molecular utilizando Autodock Vina (Maldonado-Rojas, *et al.* 2021, Olivero-Acosta, *et al.* 2017). Sin embargo, al momento de reconstruir el cristal 2PZI para el compuesto AX20017, el RMSD obtenido de la ejecución de Autodock Vina local fue de 0.71Å frente al 0.92 Å del implementado en LigandScout. Indicando que la versión de uso local logró reconstruir el cristal en mejor forma. Esto podría deberse a la libertad que el usuario tiene para establecer parámetros de búsqueda. Libertad que en la versión implementada en LigandScout es parcial.

En la serie A y C, los desempeños de los farmacóforos optimizados basado en el receptor y basado en el ligando fueron medidos haciendo uso de los parámetros de validación teórica, mismos parámetros utilizados previamente en estudios de validación de modelos farmacofóricos (Lu, *et al.* 2011, Kratz, *et al.* 2014). El modelo basado en el receptor demostró ser superior al modelo basado en el ligando por su EF (43.21 versus 23.37), GH ( 0.8218 versus 0.5484) y Especificidad ( 0.994 versus 0.975). A pesar de esta diferencia en cuanto a sus desempeños iniciales, los modelos en ambas aproximaciones al ser utilizados en el tamizaje virtual masivo con la base de datos ChEMBL21 obtuvieron una tasa de aciertos de 0.043% y 0.011% respectivamente manteniéndose muy por debajo del 1% máximo permitido para ser considerado como un modelo farmacofórico de buena calidad según Vuorinen y Schuster, 2015.

Una vez terminado el tamizaje virtual masivo usando las bases de datos ChEMBL21 y ProdNat, los hits obtenidos fueron nuevamente filtrados mediante acoplamiento molecular con el fin de verificar su modo de unión con PknG. Con esto se analizó las moléculas propuestas cumplen las interacciones intermoleculares necesarias para inhibir a PknG; es decir, si imitaban las interacciones realizadas por el compuesto de referencia AX20017 dentro del sitio activo mencionadas por Scherr, *et al.* 2007 y Caballero, *et al.* 2018. Como era de esperarse, tanto en la aproximación basado en el receptor como en el ligando hubo moléculas que a pesar de ser hits del tamizaje no lograron recrear en forma específica las interacciones necesarias para una buena inhibición. Algunos de esto último son las moléculas CHEMBL1604166, CHEMBL220528, CHEMBL1681976, CHEMBL1681965 entre otros. Esto último se debe a que ambas técnicas tienen distinta aproximación, por una parte, el tamizaje por farmacóforo es muy rápido debido a que no toma en cuenta toda la información estructural del receptor, mientras que en un tamizaje por acoplamiento es mucho más lento debido a toda la información del receptor es usada. Se entiende que el uso combinado de ambas técnicas es lo adecuado.

En cuanto a la búsqueda de inhibidores para PknG mediante el uso de herramientas computacionales, hasta la fecha han sido reportados tres estudios. El primer trabajo realizado por Santhi & Aishwarya, 2011 utilizando un acoplamiento molecular sencillo de 40 withanolidos en el sitio activo de PknG del cristal 2PZI propone 3 moléculas candidatas para la inhibición de PknG basando sus resultados finales en el score de acoplamiento, sin embargo, los autores no validaron de manera teórica su

protocolo de acoplamiento molecular como se hizo en este estudio para poder reconstruir el cristal y asegurar la correcta orientación espacial de los ligandos e interacciones intermoleculares dentro del sitio activo. El segundo trabajo en donde también se hizo uso del acoplamiento molecular para acoplar 477 flavononas obtenidas de la base de datos de PubChem al sitio activo de PknG fue complementado con análisis de predicción farmacocinética, análisis de re-acoplamiento molecular y dinámicas moleculares. Utilizando esta aproximación computacional los autores propusieron 6 moléculas candidatas como posibles inhibidores de PknG de *Mtb*. (Swain, *et al.* 2021). Pese a que el protocolo de validación de acoplamiento molecular y análisis consecuentes fueron rigurosos, el uso de flavononas para la búsqueda de inhibidores se debe de tratar con mucho cuidado debido a la posibilidad de que varias de ellas sean compuestos de interferencia de pan-ensayos (PAINS), para evitar este tipo de riesgos, en este estudio se trabajó con una base de datos curada a mano conteniendo mucha variedad química y ningún PAIN presente. Y por último, en el trabajo de Singh, *et al.* 2015 se utilizó un modelo farmacofórico para encontrar inhibidores de PknG utilizando solo la aproximación basada en el ligando, su modelo luego fue utilizado en una base de datos de 54,275 moléculas para el tamizaje virtual masivo obteniendo 826 hits equivalente al 1.52% en su tasa de aciertos proponiendo finalmente 1 candidato que no pudo igualar en eficacia al compuesto de referencia AX20017. A pesar de tener una aproximación parecida al utilizar un farmacóforo, en este estudio se emplearon cuatro modelos farmacofóricos, 2 para la aproximación basada en el receptor y 2 para la aproximación basada en el ligando los cuales luego de estar debidamente optimizados se utilizaron en 2 bases de datos de mayor amplitud de moléculas para el tamizaje virtual masivo conformadas por 1,578,014 moléculas (ChEMBL21) 111,000 moléculas (ProdNat) obteniendo una tasa de aciertos de 0.043% y 0.011% respectivamente.

En cuanto a la metodología computacional se puede afirmar con total certeza que las aproximaciones basadas en el receptor y basadas en el ligando usadas en el desarrollo de esta tesis, ambas implementadas en el programa LigandScout 4.4.3, fueron aplicadas de forma satisfactoria para la búsqueda de potenciales inhibidores de PknG de *Mtb*. Mención especial es la implementación del clúster virtual “Drug Hunter” único en su tipo en el Perú (de momento). Este clúster virtual permitió el tamizaje de millones de moléculas en horas o en el peor de los casos días. Sin esta valiosa implementación no se hubieran podido llevar a cabo los tamizajes.

Dentro de las limitaciones de este trabajo, destaca la cantidad de información sobre  $IC_{50}$  de la serie A-C frente a PknG. La poca información publicada respecto a  $IC_{50}$  de los diferentes compuestos ensayados frente a PknG fue una constante durante el desarrollo de los modelos. Muchos de estos no están disponibles al público a pesar de ser mencionados en las respectivas patentes de la familia A-C (Fancelli, *et al.* 2002, Bascher, *et al.* 2003, Pató, *et al.* 2004, Missio, *et al.* 2009, Pató, *et al.* 2009). Los modelos farmacofóricos necesitan de este tipo de datos para poder optimizar su desempeño. Impactando por lo tanto en forma directa a su refinamiento y obtención de modelo final. No obstante, este punto fue reforzado con la excelente búsqueda bibliográfica realizada y el

contacto a algunas compañías proveedoras de moléculas que desinteresadamente brindaron datos de IC50 y estructuras de compuestos. Otra limitación fue contar con un solo cristal de PknG de *Mtb* (Scherr, *et al.* 2007) para realizar la aproximación basado en la estructura. Es siempre recomendable contar con dos o tres cristales con distintos inhibidores. Sin embargo, esto último no impactó negativamente en el proyecto gracias a la buena resolución del mismo.

Dentro de las fortalezas del trabajo, destaca la cantidad de moléculas usadas en los tamizajes virtuales. Fueron usadas las bases de datos ChEMBL21 con 1,578,014 moléculas y ProdNat con 111,000 moléculas, estas sumadas dan la cifra nada despreciable de 1689014 moléculas, lo cual no es común de encontrar en trabajos académicos donde muchas veces solo se llega a menos de un millón. Igualmente destaca el haber abordado tanto aproximaciones basadas en el ligando como en el receptor, de esta forma se pretendía cubrir la mayor cantidad de espacio químico posible. Igual de importante es mencionar toda la implementación realizada para el desarrollo de este trabajo, implementación que queda totalmente disponible al estudio de diversas enfermedades. Aunque no es parte de esta tesis, se debe mencionar que una de las mayores fortalezas es la validación experimental a la que estarán sujetas las distintas moléculas propuestas como potenciales inhibidores de PknG. Estas serán evaluadas como parte de un proyecto que busca inhibidores de PknG con apoyo del Gobierno del Perú.

Finalmente, la Tuberculosis actualmente es una de las causas principales de mortalidad a nivel mundial la cual va en constante aumento debido a la aparición de cepas MDR-TB y XDR-TB representando así una amenaza para la seguridad sanitaria global, por ello existe la creciente necesidad de buscar nuevos fármacos que tengan como targets proteínas esenciales de *Mtb*. El resultado de este trabajo de tesis propone moléculas candidatas como potenciales inhibidores de PknG, las cuales han sido obtenidas luego de utilizar los modelos farmacofóricos en grandes bases de datos y haber sido analizadas rigurosamente mediante filtros y parámetros computacionales. Por lo tanto, este trabajo ha validado la hipótesis inicial de investigación que propuso: “Los modelos farmacofóricos 3D y el tamizaje virtual masivo de moléculas permiten en forma rápida y eficiente la búsqueda de potenciales nuevos inhibidores de PknG de *Mycobacterium tuberculosis*.”

## XI. CONCLUSIONES

Producto del desarrollo de este trabajo de tesis y basado en los resultados experimentales obtenidos, las siguientes conclusiones pueden ser establecidas:

- 1) Se diseñó, optimizó, validó y evaluó *in silico* cuatro modelos farmacofóricos para los compuestos de la Serie A y C y derivados de aminopirimidinas. Dos modelos pertenecen a la aproximación basada en el receptor y dos a la aproximación basada en el ligando.
- 2) Según la bibliografía especializada, todos los modelos farmacofóricos obtenidos presentaron “muy buenos” o “excelentes” valores de Sensibilidad, Especificidad, AUC ROC, Factor de enriquecimiento y Günner-Henry score.
- 3) Se propusieron 32 potenciales inhibidores de PknG provenientes de las bases de datos ChEMBL21 y ProdNat. Estos cumplen criterios de interacciones indispensables en el sitio activo, correcta disposición espacial, alto puntaje de Pharmacophore-fit y una alta energía de unión.
- 4) El uso de ordenadores de alto rendimiento (HPC) son indispensables para llevar a cabo tamizajes de millones de compuestos. En la presente tesis, el uso de un “clúster” virtual en AWS fue vital para la obtención de resultados.
- 5) Los modelos farmacofóricos 3D y el tamizaje virtual masivo de moléculas permitieron en forma rápida y eficiente la búsqueda de potenciales nuevos inhibidores de PknG de *Mycobacterium tuberculosis*.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alarcón, V., Alarcón, E., Figueroa, C. y Mendoza, A. (2017). Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, Avances y Desafíos para su control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 34(2): 299-310. doi: 10.17843/rpmesp.2017.342.2384
2. Álvarez, N., Borrero, R., Reyes, F., Camacho, F., Mohd, N., Sarmiento, M., y Acosta, A. (2009). Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *VacciMonitor* Vol. 18 No. 3: 18 – 25
3. Amazon Web Service. <https://aws.amazon.com/es/>
4. Anand, N., Singh, P., Sharma, A., Tiwari, S., Singh, V., Singh, D., Srivastava, K., Singh, B., y Tripathi, R. (2012). Synthesis and evaluation of small libraries of triazolymethoxy chalcones, flavonones and 2-aminopurimidines as inhibitors of mycobacterial FAS-II and PknG. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. doi: /10.1016/j.bmc.2012.07.009
5. Bacher, G., Koul, A., y Choidas, A. (2003). 4,5,6,7 - Tetrahydrobenzo[b]thiophene derivaties and methods for medical intervention agains mycobacterial infections. World Intellectual Property Organization (WO03/084947A1). Axxima pharmaceuticals AG. <http://goliat.eik.bme.hu/~banhegyi/WO03084947A1.pdf>
6. Barba, R. (2020). Tuberculosis ¿Es la pandemia ignorada? *Rev Mex Patol Clin Med Lab* 67 (2): 93 - 112. doi: 10.35366/95554
7. Braga, R., y Andrade, C. (2013). Assessing the Performance of 3D Pharmacophore Models in Virtual Screening: ¿How Good are They? *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13, 000-000. doi: 10.2174/1568026611313090010
8. Caballero, J., Morales, A., y Navarro, C. (2018) *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases: Structural information for the design of their specific ATP-competitive inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 32:1315–1336. doi:10.1007/s10822-018-0173-3
9. Cegielski, J. (2018). Tuberculosis multidrogo resistente en la era final de la tuberculosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 35(1):110-7. doi: 10.17843/rpmesp.2018.351.3618
10. Chakraborti, P., Matange, N., Nandicoori, V., Singh, Y., Tyagi, J., y Visweswariah, S. (2011). Signalling mechanisms in Mycobacteria. *Tuberculosis*, 91(5), 432-440. doi:

10.1016/j.tube.2011.04.005

11. Chen, G., Chang, C., Kan, W., Chang, C., Wang, K., y Chern, J. (2001). Novel Lead Generation through Hypothetical Pharmacophore Three-Dimensional Database Searching: Discovery of Isoflavonoids as Nonsteroidal Inhibitors of Rat 5 $\alpha$ -Reductase. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 44, No. 230. doi: 10.1021/jm010433s
12. Chen, Z., Li, H., Zhang, Q., Bao, X., Yu, K., Luo, X., Zhu, W., y Jiang, H. (2009). Pharmacophore-based virtual screening versus docking-based virtual screening: a benchmark comparison against eight targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 30: 1694–1708. doi: 10.1038/aps.2009.159
13. Davies, M., Nowotka, M., Papadatos, G., Dedman, N., Gaulton, A., Atkinson, F., Bellis, L., y Overington, J. (2015). ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Research*, 2015, Vol. 43, Web Server issue. doi: 10.1093/nar/gkv352
14. Entzeroth, M., Flotow, H., y Condrón, P. (2009). Overview of High-Throughput screening. In: *Current Protocols in Pharmacology*, pp. 9. 4. 1-27. doi: 10.1002/0471141755.ph0904s44
15. Fancelli, D., Pevarello, P., y Varasi, M. (2002). Thiophene compounds, process for preparing the same, and pharmaceutical compositions containing the same background of the invention (United States Patent No.: US 6,414,013 B1). *Pharmacia & Upjohn S.p.A.* <https://patents.google.com/patent/US6414013B1/en>
16. Hegymegi-Barakonyi, B., Székely, R., Varga, Z., Kiss, R., Borbély G., Németh, G., Bánhegyi, P., Pató, J., Greff, Z., Horváth, Z., Mészáros, G., Marosfalvi, J., Erós, D., Szántai-Kis, C., Breza, N., Garavaglia, S., Perozzi, S., Rizzi, M., Hafenbradl, D., Ko, M., Av-Gay, Y., Klebl, B., Órfi, L., y Kéri, G. (2008). Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* - Early days of a new therapeutic concept in tuberculosis. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 2760 - 2770. doi: 10.2174/092986708786242886
17. Inteligand. LigandScout versión 4.4. Vienna, Austria; 2019
18. Jiang, Y., y Gao, H. (2018). Pharmacophore-based drug design for the identification of novel butyrylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Phytomedicine*. doi: 10.1016/j.phymed.2018.09.199

19. Kainrad, T., Hunold, S., Seidel, T., y Langer, T. (2018). LigandScout Remote: A new User-Friendly Interface for HPC and Cloud Resources. *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00716
20. Kanehiro, Y., Tomioka, H., Pieters, J., Tatano, Y., Kim, H., Lizasa, H., y Yoshiyama, H. (2018). Identification of Novel Mycobacterial Inhibitors Against Mycobacterial Protein Kinase G. *G. Front. Microbiol.* 9:1517. doi: 10.3389/fmicb.2018.01517
21. Kapetanovic, I. (2011). *Drug Discovery and Development – Present and Future*. Rijeka, Croacia. Intech
22. Khan, M., Bhaskar, A., Upaghyay, S., Kumar, D., Bhavesh, N. y Nandicoori, V. (2017). Protein kinase G confers survival advantage to *Mycobacterium tuberculosis* during latency-like conditions. *Microbiology* 292(39) 16093-16108. doi: 10.1074/jbc.M117.797563
23. Khan, M., Kaur, P., Nandicoori, V. (2018) Targeting the Messengers: Serine/Threonine Protein Kinases as Potential Targets for Antimycobacterial Drug Development. *IUBMB Life*. 70: 889–904. doi: 10.1002/iub.1871
24. Khan, M. y Nandicoori, V. (2021). Deletion of *pknG* abates reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 65:02095-20. doi: 10.1128/AAC.02095-20
25. Kraemer, O., Hazemann, I., Podjarny, A., y Klebe, G. (2004). Virtual Screening for Inhibitors of Human Aldose Reductase. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 55:814–823. doi: 10.1002/prot.20057
26. Kratz, J., Schuster, D., Edtbauer, M., Saxena, P., Mair, C., Kirchebner, J., Matuszczak, B., Baburin, I., Hering, S. and Rollinger, J. (2014). Experimentally Validated hERG Pharmacophore Models as Cardiotoxicity Prediction Tools. *J. Chem. Inf. Model* 54, 2887-2901. doi: 10.1021/ci5001955
27. Kéri, G., Órfi, L., Erós, D., Hegymegi-Barakonyi, B., Szántai-Kis, C., Horváth, Z., Wácsek, F., Marosfalvi, J., Szabadkai, I., Pató, J., Greff, Z., Hafenbradl, D., Daub, H., Müller, G., Klebl, B., y Ullrich A. (2006). Signal transduction therapy with rationally designed kinase inhibitors. *Current Signal Transduction Therapy* 1, 67-95. doi: 10.2174/157436206775269190

28. Koch, R. (1981). Die actiologie der Tuberculose. Traducción. Bol UninónInt Tuberc. 56 - 95
29. Koul, A., Choidas, A., Tyagi, A., Drlica, K., Singh, Y., Ullrich, A. (2001). Serine/threonine protein kinases PknF and PknG of *Mycobacterium tuberculosis*: characterization and localization. *Microbiology* 147: 2307 – 2314. doi:1099/00221287-147-8-2307
30. Lisa, M., Gil, M., André-Leroux, G., Barilone, N., Durán, R., Biondi, R., Alzari, P. (2015). Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from *Mycobacterium tuberculosis*. *Structure*. doi: 10.1016/j.str.2015.04.001
31. Lu, S., Wu, J., Liu, H., Zhao, J., Liu, K., Chuang, C., Lin, H., Tsai, W. y Ho, Y. (2011) The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: A combination of Pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. *Journal of Biomedical Science* 18:8. doi: 10.1186/1423-0127-18-8
32. Mahernia, S., Hassanzadeh, M., Sharifi, N., Mehravi, B., Paytam, F. Adib, M., y Amanlou, M. (2017). Structure-based pharmacophore design and virtual screening for novel potential inhibitors of epidermal growth factor receptor as an approach to breast cancer chemotherapy. *Molecular Diversity*. doi: 10.1007/s11030-017-9799-7
33. Mahmoud, A., y Mutasem, T. (2010). Discovery of novel CDK1 inhibitors by combining pharmacophore modeling, QSAR analysis and in silico screening followed by in vitro bioassay. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 4316- 4330. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.06.034
34. Maldonado-Rojas, W., Salinas-Torres, J., Olivero-Verbel, J. (2021). Identification of Potential Human Protein Targets for Soybean Isoflavones. *J. Braz. Chem. Soc.* 32 (4). doi: 10.21577/0103-5053.20200228
35. Meng, X-Y., Zhang, H-X., Mezei, M. y Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 7(2): 146–157. doi: 10.2174/157340911795677602

36. Michel F. Sanner. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graphics Mod.*, 1999, Vol 17, February. pp57-61
37. Ministerio de la Protección Social. (2011). Guía de atención de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Medicina & Laboratorio*, Volumen 7, Números 3 -4. Colombia. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2011/myl1113-4d.pdf>
38. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. (2013) Norma Técnica de Salud N°104-MINSA/DGSP-V.01. Norma Técnica de Salud para el Manejo Integral de las Personas Afectadas por Tuberculosis [Internet]. Lima. Disponible en: [ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2013/RM715\\_2013\\_MINSA.pdf](ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2013/RM715_2013_MINSA.pdf).
39. Missio, A., Bacher, G., Koul, A., Choidas, A., Banhegyi, P., Greff, Z., Keri, G., Marko, P., Orfi, L., Pató, J., Waczek, F. (2009). 4,5,6,7 - Tetrahydrobenzo[b]thiophene derivatives and methods for medical intervention against mycobacterial infections. (United States Patent No.: US 2009/0018149A1). Axxima pharmaceuticals. <https://patents.google.com/patent/US20090018149A1/en?q=us20090018149a1>
40. Molecular Operating Environment (MOE), 2020.09; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2020.
41. Murillo, M., Cabrera, M., Carbonell, M. (2006). Tuberculosis. En *International Marketing & Communication*, S.A. (Ed.) *Tratado de Geriátrica para residentes* (pp. 435-442). Sociedad Española de Geriátrica y Gerontología
42. Mysinger, M., Carchia, M., Irwin, J. y Shoichet, B. (2012). Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *Med. Chem.* 14, 6582 - 6594. doi: 10.1021/jm300687e.
43. O' Hare, H., Duran, R., Cervenansky, C., Bellinzoni, M., Wehenkel, A., Pritsch, O., Obal, G., Baumgartner, J., Vialaret, J., Johnsson, K., y Alzari, P. (2008). Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria, *Mol Microbiol* 70, 1408 - 23. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06489.x
44. Olivero-Acosta, M., Maldonado-Rojas, W., Olivero-Verbel, J. (2017). Natural Products as Chemopreventive Agents by Potential Inhibition of the Kinase Domain in ErbB Receptors. *Molecules* 22(2), 308. doi: 10.3390/molecules22020308

45. Palomino, J., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., y Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. pp 2720-2722. doi: 10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002
46. Pascual, R., Almansa, C., Salamán, C., y Vela, J. (2019). A New Pharmacophore Model for the Design of Sigma-1 Ligands Validated on a Large Experimental Dataset. *Pharmacol.* 10:519. doi: 10.3389/fphar.2019.00519
47. Pató, J., Keri, G., Orfi, L., Waczek, F., Horvath, Z., Banhegyi, P., Szabadkai, I., Marosfalvi, J., Hegymegi-Barakonyi, B., Szekelyhidi, Z., Greff, Z., Choidas, A., Bacher, G., Missio, A., y Koul, A. (2004). Novel therapeutic targets for the treatment of mycobacterial infections and compounds useful therefor. (United States Patent No.: US 2004/0171603A1). Axxima pharmaceuticals. <https://patents.google.com/patent/US20040171603A1/en>
48. Pató, J., Keri, G., Orfi, L., Waczek, F., Horvath, Z., Banhegyi, P., Szabadkai, I., Marosfalvi, J., Hegymegi-Barakonyi, B., Szekelyhidi, Z., Greff, Z., Choidas, A., Bacher, G., Missio, A., y Koul, A. (2009). Novel therapeutic targets for the treatment of mycobacterial infections and compounds useful therefor. (United States Patent No.: US 20090298842A1). Axxima pharmaceuticals. <https://patents.google.com/patent/US20090298842A1/en?q=US20090298842A1>
49. Prakash, N., Devangi, P. (2010) *Drug Discovery. J Antivir Antiretrovir* 2:063-068. doi:10.4172/jaa.1000025
50. Prieto-Martinez, F., y Medina-Franco, J. (2018). Diseño de fármacos asistido por computadora: Cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2): 124-134. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.2.6
51. Raffetseder, J. (2016) Interplay of human macrophages and *Mycobacterium tuberculosis* phenotypes. Division of Microbiology and Molecular Medicine. Department of Clinical and Experimental Medicine. Linköping University
52. Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F., y Medina-Franco, J. (2016). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28, 51-58. doi: 10.1016/j.eq.2016.06.002

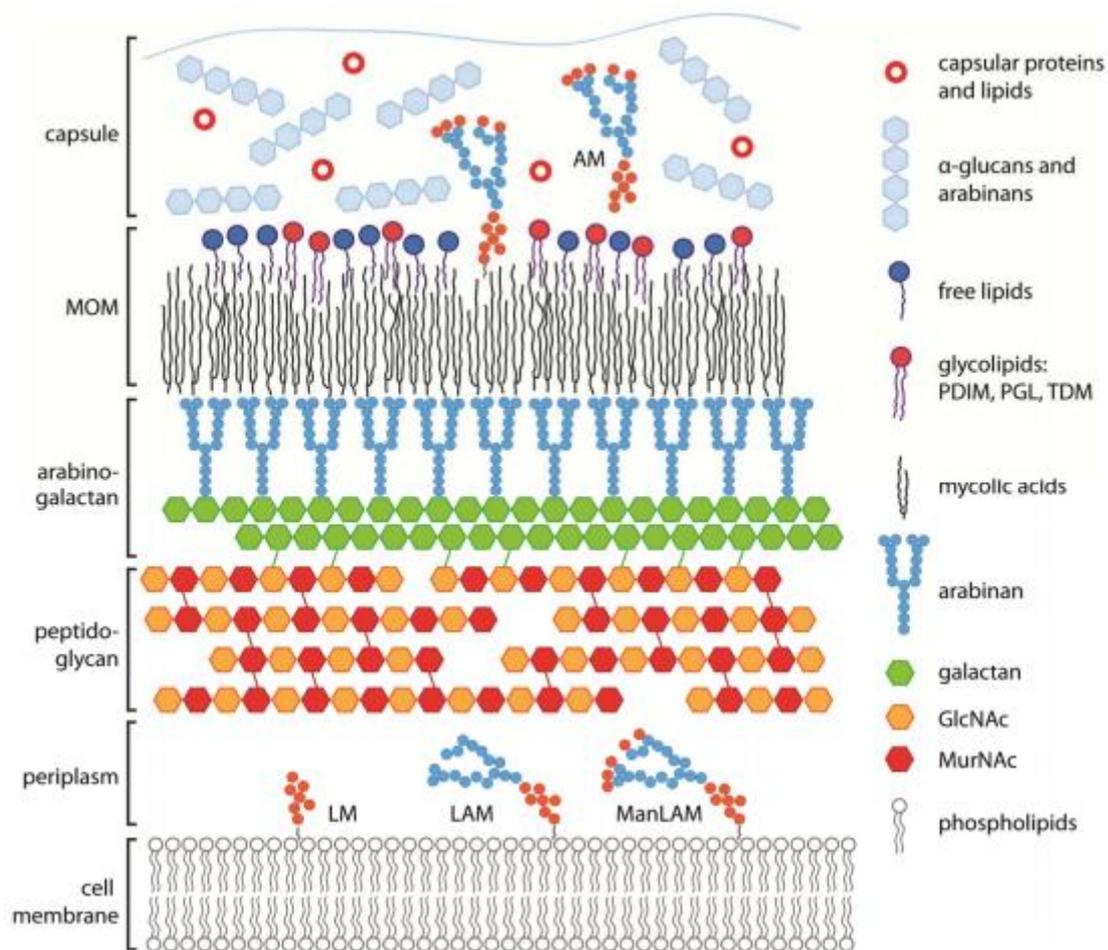
53. Saint-Joanis, B., Demangel, C., Jackson, M., Brodin, P., Marsollier, L., Boshoff, H., y Cole, S. (2006). Inactivation of Rv2525c, a Substrate of the twin arginine translocation (Tat) system of *Mycobacterium tuberculosis*, increases  $\beta$ -Lactam susceptibility and virulence. *Journal of Bacteriology* pp 6669-6679. doi: 10.1128/JB.00631-06
54. Santhi, N. y Aishwayra, S. (2011). Insights from the molecular docking of withanolide derivatives to the target protein PknG from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformation* 7(1) 1-4. doi: 10.6026/97320630007001
55. Scherr, N., Honnappa, S., Kunz, G., Mueller, P., Jayachandran, R., Winkler, F., Pieters, J., y Steinmetz, M. (2007). Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* July 17, 2007, vol. 104, N°. 29: 12151–12156. doi: 10.1073pnas.0702842104
56. Scherr, N. (2008). Studies on the Structure and Function of Protein Kinase G, a Virulence Factor of *Mycobacterium tuberculosis*. [Tesis Doctoral, Universidad de Basel]
57. Scherr, N., Müller, P., Perisa, D., Combaluzier, B., Jenö, P., y Pieters, J. (2009). Survival of pathogenic Mycobacteria in macrophages is mediated trough autophosphorylation of Protein Kinase G. *J Bacteriol* 191 (4): 4546 - 4554. doi: 10.1128/JB.00245-09
58. Seidel, T., Ibis, G., Bendix, F., y Wolber, G. (2010) Strategies for 3D Pharmacophore-based virtual screening. *Drug Discovery Today: Technologies*. doi: 10.1016/j.ddtec.2010.11.004
59. Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 6(3):[402-419]. Recuperado de: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>
60. Sipos, A., Pató, J., Székely, R., Hartkoorn, R., Kékesi, L., Órfi, L., Szántai-Kis, C., Mikusová, K., Svetlíková, Z., Korduláková, J., Nagara, V., Anand, A., Bush, N., Collin, F., Maxwell, A., Cole, S., y Kéri, G. (2015). Lead selection and characterization of antitubercular compounds using the Nested Chemical Library, *Tuberculosis*. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.028
61. Swain, S., Gupta, S., Das, N., Franca, T., Goncalves, A. y Ramalho, T. (2021). Flavanones: A potential natural inhibitor of the ATP binding site of PknG of *Mycobacterium*

- tuberculosis*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. doi: 10.1080/07391102.2021.1965913
62. Székely, R., Wączek, F., Szabadkai, I., Németh, G., Hegymegi, B., Eros, D., Szokol, B., Pató, J., Hafenbradl, D., Satchell, J., Saint-Joanis, B., Cole, S., Orfi, L., Klebl, B., y Kéri, G. (2008). A novel drug discovery concept for tuberculosis: Inhibition of bacterial and host cell signalling. *Immunology Letters* 116: 225–231. doi: 10.1016/j.imlet.2007.12.005
63. Úriz, J., Repáraz, J., Castiello, J., y Sola, J. (2007). Tuberculosis en pacientes infectados por el VIH. *An. Sist. Sanit. Navar*; 30 (Supl. 2): 131-142
64. Vuorinen, A., Schuster, D. (2015). Methods for generating and applying pharmacophore models as virtual screening filters and for bioactivity profiling. *Methods*. Jan;71:113-34. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.10.013
65. Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., y Pieters, J. (2004). Protein kinase G from pathogenic *Mycobacterium* promotes survival within macrophages. *Science* 304, 1800. doi: 10.1126/science.1099384
66. Wolber, G., y Langer, T. (2005). LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Model.*, Vol. 45, No. 1. doi: 10.1021/ci049885e
67. Wermuth G., Ganellin C.R., Lindberg P., Mitscher L.A. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1998) *Pure Appl. Chem.* 1998; 70:1129–1143. doi: 10.1351/pac199870051129.
68. World Health Organization. (2016). Implementing the end TB strategy: the essentials. Geneva. Recuperado de: [https://www.who.int/tb/publications/2015/The\\_Essentials\\_to\\_End\\_TB/en/](https://www.who.int/tb/publications/2015/The_Essentials_to_End_TB/en/)
69. World Health Organization. (2016). Who treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250125/9789241549639-eng.pdf>
70. World Health Organization. (2020). Recuperado de: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>

### XIII. ANEXOS

**Figura S1**

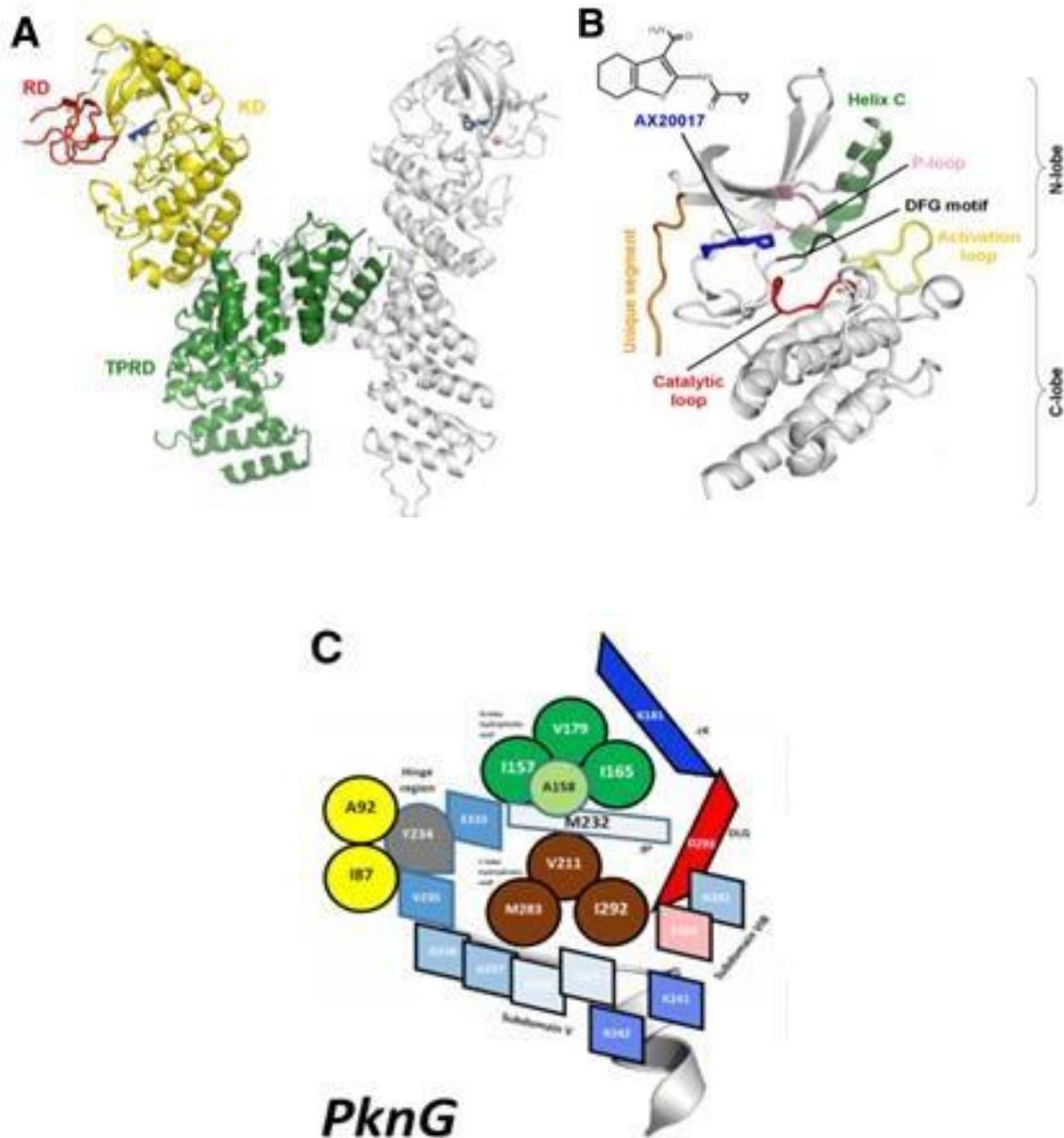
*Pared celular de Mycobacterium tuberculosis*



*Nota.* AM = Arabinomanano, MOM = Membrana micobacterial externa, PDIM = Tioceroi dimicoserosato, PGL = Glicolípido fenólico, TDM = Trehalosa 6,6' - dimicolato, GlcNAc = N-acetilglucosamina, MurNAc = Ácido N-acetil-murámico, LM = Lipomanano, LAM = Lipoarabinomanano, ManLAM = LAM con tapa de manosa. Tomado de Raffetseder, 2016

## Figura S2

### Información general de PknG



*Nota.* (A) Representación de PknG en cintas con sus tres dominios definidos: RB en rojo, dominio de rubredoxina; KD en amarillo, dominio de quinasa; TPRD en verde, dominio que contiene una repetición de tetracoceptido. (B) Topología del dominio quinasa PknG en complejo con AX20017, los elementos característicos se muestran en diferentes colores; AX20017 representado en color azul. (C) Esquema del sitio de unión de ATP para PknG. Los círculos verdes y marrones corresponden a las paredes hidrofóbicas del lóbulo N y el lóbulo C respectivamente. Trapecio azul corresponde a la Lisina catalítica mientras que el de color rojo al aspartato DFG. Tomado de Scherr, *et al.* 2007 y Caballero, *et al.* 2018.

### Figura S3

Representación de las características de un farmacóforo en cuatro paquetes de software

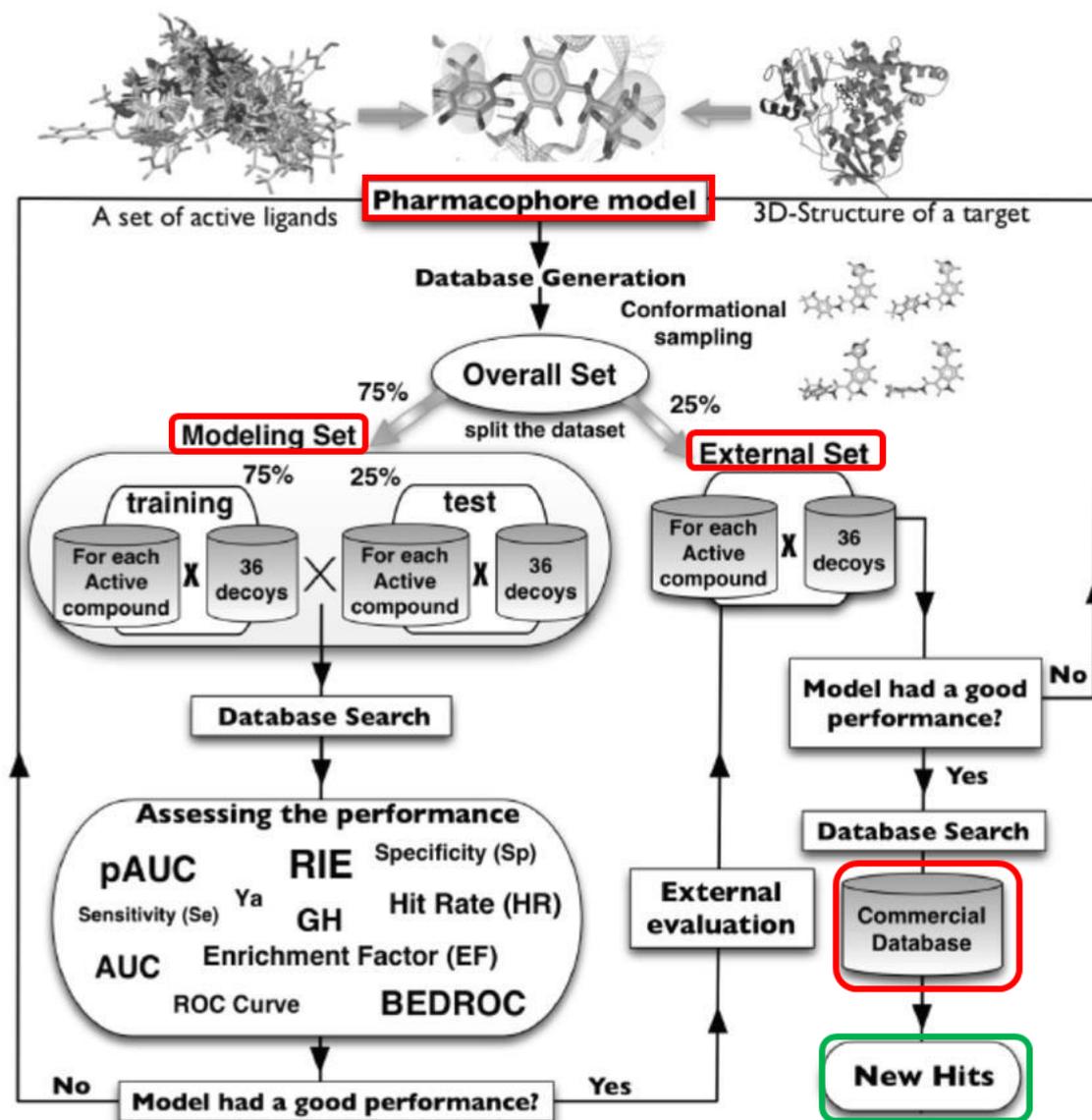
Chemical feature	LigandScout	DiscoveryStudio	MOE	PHASE
HBD				
HBA				
PI				
NI				
H				
Aromatic feature				
Metal binding				
XVOL				

<sup>a</sup> LigandScout distinguishes iron, zinc, and magnesium as metal binding features.  
<sup>b</sup> Features not depicted.

*Nota.* HBD: Donador de enlaces de hidrógeno; HBA: Aceptor de enlaces de hidrógeno; PI: Grupo ionizable positivo; NI: Grupo ionizable negativo; H: Hidrófobos; XVOL: Volúmenes de exclusión. Tomado de Vourinen y Schuster, 2015.

Figura S4

Diagrama de flujo general del tamizaje virtual basado en modelos de farmacóforos 3D

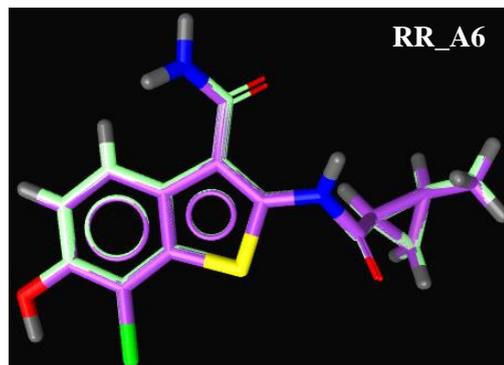
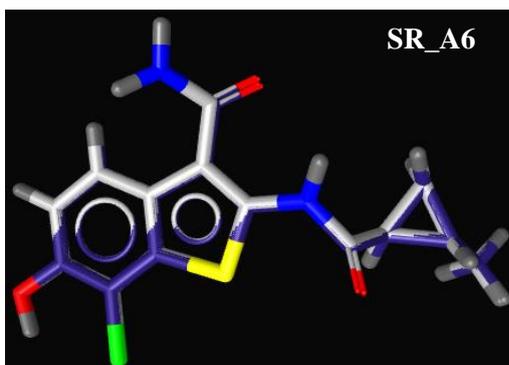
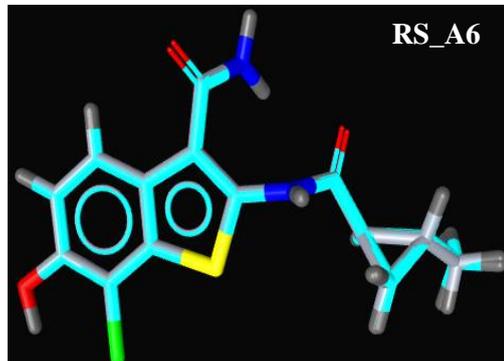
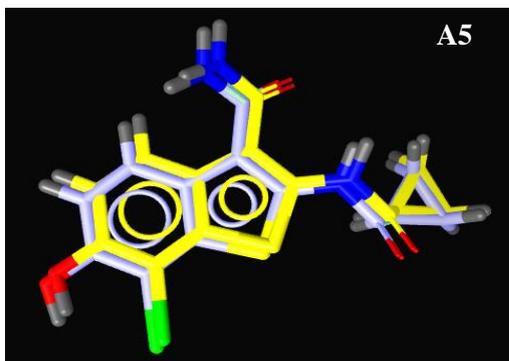
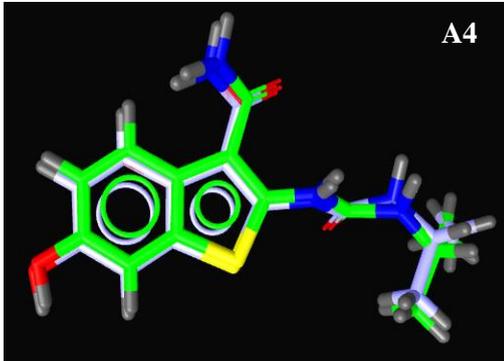
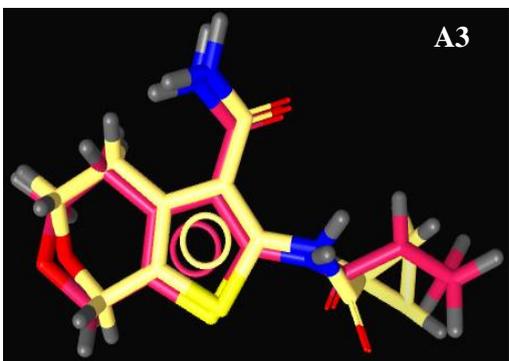
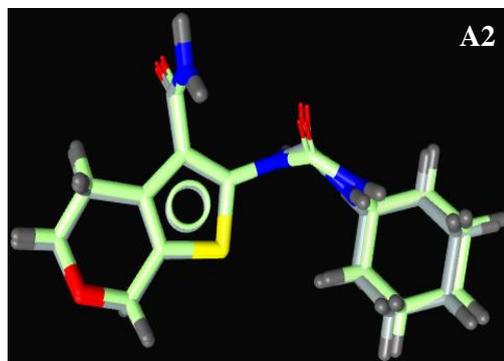
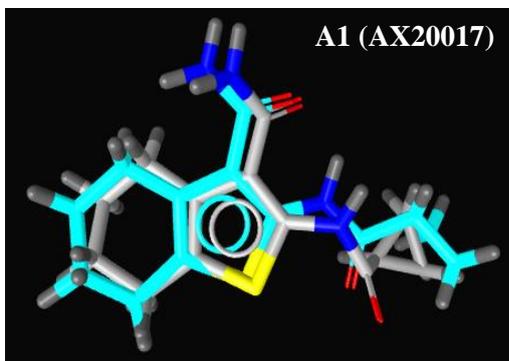


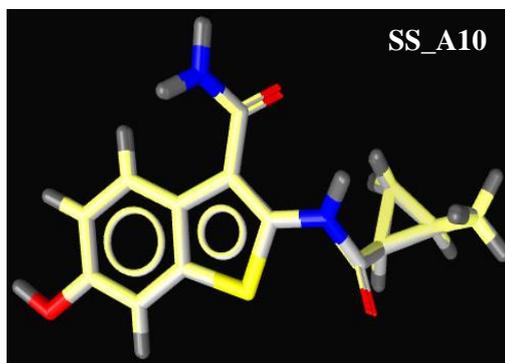
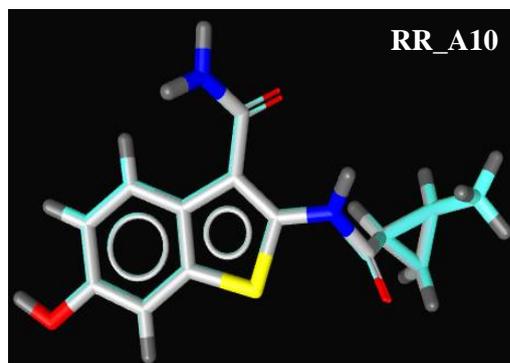
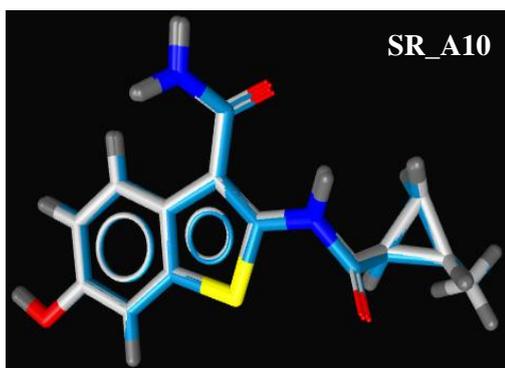
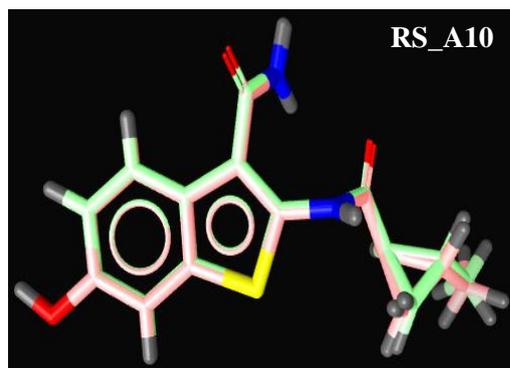
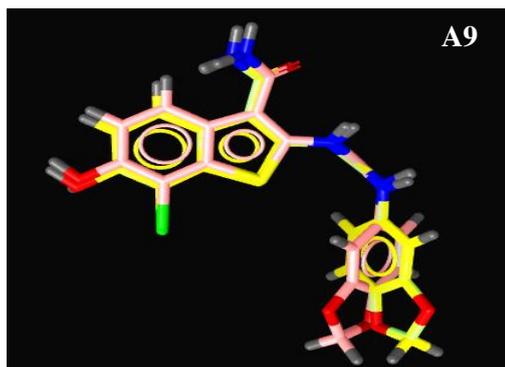
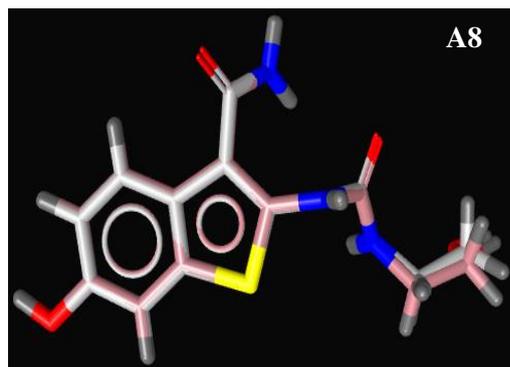
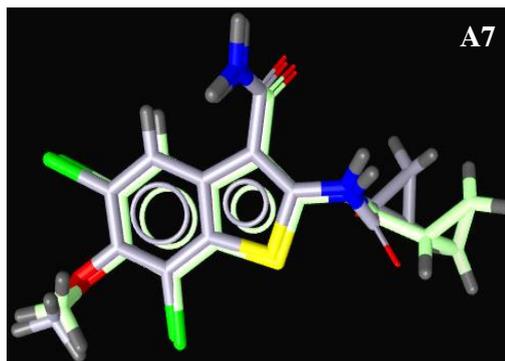
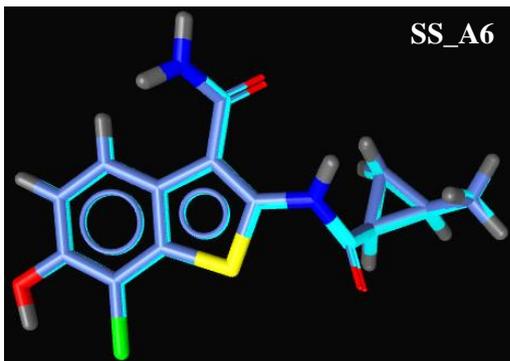
Nota. Tomado de Braga, et al. 2013.



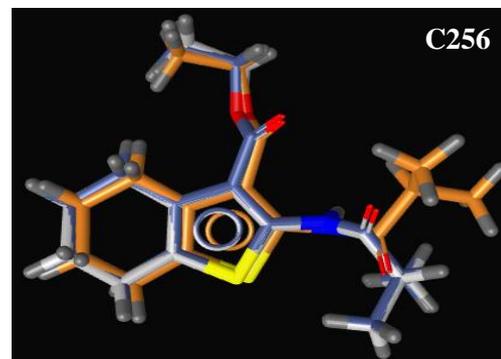
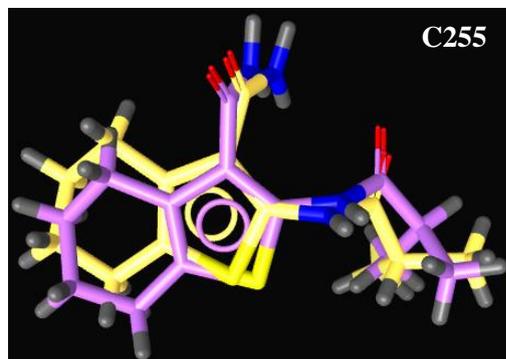
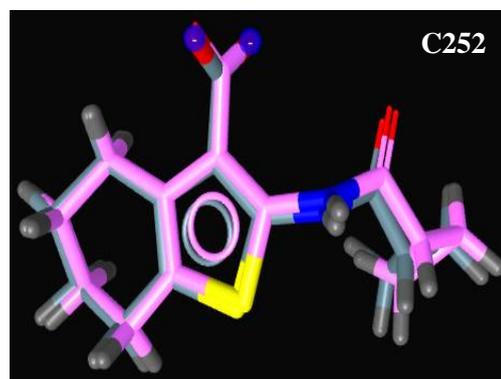
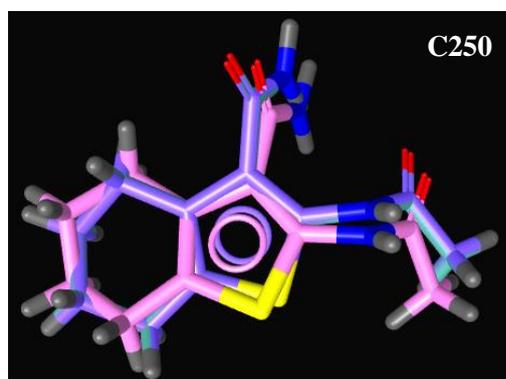
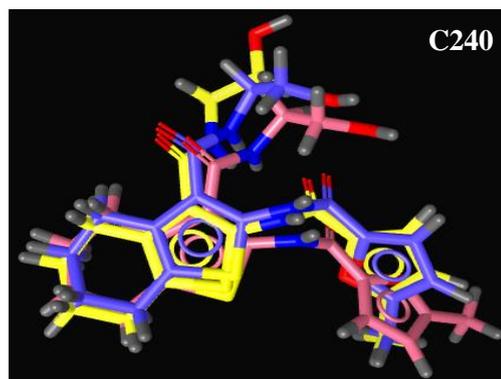
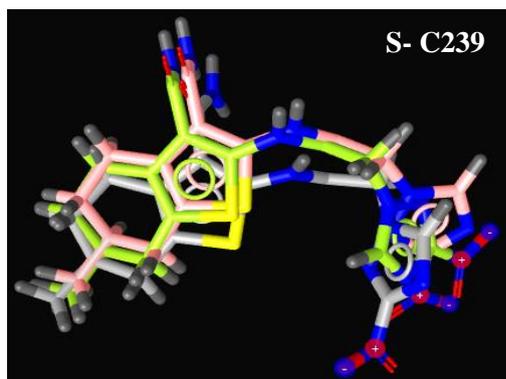
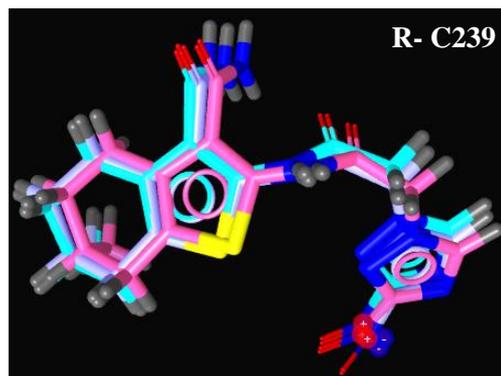
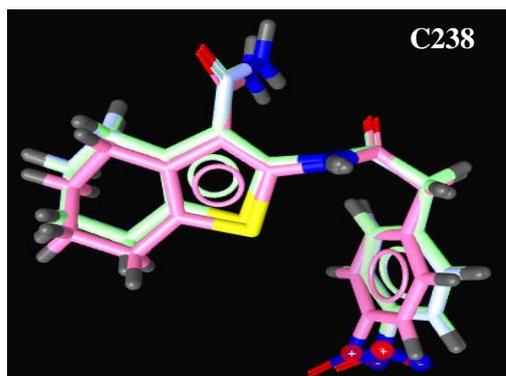
9.2.2.1 Cálculos de acoplamiento y análisis de las interacciones moleculares para la Serie A-C

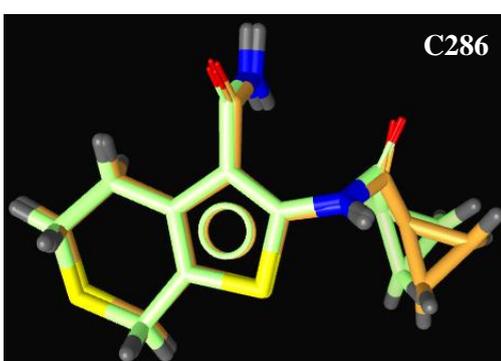
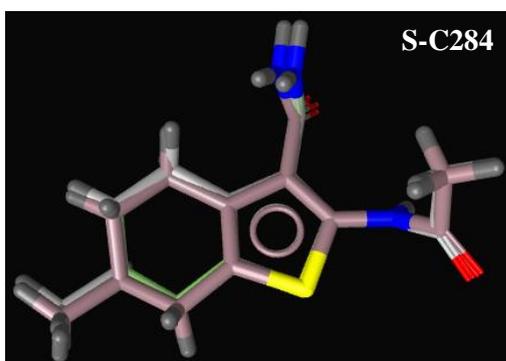
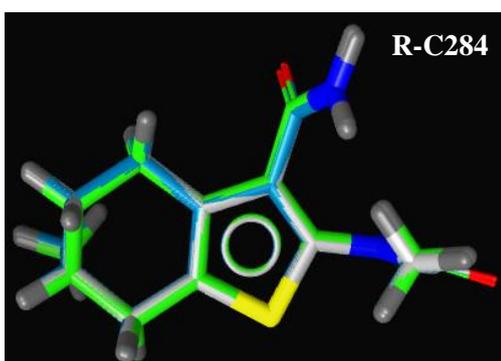
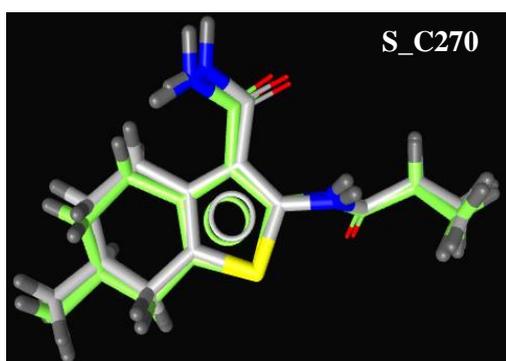
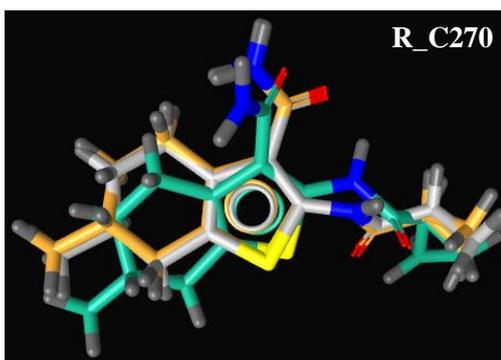
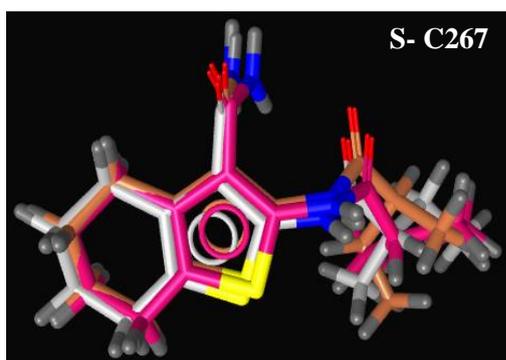
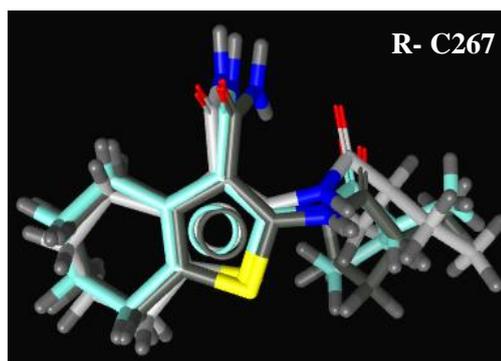
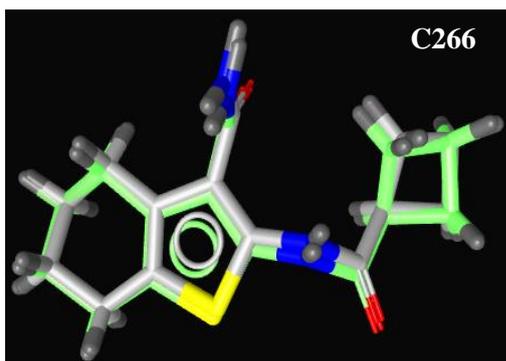
*Serie A*





*Serie C*





### 9.2.4.1 Cálculos de acoplamiento y análisis de interacciones moleculares para Aminopirimidinas

