

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS CON
CAPACIDAD INHIBITORIA DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN
LA FISIOPATOLOGÍA DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**

Lic. Iván Sanchis

Director de Tesis: Dr. Álvaro Sebastián Siano

Co-director de Tesis: Dr. Ricardo Daniel Enriz

Lugar de realización: Laboratorio de Péptidos Bioactivos – Departamento de
Química Orgánica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-
Universidad Nacional del Litoral

-2023-

Dos cosas llenan mi ánimo de creciente admiración y respeto, a medida que pienso y profundizo en ellas: el cielo estrellado sobre mí y la ley moral dentro de mí.

Immanuel Kant

A mi abuela y la Lili.

Quienes siempre estarán en mis pasos.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis fue llevada a cabo en el Laboratorio de Péptidos Bioactivos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, bajo la dirección del Dr. Álvaro Siano y la co-dirección del Dr. Ricardo Daniel Enriz.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible que pueda llegar a la escritura de este manuscrito, esperando que me permita completar esta hermosa e importante etapa de mi vida y formación académica. Tuve la suerte de estar rodeado de personas que me brindaron apoyo constante para poder llegar hasta este punto.

A La Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, así como a la Universidad Nacional del Litoral, les agradezco por proporcionar los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación. Su compromiso total con la excelencia académica y la calidad profesional y humana de quienes componen esta prestigiosa institución hicieron que este proyecto fuera una realidad. En especial, quiero agradecer a la decana de esta Facultad, Bioq. Adriana Ortolani, y a las excelentes personas que trabajan diariamente en la Secretaría de Posgrado: Gabi, Yami, Enrique y Luciana.

A mis compañeros de trabajo, que me hacen sentir cada día como en casa, me brindan su apoyo y buena onda constante. El intercambio de conocimientos, los debates y la colaboración en actividades laborales fueron claves para realizar esta tesis y están plasmados en los resultados. Por otro lado, no hubiese sido lo mismo sin la ayuda del hermoso ambiente laboral que se vive dentro del LPB. Desde que llegué, encontré un espacio humano y profesional en el que me sentí cómodo y del que rápidamente me sentí parte. Gracias Álvaro y Vero que me permitieron incorporarme al laboratorio en un principio y me transmitieron sus grandes conocimientos para poder dedicarme a la investigación y a la docencia. Gracias Roque y Pablo, que también estuvieron al inicio y me dieron una ayuda enorme. Gracias también a todos los que se incorporaron después, algunos todavía están y otros no, pero con muchos formé una hermosa relación de

amistad: gracias Nico, Flor, Tito, Lupa, Meli, Gime y Mili. Los momentos de mates, charlas, juntadas, viajes, fiestas y experiencias de todo tipo que compartí con algunos de ustedes me van a acompañar para siempre.

Especialmente, quiero expresar mi gratitud hacia mi director, Dr. Álvaro Siano, que creyó en mí e hizo todo lo posible para que pueda completar todas las etapas de este proceso académico y profesional. Además de ser un excelente docente e investigador, es una gran persona que siempre está para guiar y ayudar a su equipo de trabajo. También agradezco a mi co-director, Dr. Ricardo Daniel Enriz, ya que sin su dirección no hubiese podido llevar a cabo este trabajo.

Agradezco la ayuda del Dr. Xavier Brazzolotto y del Dr. José Días, quienes eligieron colaborar con nosotros en este trabajo y dedicar esfuerzo para poder mejorar su calidad científica.

A mi familia, mi apoyo a lo largo de toda mi vida, les agradezco infinitamente por su amor incondicional, paciencia y comprensión. Mamá y papá, gracias por permitirme decidir en total libertad los pasos a seguir en mi vida y formación profesional. Los admiro y les debo todo. Esteban y Fabi, gracias por ser las personas maravillosas que son, al igual que Dani y Fran. Un gracias enorme también va hacia mis tíos y hacia la Coqui, la Lili y mi abuela, que recuerdo cada día y sé que están siempre cerca mío. Gracias Feli y Sabi que me iluminan la vida. Los quiero con todo mi corazón.

Por último, quiero agradecer a mi compañera de vida Flor. Amor, gracias por estar siempre y hacerme feliz cada día! Lo mismo para Milo, compañero incondicional y un genio total.

A Todos los que estuvieron durante estos años y compartieron momentos conmigo en este camino de vida.

Muchas gracias!

- * 2023. “Front Cover: Inhibition of Human Cholinesterases and In Vitro β -Amyloid Aggregation by Rationally Designed Peptides”. **Sanchis Iván**, Spinelli Roque, Brazzolotto Xavier, Dias José, Rietmann Álvaro, Siano Álvaro. *ChemMedChem*. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200691>
- 2023. “Acetylcholine Hydrolytic Activity of Fibrillated β -Amyloid (1-40) Peptide”. **Sanchis Iván**, Spinelli Roque, Siano Álvaro. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-023-03349-3>
- 2023. “Biological Characterization of Natural Peptide Bcl-1003 from *Boana cordobae* (anura): Role in Alzheimer’s Disease and Microbial Infections”. Spinelli Roque, Húmpola Verónica, **Sanchis Iván**, De los Ángeles Mendez Emilse, Siano Álvaro. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10472-4>
- 2022. “Rational design and synthesis of modified natural peptides from *Boana pulchella* (anura) as acetylcholinesterase inhibitors and antioxidants”. **Sanchis Iván**, Spinelli Roque, Aschemacher Nicolás, Siano Álvaro. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03096-3>
- 2021. “Natural multi-target modulators of pathological pathways in Alzheimer’s disease isolated from the *Rhinella arenarum* skin”. Spinelli Roque, Rietmann Álvaro, **Sanchis Iván**, Siano Álvaro. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1953022>
- 2020. “Acetylcholinesterase inhibitory activity of a naturally occurring peptide isolated from *Boana pulchella* (Anura: *Hylidae*) and its analogs”. **Sanchis Iván**, Spinelli Roque, Aschemacher Nicolás, Húmpola Verónica, Siano Álvaro. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02815-1>
- 2019. “Natural multi-target inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidase enzymes with antioxidant potential from skin extracts of *Hypsiboas cordobae* and *Pseudis minuta* (Anura: *Hylidae*)”. Spinelli Roque, **Sanchis Iván**, Aimaretti Florencia María, Attademo Andrés,

Madelón Portela, Húmpola Verónica, Tonarelli Georgina, Siano Álvaro.
Chemistry and Biodiversity. [https://doi.org/ 10.1002/cbdv.201800472](https://doi.org/10.1002/cbdv.201800472)

* Trabajo seleccionado para ser destacado en la tapa de la revista *ChemMedChem* (ChemMedChem 12/2023). Disponible en: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202300289>.

ÍNDICE

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN	15
ABSTRACT	20
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. La Enfermedad de Alzheimer	24
1.1.1. Un reto para la salud pública.....	24
1.1.2. Fisiopatología	26
1.1.3. Etiología y tratamiento.....	28
1.1.4. Ensayos para determinar actividades de interés para la EA	33
1.2. Las colinesterasas	38
1.2.1. Características	38
1.2.2. Actividad hidrolítica de ACh	39
1.2.3. Funciones no colinérgicas.....	41
1.2.4. Isoformas principales para el desarrollo de inhibidores.....	43
1.2.5. Características estructurales de los IChEs.....	44
1.3. Los péptidos bioactivos.....	49
1.3.1. Péptidos bioactivos en la naturaleza	49
1.3.2. Péptidos bioactivos terapéuticos.....	51
1.3.3. Fuentes de péptidos bioactivos y terapéuticos.....	55
1.3.4. Síntesis de péptidos en fase sólida	59
1.3.4.1. Tratamiento post-síntesis	64
1.4. Inhibidores enzimáticos en farmacología.....	67
1.4.1. Tipos de inhibidores	68
1.4.2. Cuantificación de la capacidad inhibitoria	71
1.4.3. Herramientas computacionales para el estudio de los IEs.....	74
1.4.3.1. Dinámica molecular	74
1.4.3.2. <i>Clustering</i>	87
1.4.3.3. <i>Docking</i>	88
1.4.3.4. Método HADDOCK.....	90
1.4.3.5. Combinación de DM y <i>docking</i>	92
2. OBJETIVOS	94

2.1. Objetivo general.....	95
2.2. Objetivos específicos	95
3. MATERIALES Y MÉTODOS	97
3.1. Diseño y síntesis de las moléculas	97
3.1.1. Estrategia de diseño racional de análogos.....	97
3.1.2. Síntesis en fase sólida (SPPS) por química Fmoc.....	99
3.1.3. Cromatografía Líquida de <i>Alta Performance</i> en fase reversa (RP-HPLC).....	102
3.2. Actividad inhibitoria de las colinesterasas.....	102
3.2.1. Inhibición de AChE/BChE a punto final	102
3.2.2. Determinación de tipo de inhibición y cálculo de K_i - Ensayo cinético	104
3.2.3. Estudio de la reversibilidad de la reacción	105
3.3. Bioactividad frente a otros blancos moleculares.....	106
3.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante – Ensayo del radical DPPH	107
3.3.2. Actividad quelante de hierro (II)	107
3.3.3. Inhibición de la agregación <i>in vitro</i> del péptido A β	108
3.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	108
3.4. Propiedades toxicológicas	109
3.4.1. Ensayo de lisis de eritrocitos (hemólisis).....	109
3.4.2. Biotoxicidad frente a <i>Artemia salina</i>	110
3.5. Estudios computacionales	110
3.5.1. Modelado estructural de los péptidos.....	111
3.5.2. <i>Docking</i> molecular semiflexible	111
3.5.3. Simulaciones de dinámica molecular	112
3.5.4. Cálculos MM/GBSA.....	114
3.5.5. Predicción de propiedades fisicoquímicas	114
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	116
4.1. Actividad inhibitoria de Hp-1935 y detección de la porción activa.....	116
4.1.1. Diseño y síntesis para determinar la porción activa	116
4.1.2. Actividad inhibitoria de AChE de Hp-1935	117
4.1.2.1. Ensayo de punto final	117
4.1.2.2. Caracterización cinética.....	120

4.1.2.3. Modelado de la interacción Hp-1935-AChE.....	121
4.2. Actividad inhibitoria de los derivados de Hp-1935	124
4.3. Diseño y síntesis de análogos de sustitución de la porción activa.....	126
4.3.1. Estrategia de diseño.....	126
4.3.2. Mecanismo inhibitorio de LL.....	126
4.4. Actividad inhibitoria de AChE y BChE de los análogos de sustitución.	132
4.4.1. Actividad frente a EeAChE	132
4.4.1.1. Estimación de la IC ₅₀	132
4.4.2. Mecanismo de interacción y cinética del mejor análogo.....	134
4.4.2.1. Cinética y reversibilidad de reacción.....	134
4.4.3. Actividad frente a las isoformas humanas recombinantes de AChE y BChE.....	139
4.4.3.1. Estimación de la IC ₅₀	139
4.4.3.2. Cinética y mecanismo inhibitorio de los mejores derivados sobre hAChE y hBChE	141
4.4.3.3. Análisis del complejo W3-hAChE.....	143
4.4.3.4. Análisis del complejo W3W7-hBChE	145
4.5. Otras propiedades de interés y toxicidad.....	148
4.5.1. Propiedades de interés	148
4.5.1.1. Actividad antioxidante	148
4.5.1.2. Actividad quelante.....	150
4.5.1.3. Actividad antiagregante de Aβ	151
4.5.2. Toxicidad.....	154
4.5.2.1. Actividad hemolítica	154
4.5.2.2. Toxicidad <i>in vivo</i> en <i>Artemia salina</i> (<i>A. salina</i>).....	156
4.5.2.3. Toxicidad y estabilidad <i>in silico</i>	157
5. CONCLUSIONES.....	160
6. MATERIAL ANEXO	164
7. BIBLIOGRAFÍA	171

ABREVIATURAS

Abs; absorbancia

ACh; acetilcolina

AChE; acetilcolinesterasa

ACN; acetonitrilo

ATCl; yoduro de acetiltiocolina

A β ; péptido β -amiloide

A β ₄₀; péptido β -amiloide (1-40)

APP, proteína precursora de amiloide (del inglés, *amyloid precursor protein*)

BChE; butirilcolinesterasa

CAS; sitio catalítico

CF; campo de fuerza

CG; grano grueso (del inglés, *coarse grain*)

CPC; condiciones periódicas de contorno

CPU; unidad de procesamiento central (del inglés, *Central Processing Unit*)

Da; dalton

DCM; diclorometano

DIEA; diisopropiletilamina

DMF; N,N-dimetilformamida

DPPH·; radical libre 2,2-difenil-1-picrylhidrazilo

DTNB; 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

DVB; divinilbenceno

E; enzima

EA; enfermedad de Alzheimer

EC₅₀; concentración efectiva 50

EDTA; ácido etilendiaminotetraacético

EeAChE; acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus*

ES; complejo enzima-sustrato

ESI; ionización por electrospray

FDA; *Food and Drug Administration*

Fmoc; 9-fluorenilmetoxicarbonilo

GBD; Carga Mundial de Morbimortalidad (del inglés, *Global Burden of Disease*)

GPU; unidad de procesamiento gráfico (del inglés, <i>Graphical Processing Unit</i>)	MAO-B; monoamino oxidasa B
GRh; glóbulos rojos humanos	MD; dinámica molecular
H; valor de hidrofobicidad Gravy	MM; mecánica molecular
hAChE; acetilcolinesterasa humana	MM/GBSA; mecánica Molecular con área de solvatación de superficie generalizada de Born (del inglés, <i>Molecular mechanics with generalised Born and surface area solvation</i>)
hBChE; butirilcolinesterasa humana	MS; espectrometría de masas
HLP; predicción del tiempo de vida media (en inglés, <i>Half Life Prediction</i>)	MS-MS; espectrometría de masas en tándem
HOBt; hidroxibenzotriazol	NFTs; ovillos neurofibrilares
HPLC; cromatografía líquida de alta <i>performance</i>	OMS; Organización Mundial de la Salud
IC ₅₀ ; concentración inhibitoria 50	PAMs; péptidos antimicrobianos
IChEs; inhibidores de las colinesterasas	PAS; Sitio Aromático Periférico
IC95%; intervalo de confianza del 95%	PBs; péptidos bioactivos
IEs; inhibidores enzimáticos	PDB; <i>Protein Data Bank</i>
K _d ; contante de disociación	PTs; péptidos terapéuticos
K _i ; constante de inhibición	QM/MM; mecánica cuántica/mecánica molecular
MALDI; desorción por láser asistida por matriz	RMN; resonancia Magnética Nuclear

RMSD; desviación cuadrática media (del inglés, *Root-mean-square deviation*)

V_{\max} ; velocidad máxima

ROS; especies reactivas de oxígeno

RP; fase reversa

S; sustrato

SA; subsitio aniónico

SEM; Microscopía electrónica de barrido (del inglés *Scanning Electron Microscopy*)

SPPS; síntesis de péptidos en fase sólida

TBTU; O-(benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio

TcAChE; acetilcolinesterasa de Tetronarce californica

TFA; ácido trifluoracético

TIP3P; Potencial Intermolecular Transferible 3 Puntos (del inglés, *Transferable Intermolecular Potential 3 Points*)

TIS; Triisopropilsilano

Tof; tiempo de vuelo (en inglés, time of flight)

tr; tiempo de retención

RESUMEN

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno cerebral progresivo de alta prevalencia e incidencia a nivel mundial, con 10 millones de nuevos casos cada año. Esta enfermedad provoca un deterioro irreparable de varias funciones neurológicas, llevando a los pacientes, sus familias y los sistemas de salud a enfrentar grandes adversidades tanto personales como sociales y económicas. La Organización Mundial de la Salud considera el abordaje de esta patología como una prioridad para la salud pública global.

El tratamiento farmacológico principal de la EA se basa en el uso de compuestos capaces de reducir de forma reversible la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE). Estas hidrolasas de serina son responsables de la descomposición del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en acetato y colina en el espacio sináptico y, en las personas afectadas por la EA, muestran una actividad exacerbada que conduce a una disminución de los niveles fisiológicos de ACh. El tratamiento con inhibidores de las colinesterasas (IChEs) mejora la acción estimulante de la ACh y los síntomas de la EA. Los IChEs actualmente aprobados (donepezilo, rivastigmina y galantamina) se dirigen principalmente a la AChE, la colinesterasa más abundante en el sistema nervioso central, donde la BChE representa el 20% de la hidrólisis total de ACh.

Recientemente, se aprobó un nuevo fármaco que actúa por otra vía frente a la EA, dirigiéndose hacia los depósitos de péptido β -amiloide ($A\beta$) que son el principal componente de las placas seniles en el cerebro, características de esta enfermedad y que actúan como núcleos de toxicidad y daño neuronal. Además, se encuentran en fases avanzadas de desarrollo fármacos con actividad neuroprotectora como antioxidantes o quelantes de iones metálicos.

En los últimos años, muchos compuestos que poseen más de una de las propiedades deseadas se propusieron como candidatos para el tratamiento de la EA, por su naturaleza multifactorial. En este sentido, un interés especial se ha

generado entorno a los inhibidores de la AChE que actúan en un sitio enzimático no catalítico llamado Sitio Aromático Periférico (PAS). Se ha demostrado que, a través de este sitio, la AChE participa en la agregación de A β favoreciendo el proceso. Los IChEs que ejercen su actividad mediante interacción con este sitio pueden, potencialmente, tener un efecto inhibitorio también sobre la deposición de A β . El PAS es muy rico en residuos aromáticos y sus inhibidores normalmente contienen anillos aromáticos o heteroaromáticos que forman interacciones aromática-aromática con la enzima.

Muchos IChEs son compuestos naturales o derivados. Además de las moléculas pequeñas, se han aislado de diferentes fuentes algunos péptidos con actividad inhibitoria de las colinesterasas. Los péptidos terapéuticos están ganando cada vez más atención dentro del mercado de fármacos, con una cuota actual de mercado del 5%.

En este trabajo se aplicaron técnicas de diseño racional y síntesis para obtener nuevos péptidos con elevada actividad como IChEs. A tal fin, se partió de una secuencia con moderada actividad inhibitoria de las colinesterasas, el péptido natural Hp-1935 de 19 residuos, aislado e identificado previamente por el grupo de trabajo a partir de la rana del litoral argentino *Boana pulchella*. Inicialmente, se aplicó una estrategia de diseño de desplazamiento de secuencia para encontrar la región responsable de la actividad inhibitoria, con el fin de obtener una secuencia más corta para utilizar de base en el diseño de análogos de sustitución. Los péptidos se sintetizaron mediante Fmoc-SPPS. De esta manera, se encontró el péptido LL de sólo 10 residuos que retuvo gran parte de la actividad inhibitoria.

A partir de LL, se implementó un diseño guiado computacionalmente, mediante el estudio de la interacción AChE-péptido con técnicas de *docking* y dinámica molecular, para seleccionar los residuos blanco para las sustituciones. Las modificaciones apuntaron a la sustitución de residuos alifáticos por aromáticos, para incluir en la secuencia grupos químicos muy presentes en los IChEs y generar contactos de tipo aromático-aromático, típicamente más fuertes que los alifático-aromático. Los análogos de sustitución se sintetizaron y

evaluaron como inhibidores *in vitro* tanto frente a AChE y BChE, mediante reacción de Ellman.

Los resultados destacaron que una de las secuencias generadas, el péptido W3 con una sustitución de Trp, mostró una actividad casi 100 veces más alta que la de la secuencia de base frente a la AChE humana, con un valor de IC_{50} $0,99 \mu M (\pm 0,02)$, siendo el péptido más potente que se haya reportado frente a las colinesterasas. Esta secuencia inhibió también la BChE (IC_{50} : $15,44 \mu M \pm 0,91$). El modelado computacional de su interacción con la enzima, junto con estudios de cinética enzimática, permitieron determinar que su región de interacción, al igual que los demás péptidos de esta serie, es el PAS. Otro derivado (W3W7) con dos sustituciones de Trp, mostró importantes valores de actividad frente a AChE y BChE (IC_{50} -AChE: $1,70 \mu M \pm 0,05$; IC_{50} -BChE: $9,40 \mu M \pm 0,48$). Estos hallazgos indican que la estrategia de diseño fue efectiva para aumentar la actividad de la secuencia base.

Los compuestos desarrollados fueron evaluados también por su actividad biológica frente a otros blancos de la EA. Algunos de los análogos, en particular los que contienen Trp, mostraron buen potencial antioxidante y quelante de hierro (II). El derivado W3W7 fue el de mayor actividad antioxidante frente a radicales DPPH con un valor de EC_{50} de $27,58 \mu M \pm 8,74$, lo que lo posiciona entre los péptidos más antioxidantes que se hayan reportado. W3 también resultó antioxidante (EC_{50} : $78,31 \mu M \pm 18,18$). Además, para este último, se evaluó su efecto inhibitorio de la agregación de A β inducida por AChE, con el método de la tioflavina T. Se encontró que este péptido es altamente activo *in vitro* contra este proceso de fibrilación, logrando inhibir el $94,2\% \pm 1,2$ de la agregación de A β luego de 8 horas. Estos hallazgos enfatizan el interés sobre esta secuencia al demostrar su potencial como agente activo simultáneamente sobre diversas de las vías fisiopatológicas que desencadenan los síntomas de la EA.

Finalmente, se evaluó el potencial tóxico de las secuencias con ensayos de hemólisis, de toxicidad *in vivo* frente a *Artemia salina* y de predicción de toxicidad *in silico*. Notablemente, no se encontró una toxicidad elevada en

general en estas secuencias y el péptido W3, en particular, mostró actividad hemolítica a concentraciones mucho mayores a su concentración activa.

La EA es una patología que se encuentra en acelerado crecimiento y posee una compleja etiología que requiere de modernos métodos de tratamiento. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral evidencian el potencial de los péptidos como compuestos activos en este tipo de enfermedades y expone un esquema de diseño racional de péptidos que resultó ampliamente exitoso para el incremento de la actividad inhibitoria. Estos avances podrían allanar el camino hacia el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para el abordaje de la EA, dado que se considera a la secuencia W3 y a otros de los derivados obtenidos como excelentes secuencias de base para el desarrollo de nuevos fármacos.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive brain disorder of high prevalence and incidence worldwide, with 10 million new cases each year. This disease causes irreparable deterioration of various neurological functions, taking the patients, their families, and the public health systems to deal with great personal, social and economic adversities. The World Health Organization considers the approach to this pathology as a priority for global public health.

The main pharmacological treatment of AD is based on the use of compounds capable of reversibly reducing the activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). These serine hydrolases are responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in acetate and choline in the synaptic cleft and, in people affected by AD, they show an exacerbated activity that leads to a decrease in physiological ACh levels. Treatment with cholinesterase inhibitors (ChEIs) improves the stimulating action of ACh and the symptoms of AD. The currently approved ChEIs (donepezil, rivastigmine, and galantamine) primarily target AChE, the most abundant cholinesterase in the central nervous system, where BChE accounts for 20% of total ACh hydrolysis.

Recently, a new drug was developed that acts uses another strategy to attack AD, targeting the β -amyloid ($A\beta$) peptide deposits that are the main component of senile plaques in the brain, a hallmark of this disease and that act as nuclei of toxicity and neuronal damage. In addition, there are drugs with neuroprotective activity such as antioxidants or metal ion chelators in advanced stages of pharmaceutical development.

In recent years, many compounds that possess more than one of the desired properties have been proposed as candidates for the treatment of AD, due to its multifactorial nature. In this sense, a special interest has been generated around AChE inhibitors that act on a non-catalytic enzymatic site called the Peripheral Aromatic Site (PAS). It has been proved that, through this

site, AChE participates in A β aggregation as a chaperone, favoring the process. ChEIs that exert their activity through interaction with this site can potentially have an inhibitory effect on A β deposition as well. PAS is very rich in aromatic residues and its inhibitors usually contain aromatic or heteroaromatic rings that form aromatic-aromatic interactions with the enzyme.

Numerous ChEIs are naturally occurring compounds or derivatives. In addition to small molecules, bigger molecules as peptides showing cholinesterase inhibitory activity have been obtained from different sources. Therapeutic peptides are gaining more and more attention within the drug market, with a current market share of 5%.

In this work, rational design and synthesis techniques were applied to obtain new peptides with high activity as ChEIs. To this end, we started from a sequence with moderate cholinesterase inhibitory activity, the 19-mer natural peptide Hp-1935, previously isolated and identified by the working group from the frog *Boana pulchella* from the Argentine coast. Initially, a sequence-shift design strategy was applied to find the region responsible for the inhibitory activity, in order to obtain a shorter sequence to use as a base sequence in the design of substitution analogs. Peptides were synthesized by Fmoc-SPPS. By applying this strategy, the LL peptide of only 10 residues was found to retain much of the inhibitory activity of Hp-1935.

Starting from LL, a computer-guided design was implemented, by studying the AChE-peptide interaction with docking and molecular dynamics techniques, to select the target residues for substitutions. The modifications aimed at replacing aliphatic residues with aromatic ones, to include in the sequence chemical groups that are normally present in ChEIs and generate aromatic-aromatic contacts, typically stronger than aliphatic-aromatic ones. The substitution analogues were synthesized and evaluated as inhibitors *in vitro* against both AChE and BChE, by Ellman's reaction.

The results highlighted that one of the generated sequences, the W3 peptide with a Trp substitution, showed an activity almost 100 times higher than that of the base sequence against human AChE, with an IC₅₀ value of 0.99 μ M (\pm

0.02), being the most potent peptide that has been reported against cholinesterases. This sequence also inhibited BChE (IC_{50} : $15.44 \mu\text{M} \pm 0.91$). The computational modeling of its interaction with the enzyme, together with reaction kinetics studies, allowed us to determine that its region of interaction, like the other peptides in this series, is the PAS. Another derivative (W3W7) with two Trp substitutions showed significant activity values against AChE and BChE (IC_{50} -AChE: $1.70 \mu\text{M} \pm 0.05$; IC_{50} -BChE: $9.40 \mu\text{M} \pm 0.48$). These findings indicate that the design strategy was effective in increasing base sequence activity.

The developed compounds were also evaluated for their biological activity against other AD targets. Some of the analogues, particularly those containing Trp, showed good antioxidant and iron(II) chelating potential. The W3W7 derivative had the highest antioxidant activity against DPPH radicals with an EC_{50} value of $27.58 \mu\text{M} \pm 8.74$, which places it among the most antioxidant peptides that have been reported. W3 was also antioxidant (EC_{50} : $78.31 \mu\text{M} \pm 18.18$). Furthermore, for the latter, its inhibitory effect on A β aggregation induced by AChE was evaluated with the thioflavin T method. It was found that this peptide is highly active *in vitro* against the fibrillation process, as it was capable of inhibiting $94.2\% \pm 1.2$ of A β aggregation after 8 hours. These findings emphasize the interest in this sequence by demonstrating its potential as a simultaneously active agent on various pathophysiological pathways that trigger AD symptoms.

Finally, the toxic potential of the sequences was evaluated with hemolysis tests, *in vivo* toxicity against *Artemia salina* and *in silico* toxicity prediction. Notably, no overall elevated toxicity was found in these sequences and the W3 peptide, specifically, showed hemolytic activity at concentrations much higher than its active concentration.

AD is a pathology that is rapidly growing and has a complex etiology that requires modern treatment methods. The results obtained in this doctoral thesis expose a rational peptide design scheme, which was widely successful in increasing inhibitory activity. These advances could pave the way for the development of new therapeutic approaches to address AD. The W3 sequence and other derivatives obtained are considered excellent base sequences for the development of new drugs.

INTRODUCCIÓN

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Enfermedad de Alzheimer

1.1.1. Un reto para la salud pública

La demencia es un síndrome caracterizado por el deterioro de la función cognitiva, crónico y progresivo, que trasciende lo que se considera un envejecimiento normal (Irwin et al., 2018). La forma más común de demencia es la Enfermedad de Alzheimer (EA), que representa entre un 60 y un 80% de los casos a nivel mundial. Se estima que los casos de EA y otras demencias alcanzaron los 55 millones de personas a nivel global, de las cuales el 60% vive en países de bajos recursos. Cada año se registran 10 millones de nuevos casos y entre un 5% y un 8% de las personas mayores de 60 años sufren esta enfermedad en algún momento (WHO, 2023).

Las proyecciones sobre la prevalencia global de EA y otras demencias realizadas en el marco del proyecto de la Carga Mundial de Morbimortalidad (del inglés, *Global Burden of Disease* o GBD), estiman que habrá 152,8 millones de casos (IC95%: 130,8 - 175,9) en 2050, con una mayor prevalencia para el sexo femenino y en poblaciones de bajos recursos. Para la Argentina, específicamente, este estudio estima que en 2019 hubo 412 268 casos (IC95%: 354 720 - 473 783) que aumentarán a 892 180 (IC95%: 726 352 - 1 078 782) para el año 2050, es decir un 116 % (IC95%: 89 - 147) (GBD, 2022). En la Figura 1 se muestra la evolución de los casos de EA en las últimas décadas y la proyección realizada por el estudio GBD.

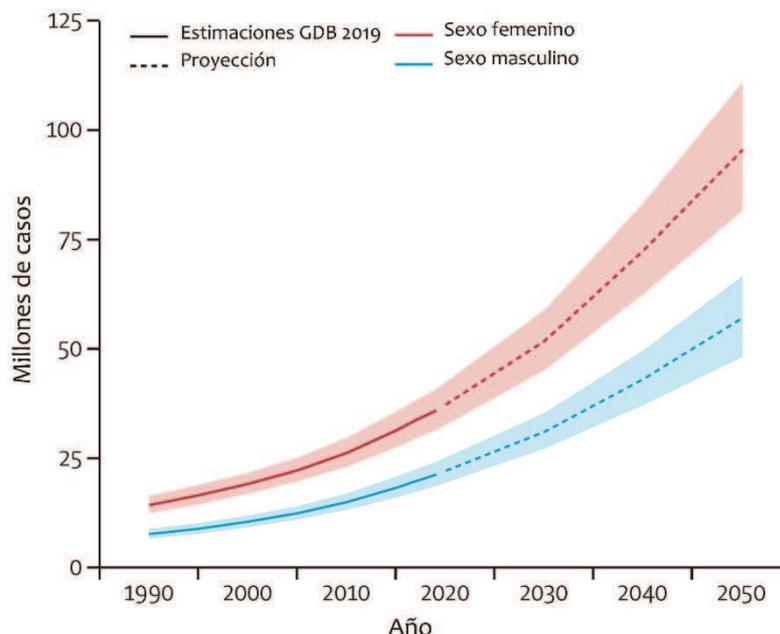


Figura 1: Tendencia estimada de la prevalencia global de demencia por año según sexo, con intervalos de confianza del 95 %, período 2019–2050. Fuente: adaptado de GBD, 2022.

El aumento en el número de casos tendrá importantes implicancias sociales y económicas, incluyendo costos médicos y sociales directos y costos indirectos relacionados con la atención fuera de las instituciones. En 2019, solamente el costo social total a nivel mundial se estimó en US\$ 1,3 billones, lo que equivale al 1,1 % del PBI global, pudiendo ascender a US\$ 2,8 billones para 2030 (Shin, 2022).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la demencia como una prioridad de salud pública. En su informe publicado en 2012, titulado *Dementia: a public health priority*, la OMS busca proporcionar información y aumentar la conciencia sobre este problema. Además, en mayo de 2017, la Asamblea Mundial de la Salud respaldó el Plan de acción mundial sobre la respuesta de salud pública a la demencia 2017-2025 (Cahill, 2020).

Los síntomas principales de la enfermedad de Alzheimer incluyen la pérdida de memoria y de funciones cognitivas, como los cambios en el comportamiento, deterioro de la integridad individual, alucinaciones y pérdida de habilidades para hablar y escribir (Li et al., 2014).

1.1.2. Fisiopatología

Este trastorno neurodegenerativo se caracteriza por la formación de acumulaciones anormales conocidas como placas seniles, compuestas por agregados de péptido β -amiloide ($A\beta$), y ovillos de proteína tau hiperfosforilada (Serrano-Pozo et al., 2011). Si bien ambos se utilizan como indicadores patológicos de la EA, los más característicos son los depósitos de péptido $A\beta$, que se consideran el principal agente neurodegenerativo de la enfermedad, a través de múltiples mecanismos de toxicidad (Carrillo-Mora et al., 2014). Por muchos años se consideró a los depósitos de tau y $A\beta$ como específicos de la EA, pero en los últimos años se ha reportado la presencia de estas especies insolubles en el cerebro de pacientes con otros trastornos neurodegenerativos como la Enfermedad de Parkinson (EP), que es la segunda causa de demencia más importante (Chin et al., 2020). Los depósitos de péptido $A\beta$, además, se vincularon con un deterioro cognitivo en la EP (Lim et al., 2019; Zhang et al., 2018).

La composición principal de las placas seniles son depósitos extracelulares de $A\beta$, péptido de 39-43 aminoácidos que se deriva del procesamiento proteolítico de una proteína integral de membrana llamada proteína precursora amiloidea (APP, del inglés *amyloid precursor protein*). Aunque la función de la APP aún no se comprende por completo, se ha elucidado el proceso enzimático responsable de su metabolismo amiloidogénico en los últimos años (O'Brien y Wong, 2011). La APP es clivada secuencialmente por dos endoproteasas, la β -secretasa y la γ -secretasa. La β -secretasa primero cliva la APP, liberando un fragmento largo y dejando un fragmento de 99 aminoácidos en la membrana (llamado CTF β), que luego es clivado rápidamente por la γ -secretasa, generando el péptido $A\beta$ (Sun et al., 2015). Debido a su naturaleza hidrofóbica e insoluble, el $A\beta$ se agrega y forma las placas seniles. Se muestra un esquema del proceso enzimático en la Figura 2.

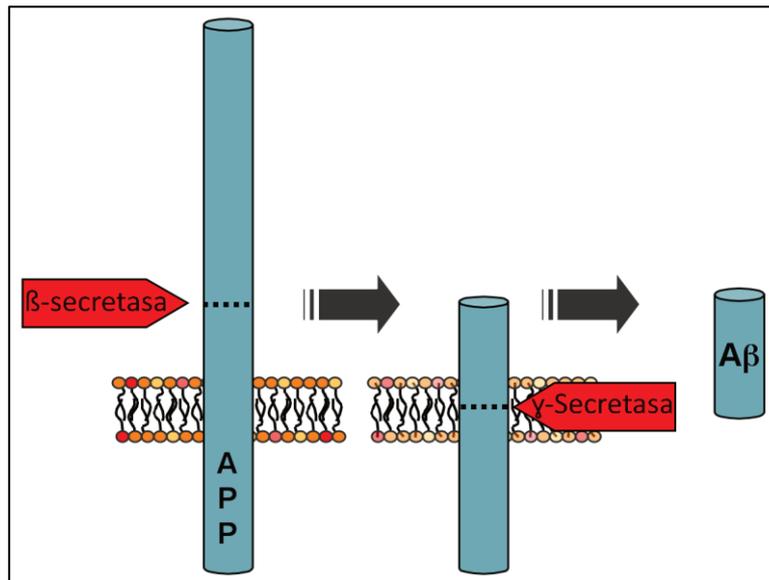


Figura 2: Esquema del proceso enzimático de liberación extracelular del péptido A β .

La γ -secretasa a menudo realiza un corte impreciso, lo que resulta en heterogeneidad en el extremo C-terminal del A β . Por esta razón, existen varias especies de péptido A β , pero las más abundantes son la que terminan en la posición 40 (A β_{40} , DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV), que representa aproximadamente el 80-90% del total, seguida por la que termina en la posición 42 (A β_{42}), que agrega los residuos -IA en el C-terminal y representa aproximadamente entre el 5% y el 10%. Esta última especie es especialmente hidrofóbica y fibrogénica y es componente mayoritario de las fibrillas amiloides cerebrales (Zhao et al., 2020).

La investigación ha demostrado que las placas seniles son tóxicas para las neuronas y pueden interferir con una variedad de procesos celulares, como la interrupción de la comunicación neuronal, generación de una respuesta inflamatoria en el cerebro, aumento del estrés oxidativo o la disfunción mitocondrial. En conjunto, estos efectos tóxicos contribuyen al deterioro progresivo de las funciones cognitivas y al daño neuronal característico de la EA (Reiss et al., 2018).

Por otra parte, la hiperfosforilación de la proteína tau, una proteína asociada a los microtúbulos esencial para la estabilidad del esqueleto neuronal,

provoca su agregación en filamentos neuronales, que forman los ovillos neurofibrilares o NFTs (del inglés, *neurofibrillary tangles*). Estos depósitos se van acumulando en la materia blanca del cerebro, lo que afecta la red sináptica y ocasiona un mayor daño neuronal (Gendreau y Hall, 2013). Aunque el factor desencadenante de este proceso aún no se conoce, una de las teorías más respaldadas sugiere una disfunción lisosomal como posible causa (Funk y Kuret, 2012).

1.1.3. Etiología y tratamiento

La idea de que los daños neuronales y los problemas relacionados con la EA puedan ser causados por una mayor liberación o menor degradación del péptido A β y la consiguiente formación de placas seniles se planteó en 1992 y se conoce como "Hipótesis de la cascada amiloidea" (Hampel et al., 2021). Esta hipótesis surgió después de descubrir mutaciones raras en los genes de la APP en familiares con la enfermedad (Kametani y Hasegawa, 2018). Sin embargo, esta idea ha sido objeto de reformulación y críticas, ya que no se ha encontrado una relación clara entre la formación de placas seniles y los ovillos neurofibrilares, y se ha observado la presencia de placas seniles en personas sin síntomas de Alzheimer o problemas de memoria (Jagust, 2016). De hecho, aún no se utilizan para terapia fármacos que actúen directamente inhibiendo la deposición del péptido A β o eliminando sus agregados para su tratamiento, aunque dichos fármacos, que podrían actuar como terapias modificadoras de la enfermedad, están siendo activamente investigados y desarrollados (Song et al., 2022).

En 2021, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos FDA (del inglés, *U.S. Food and Drug Administration*) aprobó, bajo la vía de aprobación acelerada, el uso del anticuerpo monoclonal (Aducanumab) que se une específicamente a los agregados de A β pero su uso sigue siendo controvertido ya que la FDA sugirió realizar más ensayos clínicos para evaluar sus beneficios (Liu et al., 2022) debido al rechazo de la Agencia Europea de Medicamentos que llevó al retiro de la solicitud de autorización de comercialización en Europa. De todas formas, la aprobación de esta terapia por parte de la FDA agudizó el interés por los compuestos anti- A β . En 2022, se

obtuvieron también resultados positivos de estudios clínicos de fase II del anticuerpo monoclonal dirigido contra A β donanemab (Gueorguieva 2023) y, recientemente, en julio de 2023, la FDA aprobó, esta vez bajo la vía tradicional, el anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado lecanemab luego de los resultados de un ensayo clínico controlado y aleatorizado de fase III (FDA, 2023; Reardon, 2023). Este compuesto se une con gran afinidad a las protofibrillas solubles A β para retrasar el avance de la enfermedad en pacientes tempranos (van Dyck et al., 2023). Sin embargo, la magnitud del efecto clínico provocado tanto por donanemab como por lecanemab es limitada, por lo que se propone el uso de estas drogas en combinación con otras, empleando una terapia multiobjetivo (Melchiorri et al., 2023).

La otra hipótesis principal sobre la causa original de la EA es la "Hipótesis colinérgica", que ha sido la base para el desarrollo de los medicamentos actualmente usados para tratamiento. Esta teoría sugiere que la pérdida de actividad colinérgica, es decir, bajos niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en el espacio sináptico encontrados en las personas con EA, son el factor primario de las anomalías asociadas (Chen et al., 2022).

La ACh es un neurotransmisor excitador ampliamente presente en el sistema nervioso central y periférico. Se trata de un éster de acetil coenzima A (acetil-CoA) y colina con fórmula química $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Se sintetiza mediante la acción de una enzima llamada colina acetiltransferasa (CAT). La acción de la ACh a través de los receptores neuronales nicotínicos y muscarínicos es fundamental en procesos como la activación, el ciclo sueño-vigilia, la atención, el aprendizaje y la memoria (Ferreira-Vieira et al., 2016). Por lo tanto, la regulación de los niveles de ACh en el espacio sináptico es crucial para el buen funcionamiento del sistema nervioso.

Los niveles de ACh, a su vez, dependen en gran medida de la acción de las enzimas colinesterasas (acetilcolinesterasa: AChE, EC 3.1.1.7 y butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa: BChE, EC 3.1.1.8), capaces de catalizar la reacción de hidrólisis de la ACh en colina y ácido acético, y así inactivarla luego de su liberación evitando un exceso de estimulación colinérgica

(Anand y Singh, 2013). Un esquema del ciclo de la ACh en el espacio sináptico se muestra en Figura 3.

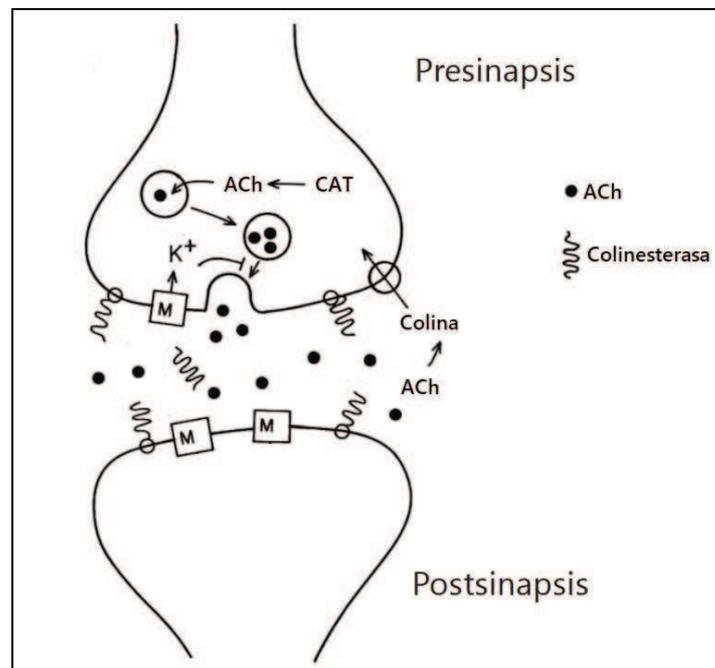


Figura 3: Esquema de una sinapsis colinérgica. Adaptado de Sánchez-Chávez y Salceda (2008)

En las personas afectadas por EA, se observa una actividad anormal de estas enzimas, lo que causa un descenso de los niveles fisiológicos de ACh (Rinne et al., 2003). Por este motivo, el desarrollo farmacológico de drogas para el tratamiento de esta enfermedad se ha enfocado, desde el surgimiento de la “Hipótesis colinérgica”, en obtener fármacos capaces de aumentar los niveles de ACh de los pacientes. En este sentido, son muy importantes los compuestos capaces de disminuir la acción de hidrólisis de ACh de las colinesterasas, es decir, los inhibidores de estas enzimas (Hampel et al., 2021; Marucci et al., 2021; Pérez-Gómez Moreta et al., 2021).

Hasta la reciente mencionada aprobación de anticuerpos monoclonales para tratar la EA, había sólo cuatro fármacos en uso para tratar la EA, de los cuales tres son inhibidores de las colinesterasas (IChEs). Estos son el donepezilo, la galantamina y la rivastigmina. Otro es la memantina, que actúa por un mecanismo de bloqueo de los receptores de glutamato, neurotransmisor involucrado en procesos de aprendizaje y memoria. Estos fármacos logran una

mejora paliativa del problema, por lo que no curan la enfermedad, que por el momento sigue siendo incurable (Tan et al., 2014).

Si bien aún no se utilizan medicamentos para la EA que actúen por otras de las vías mencionadas, se están llevando a cabo otros enfoques para el descubrimiento de una posible cura. De manera similar a la acción frente a la agregación del péptido A β , se están desarrollando drogas que inhiben la formación de los ovillos de proteína tau (Soeda & Takashima, 2020). Además, se ha propuesto el uso de inhibidores enzimáticos (IEs) que actúen frente a enzimas distintas de las colinesterasas, como las fosfodiesterasas, la monoamina oxidasa o la β secretasa (Sandersa & Rajagopalb, 2020; Behl et al., 2021; Yan & Vassar, 2014).

Otra estrategia se basa en el uso de compuestos con actividad antioxidante (Sinyor et al., 2020). Ésta se define como la capacidad de neutralizar las especies reactivas del oxígeno, cuya sobreproducción en el organismo puede causar daños oxidativos irreversibles a las biomoléculas involucradas en procesos de señalización. La disrupción de esos procesos y la acumulación de las moléculas oxidadas han sido vinculados tanto con la EA como con otros trastornos neurodegenerativos (Morén et al., 2022). Diversos estudios muestran como las placas seniles resultan ser focos de producción y liberación de radicales libres en el espacio cerebral (Cheignon et al., 2018). Bajo el mismo enfoque se estudia el empleo de compuestos con actividad quelante de iones metálicos, es decir compuestos que pueden unirse a estos iones y facilitar su eliminación. En el cerebro de pacientes con EA se genera un desequilibrio en la homeostasis de metales de transición, principalmente cobre (Cu), zinc (Zn) y hierro (Fe), que pueden interactuar con las fibrillas de péptido A β y con la APP, acelerando la formación de las placas seniles (Lakey-Beitia et al., 2021). Los compuestos quelantes pueden prevenir la acumulación de estos metales en el cerebro. En la actualidad hay compuestos con actividad antioxidante y quelante en las fases II y III de desarrollo de drogas (Cummings et al., 2022).

Los enfoques de tratamiento mencionados hasta ahora son los principales, aunque hay varios otros en estudio. Por ejemplo, también se encuentran en fases avanzadas de desarrollo de fármacos compuestos que se

dirigen hacia procesos inflamatorios, de neurogénesis o vascularización, entre otros (Cummins et al., 2022). La estrategia actualmente recomendada consiste en un tratamiento combinado mediante el uso de múltiples medicamentos al mismo tiempo. Sin embargo, dado que el uso de múltiples drogas al mismo tiempo puede ser contraproducente, principalmente debido a problemas de resistencia y efectos cruzados, se ha destacado el estudio de compuestos únicos que tengan una actividad multiobjetivo (del inglés, *multitarget*), especialmente útiles para enfermedades multifactoriales como la EA (Benek et al., 2020; Oset-Gasque y Marco-Contelles, 2018).

Si bien el concepto de drogas polifarmacológicas se ha expandido en las últimas décadas, no se trata de algo nuevo (Kabir y Muth, 2022). Se ha descubierto que el efecto de muchas drogas utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades, especialmente en el caso de los fármacos de origen natural, es en realidad multiobjetivo luego de estudiarlas a largo plazo. Por ejemplo, se ha demostrado que la aspirina tiene diversos mecanismos de acción además de la inhibición de la ciclooxigenasa (Koerberle y Werz, 2014). Algunas categorías terapéuticas, como los medicamentos para trastornos del estado de ánimo, son especialmente ricas en ejemplos clásicos de fármacos que actúan sobre múltiples objetivos (Talevi, 2004).

Finalmente, un grupo distinto de estrategias para el tratamiento de pacientes con EA, con particular crecimiento en los últimos años, es el grupo de intervenciones no farmacológicas que son comúnmente combinadas con las estrategias basadas en medicamentos. Se ha demostrado que cambios en el estilo de vida como la dieta y el ejercicio, también pueden desempeñar un papel importante en el tratamiento de las enfermedades multifactoriales y en especial en la EA, aunque aún se carece de evidencia de alta calidad para poder demostrarlo (Wang et al., 2020). Estos enfoques suelen depender de profesionales de distintas áreas de estudio, cada uno buscando impactar de forma positiva en la cognición, el estado de ánimo y otros síntomas conductuales y psicológicos de la demencia.

1.1.4. Ensayos para determinar actividades de interés en la EA

El descubrimiento de nuevos compuestos que posean una o varias de las actividades de interés mencionadas, especialmente en las fases iniciales de estudio, se ve facilitado por la disponibilidad de técnicas rápidas y robustas para detectar dicha característica. En este sentido, se emplean ampliamente técnicas *in vitro* con las cuales, en general, se evalúa el efecto de la exposición del blanco molecular, o algún subrogado del mismo, al compuesto de interés (Hughes et al., 2011).

Reacción de Ellman

Para caracterizar la actividad inhibitoria de IChEs, la técnica *in vitro* más utilizada es la reacción de Ellman. Esta técnica fue desarrollada en 1958 y propuesta como método para la detección de mercaptanos y, en general, de compuestos conteniendo grupos sulfhidrilo o tiol con alta sensibilidad (Ellman, 1958). Se basa en la reacción del reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB) con grupo tiol para formar un compuesto de color amarillo, el ión 5-tio-2-nitrobenzoato o TNB^{2-} , mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), esquematizado en Figura 4. El ión TNB^{2-} tiene un máximo de absorción a 412 nm con un coeficiente de extinción molar muy elevado (en el orden de $12500 - 14300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 412 nm, dependiendo del solvente), que determina la alta sensibilidad de esta técnica (Riddles et al., 1983).

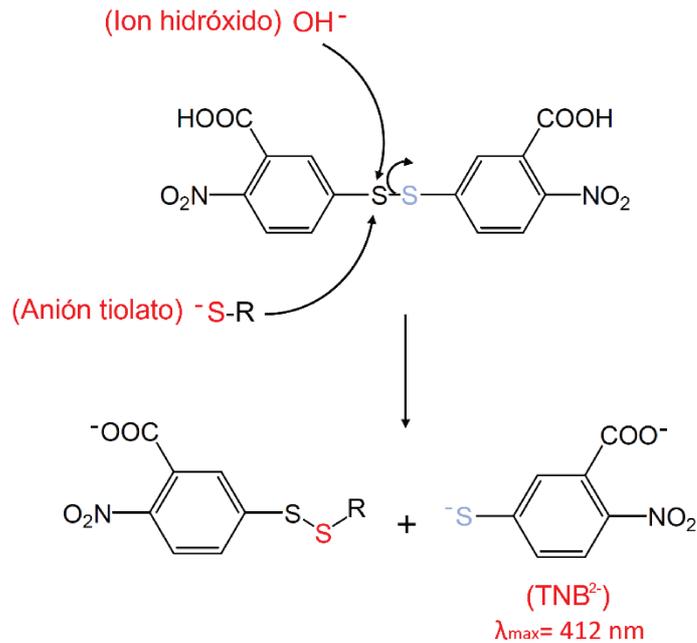


Figura 4: Mecanismo de la reacción de Ellman entre el DTNB y un grupo tiolato. Adaptado de Scussat (2011).

Luego de su descubrimiento, se propuso el uso del reactivo de Ellman para medir la actividad de las colinesterasas, utilizando como sustrato un sustituto de la ACh, la acetiltiocolina (AtCh) (Ellman et al., 1961). Este tioéster es hidrolizado rápidamente por las colinesterasas, liberando acetato y tiocolina que, en presencia de DTNB, reacciona para formar el TNB $^{2-}$. La medición de la formación de color en un medio de reacción conteniente AChE o BChE, AtCh y DTNB es indicativo de la actividad catalítica de la enzima, y puede ser utilizado para estudiar la actividad inhibitoria de compuestos que se incluyan en el medio de reacción. Un esquema de la reacción de Ellman aplicada al estudio de la actividad de las colinesterasas se muestra en Figura 5.

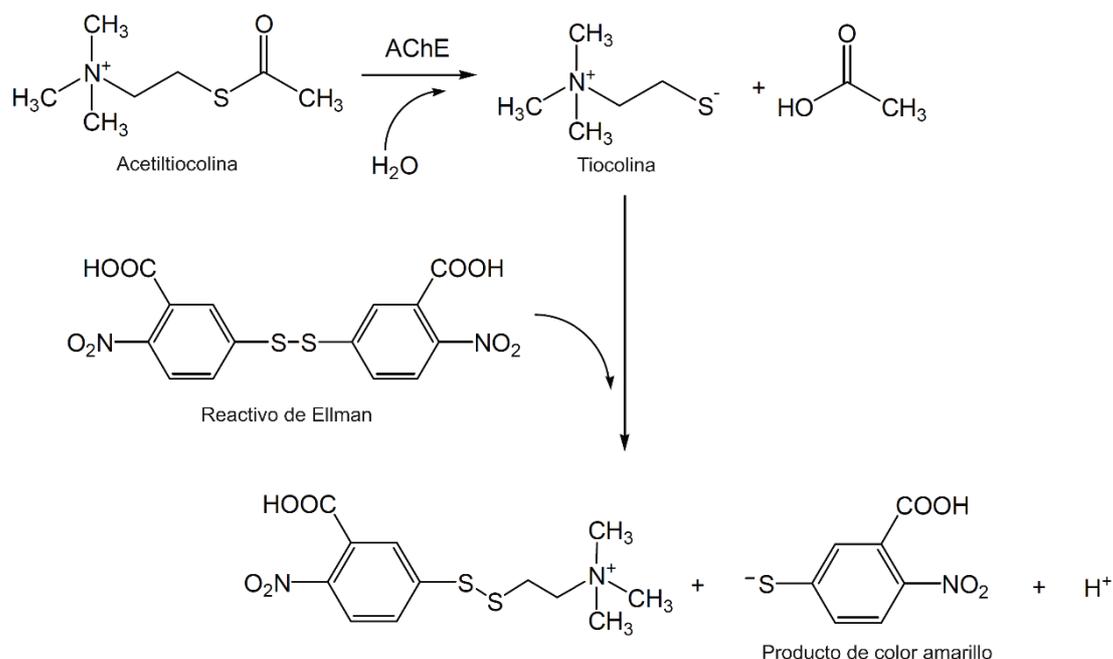


Figura 5: Esquema de la reacción de Ellman aplicada a la medición de la actividad catalítica de la AChE. Fuente: adaptado de Matějovský et al., 2018.

Otras reacciones

Para evaluar los compuestos frente a otras actividades de interés en el tratamiento de la EA, como ser el estudio de la inhibición del péptido A β , actividad antioxidante o quelante, también se desarrollaron y optimizaron técnicas de fácil realización *in vitro*.

Para el estudio de la agregación del péptido A β en presencia y ausencia de un compuesto se puede utilizar el ensayo de la ThT (tioflavina T) (Xue et al., 2017). La ThT es un colorante fluorescente que exhibe fluorescencia aumentada en torno a 475 nm al unirse a estructuras ricas en láminas β , como las observadas en agregados amiloides como las fibrillas de péptido A β (Biancalana & Koide, 2010). La técnica consiste en generar un proceso de agregación a partir de monómeros de A β en solución acuosa, que puede favorecerse empleando condiciones de concentración de sales y pH específicas, y comparando soluciones en ausencia y presencia del compuesto a evaluar (Mikalauskaite et al., 2020). Luego de un tiempo fijado, se agrega una solución de ThT y se mide la fluorescencia, teniendo en cuenta que una mayor fluorescencia indica un mayor grado de agregación del amiloide. Normalmente, se realizan reacciones

a distintos tiempos dado que el proceso de agregación puede demandar varias horas. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de dos reacciones en las que el agregado de ThT al medio y la medición de la fluorescencia se realizaron al momento de disolver el monómero (0 h de reacción) y luego de 24 h de reacción. Se observa la aumentada fluorescencia que produce la interacción de la ThT con los agregados de péptido A β que se forman durante el tiempo de incubación.

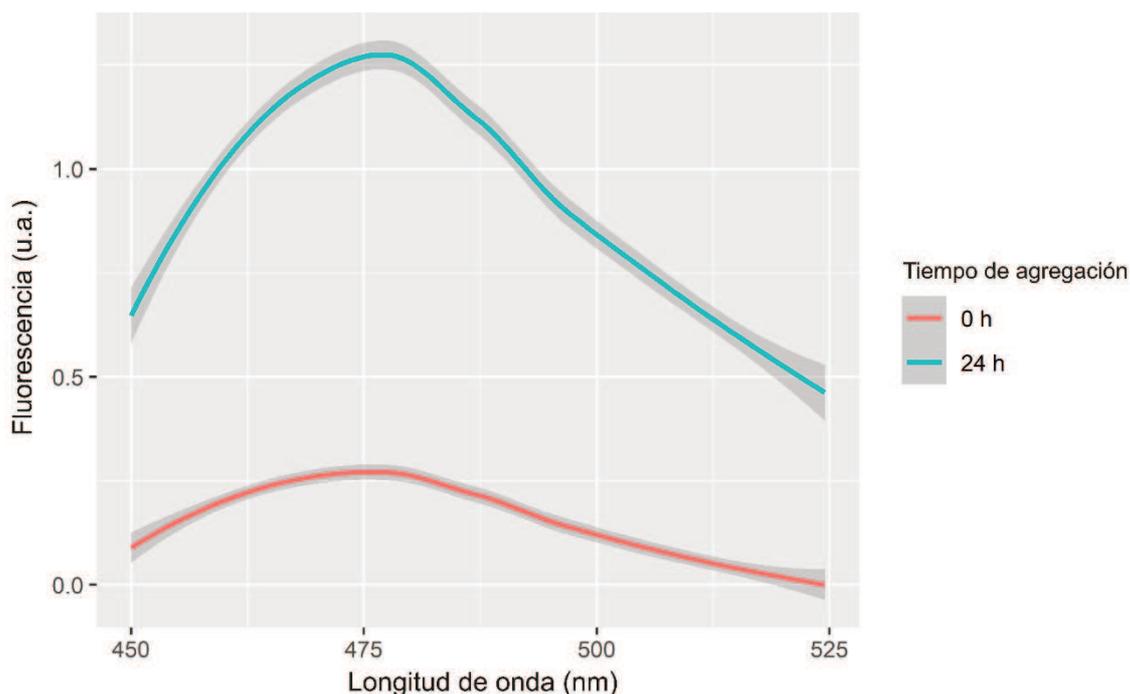


Figura 6: Detección de la formación de fibrillas de A β mediante fluorescencia de ThT después de 0 y 24 horas de incubación. Las líneas sólidas representan la media y las bandas grises representan el desvío estándar del 95% (n = 3). Adaptado de Sanchis et al., 2023.

Esta reacción puede realizarse también en presencia de AChE, cuyas funciones no catalíticas favorecen la agregación del péptido A β , permitiendo, para algunas variantes de la enzima, reducir los tiempos para la medición fluorimétrica. Esta variante del ensayo se utiliza actualmente para, en presencia de inhibidores, medir la inhibición de la agregación del péptido A β inducida por AChE, con tiempos de reacción de 3-8 h (Chen et al. 2014).

Para otras propiedades de interés como la actividad antioxidante o quelante existen una variedad de métodos que pueden ser utilizados. Para estimar el potencial antioxidante de un compuesto, se puede estudiar su capacidad de neutralizar un radical libre, es decir una especie molecular capaz

de existir de forma independiente y que contiene un electrón desapareado en un orbital atómico (Lobo et al., 2010). Dado que se trata de especies altamente inestables, lo que determina su alta reactividad y toxicidad, son pocos los radicales libres que pueden aislarse y comercializarse bajo esa forma. Un caso es el del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), molécula modelo más empleada en el descubrimiento de nuevos antioxidantes (Akar et al., 2017). Este radical libre es de color violeta intenso con un máximo de absorción a 520 nm, mientras su forma no radicalaria es de color amarillo pálido. Al exponer una solución de DPPH a un compuesto capaz de ceder un átomo de hidrógeno para neutralizarlo, se puede medir su actividad antioxidante frente a DPPH mediante la medición espectrofotométrica del cambio de color de la solución. En la Figura 7 se muestra la estructura del DPPH en su forma radicalaria, en su forma neutralizada y sus respectivos espectros de absorción (Lobo et al., 2010).

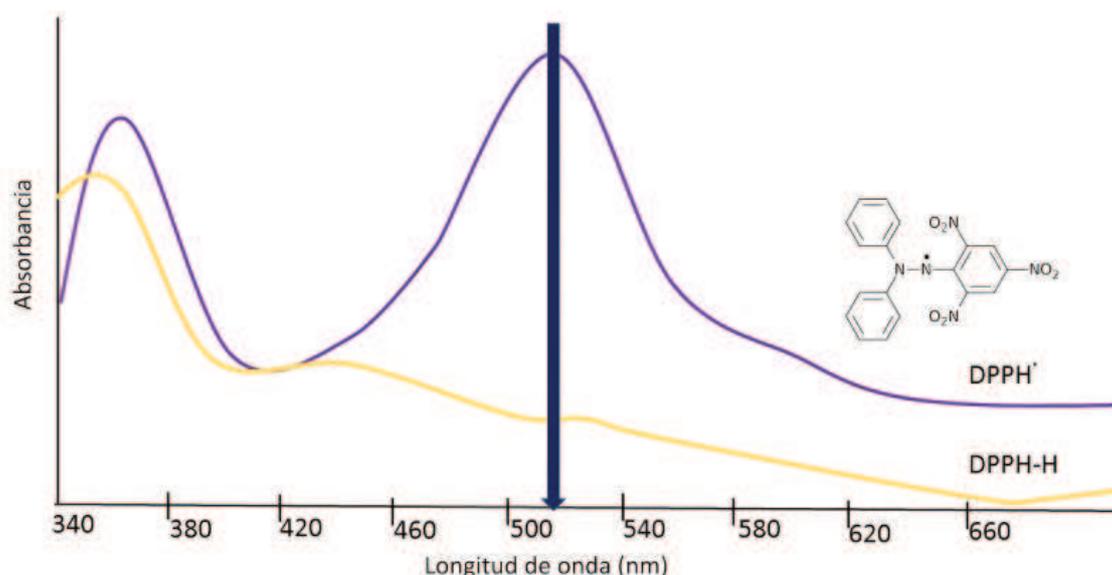


Figura 7: Espectros de absorción del DPPH en su forma radicalaria y en su forma neutralizada (DPPH-H). Adaptado de Kleinrichert & Alappat, 2019.

Para estudios específicos en la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante, se suelen realizar varias pruebas distintas para caracterizar la actividad. Además de la prueba frente a DPPH, son muy empleadas las técnicas de ABTS⁺ (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y del peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La primera, utiliza el radical catiónico ABTS⁺ que, de forma similar al DPPH, tiene un color azul intenso en la forma radicalaria y se decolora

al ser neutralizado. En la prueba del H_2O_2 , en cambio, se evalúa una reducción en la concentración de H_2O_2 en una solución que contiene el compuesto a evaluar. La medición se realiza a 230 nm, longitud de onda del H_2O_2 (Alam et al., 2013).

La actividad quelante de un compuesto de interés también puede ser determinada mediante una variedad de técnicas. Un ejemplo de técnica ampliamente empleada es la que utiliza la ferrocina, un compuesto organometálico que forma un complejo con iones de hierro ferroso, de color rojo. En una solución con iones Fe(II) , la presencia de un agente quelante puede competir con la ferrocina en la formación del complejo rojo. La medición de la absorbancia en torno a los 562 nm con soluciones en presencia y ausencia del quelante evaluado permite estimar su actividad (Sarkar et al., 2012).

1.2. Las colinesterasas

1.2.1. Características

En la sección anterior se explicó la importancia de las enzimas colinesterasas y de sus inhibidores para el tratamiento de la EA, ya que representan la estrategia más utilizada. El diseño y desarrollo de nuevos compuestos implica conocer a fondo las características de estas enzimas clave para el funcionamiento sináptico.

Las colinesterasas pertenecen al grupo de enzimas hidrolasas, específicamente a la subclase de las esterasas. Estas enzimas están especializadas en la hidrólisis de los ésteres de colina, siendo la AChE y la BChE los subtipos más abundantes y estudiados (Pope y Brimijoin, col., 2018).

La AChE es la colinesterasa principal del cerebro, ya que se encuentra en el sistema nervioso y en las uniones neuromusculares, donde regula los niveles de ACh, mientras que la BChE se sintetiza en el hígado y se encuentra en varios tejidos en todo el cuerpo, incluyendo el hígado, el plasma y el cerebro (Pohanka, 2011). La BChE también descompone la ACh, pero tiene menor especificidad de respecto a la AChE, lo que significa que puede descomponer una gama más

amplia de ésteres de colina además de la ACh. La BChE se ha implicado en una serie de procesos fisiológicos, incluyendo el metabolismo de drogas y toxinas, la regulación de la presión arterial y la inflamación. Se considera que actúa como un biodepurador endógeno en la primera línea de defensa contra compuestos tóxicos exógenos como la procaína, la succinilcolina, la cocaína, heronía, ácido acetilsalicílico y proteger al organismo del impacto de venenos (Jasiecki & Wasąg, 2019).

La AChE y la BChE humanas tienen una identidad en su composición aminoacídica del 54% (Shenouda et al., 2009). Ambas se encuentran predominantemente como tetrámeros, pero son comunes sus formas diméricas y monoméricas. El monómero de la AChE tiene un peso molecular de 69 kDa, es soluble y se expresa predominantemente en ciertas sinapsis durante condiciones asociadas a estrés y algunas neuropatologías (Pohanka, 2011; Meshorer y Soreq, 2006).

Los medicamentos actualmente aprobados que inhiben las colinesterasas (donepezilo, rivastigmina y galantamina) se dirigen principalmente a la AChE, ya que es la enzima más prevalente en el sistema nervioso central, donde la BChE representa sólo cerca del 20% de la degradación total de ACh. Sin embargo, ha surgido un gran interés en la investigación de fármacos para la EA que actúen de manera dual, es decir, inhibiendo simultáneamente tanto la AChE como la BChE. Esto se debe a que se ha observado que la actividad de la BChE aumenta hasta un 165% a medida que progresa la enfermedad, y existe una fuerte correlación entre la actividad de BChE y la acumulación anormal de A β (Zhou y Huang, 2022; Zhou et al., 2019).

1.2.2. Actividad hidrolítica de ACh

Las colinesterasas son enzimas extremadamente eficientes y están entre las más rápidas que se conocen. La velocidad de hidrólisis de ACh por parte de la AChE se acerca al límite máximo permitido por la difusión de las moléculas, pudiendo hidrolizar 25 000 moléculas por segundo, con una eficiencia catalítica $k_{cat}/K_M = 2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fuxreiter y Warshel, 2009). Esta eficiencia se relaciona con la especial configuración de su sitio activo, que está localizado dentro de una

cavidad estrecha y profunda llamada garganta (del inglés, *gorge*), rodeada por residuos aromáticos que guían el sustrato hacia el centro activo, formado por una triada catalítica de serina, histidina y glutamato. La isoforma humana de la AChE (hAChE) consiste en 12 láminas β centrales rodeadas por 14 α -hélices. El *gorge* dista 20 Å de la superficie y se compone de un subsitio “esteárico” (sitio aniónico catalítico o CAS, del inglés *catalytic anionic site*) que incluye la triada catalítica (Ser203, His447 y Glu334) y un subsitio aniónico formado por Glu202, Trp86 y Tyr337, capaz de orientar correctamente la ACh para su hidrólisis por interacción con el grupo trimetilamonio (Kua et al., 2003).

El mecanismo de reacción fue determinado gracias a simulaciones *ab initio* de QM/MM (Zhou et al., 2010). Se trata de un proceso en dos etapas: acilación y desacilación. Durante la acilación, el átomo de oxígeno de Ser203 de la AChE realiza un ataque nucleofílico al carbono carbonílico de la ACh, generándose así un intermediario tetraédrico estabilizado mediante puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas con el Glu334. Simultáneamente, se transfiere un protón de la Ser203 a la His447. Luego se transfiere un segundo protón hacia el grupo saliente de la ACh, resultando en la ruptura del enlace y la liberación de colina. La desacilación también ocurre en dos etapas. La primera implica la interacción entre una molécula de agua y el carbono carbonílico del grupo acetilo en la ACh. Se forma un segundo intermediario tetraédrico estabilizado por la participación de los residuos Gly121, Gly122 y Ala204 (sitio denominado "agujero de oxianión"). Luego, se transfiere un protón de His447 al átomo de oxígeno del grupo acetil-Ser, lo que resulta en la formación de los productos ácido acético y AChE. Dado que la barrera de energía libre inicial de la desacilación (17,5 kcal/mol) es mayor que la de la acilación, este es el paso limitante para la velocidad de reacción. Esto marca una diferencia con la reacción catalizada por la BChE frente a ACh, ya que para esa reacción se calculó una barrera energética mayor para la etapa de acilación (13,8 kcal/mol) frente a la de desacilación (11,9 kcal/mol) (Boer et al., 2010). Un esquema del mecanismo de reacción se muestra en Figura 8.

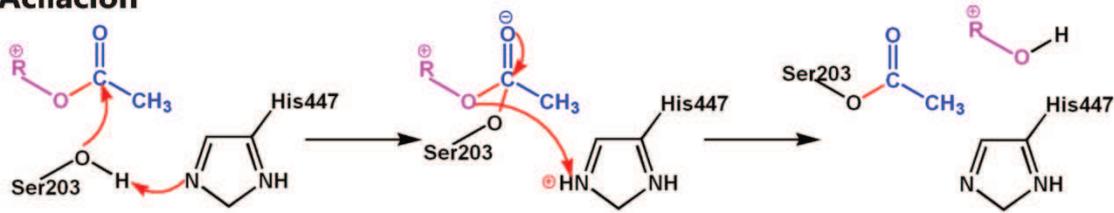
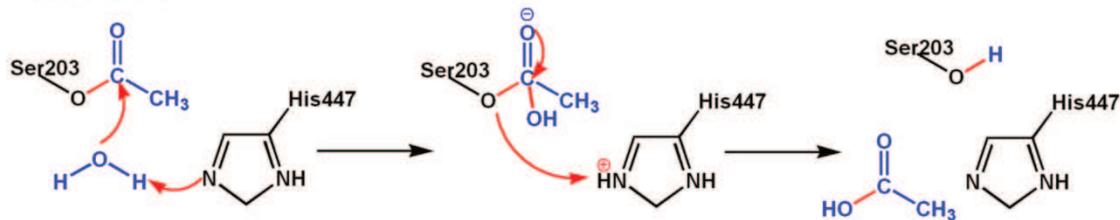
Acilación**Desacilación**

Figura 8: Mecanismo de reacción de la hidrólisis de ACh catalizada por hAChE. Adaptado de Zhou et al., 2010.

1.2.3. Funciones no colinérgicas

Si bien la participación del sitio CAS y del subsitio aniónico en el proceso de hidrólisis han sido determinadas en detalle, para comprender la elevada eficiencia de catálisis de las colinesterasas se debe tener en cuenta el rol de toda el área formada por el *gorge*. En éste, para la AChE, se destaca la presencia de 14 residuos aromáticos altamente conservados en las distintas isoformas, que sirve de entorno aniónico para la captación de la ACh mediante interacciones π -catión y su llegada hasta el sitio activo, como se ha explicado gracias a simulaciones de dinámica molecular (DM) (Branduardi et al., 2005). En la BChE, a pesar de su analogía estructural con la AChE, esta región es más alifática (sólo 6 de los 14 residuos son aromáticos) y más extensa, lo que le permite incorporar al *gorge* compuestos más grandes y ser más promiscua (De Boer et al., 2010).

Además, en esta región, hay un sitio particular conformado por cinco aminoácidos (aa) principalmente aromáticos (Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286 y Tyr341) en la AChE, que constituyen el Sitio Aromático Periférico (PAS, del inglés *Peripheral Aromatic Site*), cuyo estudio se ha ampliado en los últimos años. El PAS desempeña un papel crucial en la catálisis, ya que se une a la ACh

en el primer paso de la reacción, modula el proceso de manera alostérica y es susceptible de interacción con inhibidores específicos (Radić et al.,1991). Una representación de la distribución del PAS, el CAS y el subsitio aniónico en la estructura de la hAChE se muestra en Figura 9.

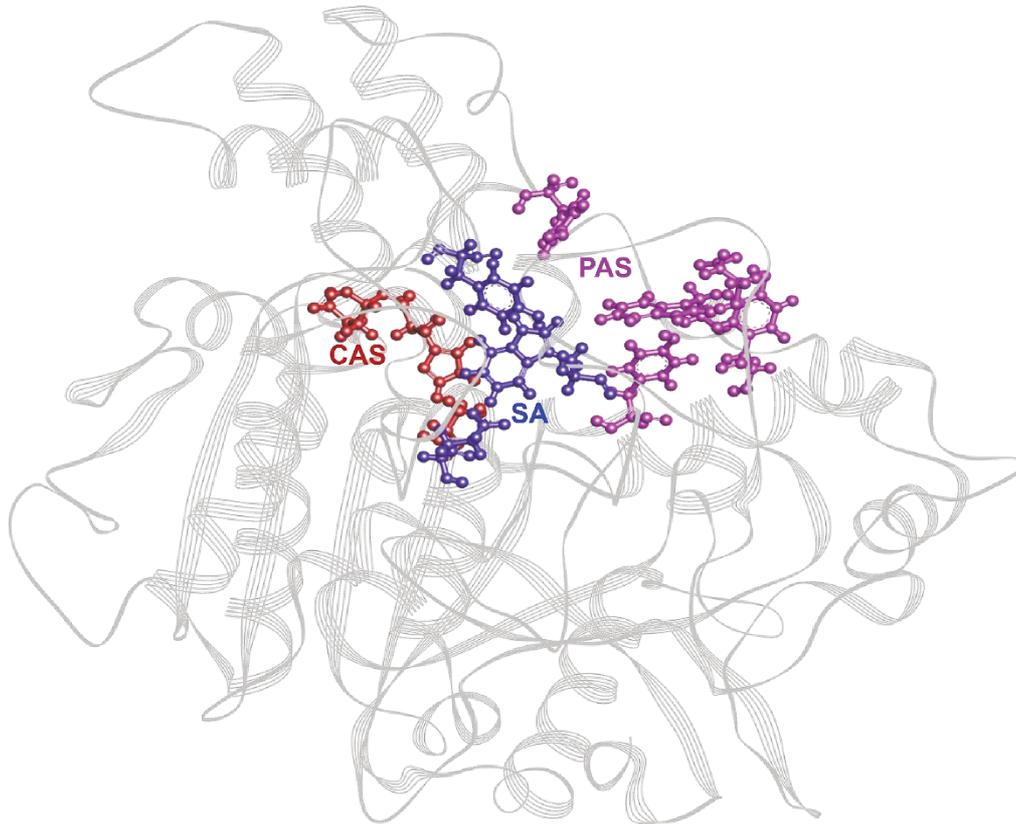


Figura 9: Esquema de la estructura de la hAChE y detalle de los residuos de la tríada catalítica (CAS, rojo), del subsitio aniónico (SA, azul) y PAS (magenta). Elaborado con el programa DS Visualizer (BIOVIA) a partir de la cadena A de la estructura de hAChE con código de acceso PDB: 4EY7 (Cheung et al., 2012).

Sin embargo, más allá de su participación en la catálisis, el PAS resulta especialmente interesante debido a su participación en los procesos no colinérgicos de la AChE. Por ejemplo, se ha observado que desempeña un papel en la adhesión celular y el crecimiento de neuritas en células neuronales en desarrollo (Muñoz et al., 1999), aunque el proceso no colinérgico principal de la AChE es su participación como chaperona estimulante de la agregación del péptido A β y formación de placas seniles en el cerebro (Carvajal e Inestrosa,

2011). En los últimos años se ha acumulado evidencia que demuestra que el PAS funciona como región de unión de A β con la AChE en este proceso (Hou et al., 2014; Subramanian et al., 2023; Johnson & Moore, 2006). Por lo tanto, se propuso que los inhibidores no competitivos o de tipo mixto que se unen al sitio PAS pueden ser especialmente beneficiosos para el tratamiento de la EA, al regular simultáneamente la actividad de la AChE y la deposición de A β , mostrando de esta manera una actividad *multitarget* (Pohanka, 2011). Estos descubrimientos han contribuido a renovar el interés por los inhibidores de las colinesterasas (Vecchio et al., 2021). Diversos inhibidores de la AChE de relevancia farmacológica como la tacrina, la huperzina A (inhibición no competitiva) y el mismo donepezilo (inhibición mixta), actúan en el sitio PAS (Harel, 1993; Raves et al., 1997).

Con respecto a la BChE, su sitio PAS está formado sólo por dos residuos (Asp70 y Tyr332 en la isoforma humana) y no se ha descrito su función biológica como en el caso de la AChE. A pesar de esto, se han reportado inhibidores duales (que actúan tanto sobre AChE como sobre BChE) con interacción mediada a través del PAS (Pourshojaeim et al., 2019).

1.2.4. Isoformas principales para el desarrollo de inhibidores

La primera estructura tridimensional de una colinesterasa que se resolvió con buen detalle atómico (2,8 Å) fue la estructura de AChE purificada a partir de los órganos eléctricos de la raya eléctrica *Tetronarce californica* (TcAChE), en 1991 (Sussman et al., 1998; Sussman et al., 1991). Esta variante ha sido de gran utilidad para avanzar en el diseño de nuevos IChEs, principalmente para evaluar las interacciones y el comportamiento dinámico de inhibidores en estudios de *docking* y DM (Xu et al., 2017). A su vez, por su alta estabilidad y bajo costo, para evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* se ha utilizado ampliamente la isoforma purificada de otro organismo eléctrico, la anguila *Electrophorus electricus* (EeAChE), principalmente en las fases iniciales del diseño farmacológico y procesos de *screening* (Ganeshpurkar et al., 2022). La AChE de organismos acuáticos eléctricos conserva una gran homología

estructural con la de los vertebrados y una identidad de secuencia acentuada en las regiones activas (PAS y CAS), mientras que las diferencias aminoacídicas se encuentran en las porciones desordenadas y *loops* (Wiesner et al., 2007).

De todas maneras, para el desarrollo farmacológico de nuevos IChEs se debe evaluar su actividad frente a las variantes humanas, ya que son el blanco terapéutico principal. Se han estudiado extensamente métodos de purificación de fuentes naturales y de expresión homóloga y heteróloga tanto para la hAChE como la hBChE, aunque los costos involucrados son mayores respecto a las variantes de organismos eléctricos (Brazzotto et al., 2017).

La purificación directa de las variantes humanas en forma funcional y estable no da buenos rendimientos debido a la baja disponibilidad de las enzimas en estas fuentes. Por este motivo, la estrategia principal es la expresión de forma recombinante en organismos con sistemas de expresión avanzados, siendo el más utilizado la expresión en líneas celulares provenientes de mamíferos. A través de la expresión en células de ovario de hámster chino (CHO) se obtuvieron hasta 5 mg de enzima por litro de cultivo (Nachon et al., 2002). Buenos rendimientos se lograron también con la expresión en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) y células de mono (COS) (Kronman et al., 1992; Duval et al., 1992). Además, se ha reportado la expresión de colinesterasas humanas en organismos menores como como la levadura *Pichia pastoris*, con la que se logró secretar hAChE en el sobrenadante de cultivo a una concentración de 40 U/mL (Ma et al., 2006), o el gusano *Bombyx mori* mediante infección con el vector baculovirus, que expresó hBChE a una tasa de 6,4 U/larva (Li et al., 2010).

1.2.5. Características estructurales de los IChEs

Por un lado, existe un grupo de IChEs que se utilizan como insecticidas, herbicidas u otro tipo de venenos, incluyendo armas de guerra. Químicamente, son compuestos organofosforados o derivados de carbamatos, que actúan directamente en el sitio activo de la enzima (Čadež et al., 2021; Bosak et al., 2012).

El mecanismo de acción de los organofosforados consiste en la esterificación del hidroxilo de la serina de la tríada catalítica de las colinesterasas. Se trata de un enlace covalente que, si bien puede ser revertido por la acción de ciertas oximas, lleva normalmente a la inactivación de la enzima, lo que los convierte en compuestos de muy elevada toxicidad. Los agentes neurotóxicos utilizados como armas químicas como el tabún y el sarín son compuestos de esta clase. Químicamente son ésteres de ácidos fosfóricos con al menos un enlace carbono-fósforo. La toxicidad depende en gran medida de los sustituyentes unidos al fósforo. Los pesticidas organofosforados son tioles, amidas o ésteres con dos cadenas adicionales del grupo fenoxi, cianuro o tiocianato. Los fosfonotioatos (S-sustituidos) y fosfonofluoridatos, son los que se utilizan como agentes químicos de guerra (Mukherjee y Gupta, 2020). Algunos de estos compuestos, como el triclorfón, fueron utilizados para el tratamiento de la EA, pero su uso se descartó debido a su toxicidad. La estructura de este compuesto se muestra en Figura 10 (Gupta, 2006).

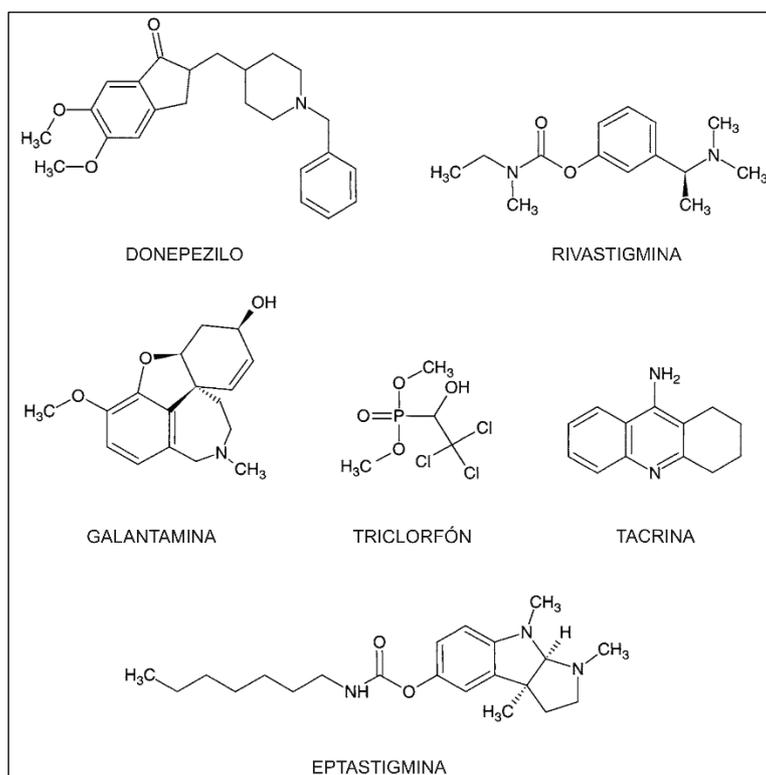


Figura 10: Estructuras químicas de inhibidores de las colinesterasas propuestos para el tratamiento de la EA. Adaptado de Gupta, 2006.

Los carbamatos son compuestos derivados del ácido carbámico (NH_2COOH), en los que diferentes sustituyentes alquílicos, arílicos o alquil-arílicos reemplazan los extremos amino y carboxilo. Estos compuestos también se unen de manera covalente a la serina, pero, en este caso, la unión es espontáneamente hidrolizada (Barak et al., 2009). De hecho, algunos carbamatos, en particular los carbamatos aromáticos, desempeñan un papel crucial en numerosos fármacos y profármacos que han recibido la aprobación de la FDA y se utilizan para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la ya mencionada rivastigmina o la fisostigmina (metabolito secundario de la planta africana *Physostigma venenosum*) que se utiliza en el tratamiento de la Miastenia Gravis (Krátký et al., 2016; Matošević & Bosak, 2020).

Otro grupo de inhibidores son los que no se unen al sitio catalítico, si no que ejercen un efecto inhibitorio al establecer uniones no covalentes con la región del *gorge*, en especial con el sub-sitio aniónico o el PAS. Se caracterizan en general por poseer grupos arilo que les permiten interactuar con los residuos aromáticos de estas regiones enzimáticas y generar una inhibición de tipo reversible. Las interacciones principales que establecen estos compuestos son hidrofóbicas de tipo aromática-aromática, especialmente las interacciones de apilamiento (en inglés, *π -stacking*) cara-cara, a forma de T o desplazadas en paralelo, cuyas geometrías para el modelo benceno-benceno se muestran en Figura 11. La fuerza de atracción en una interacción aromática-aromática suele ser más fuerte que la contraparte aromática-alifática y son las principales interacciones de inhibidores típicos del sitio PAS o el subsitio aniónico como la tacrina, la huperzina A o el propidio (Chen et al., 2018; Harel 1993; Raves et al., 1997; Bolognesi et al., 2015).

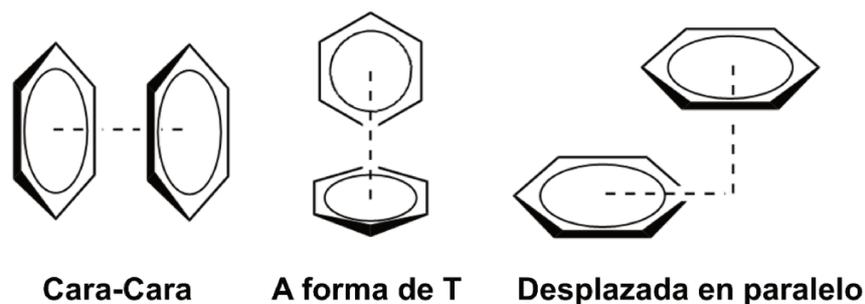


Figura 11: Tres conformaciones representativas de la interacción benceno-benceno. Adaptado de Chen et al., 2018.

La tacrina, que es un derivado de acridina (1,2,3,4-tetrahidro-9-aminoacridina) (Figura 10), fue el primer inhibidor de las colinesterasas aprobado para tratar la EA en 1993 y, si bien luego se discontinuó su uso, sigue siendo una importante estructura de base para el desarrollo de nuevos inhibidores (Wu. et al., 2017; Tumiatti et al., 2010; Riazimontazer et al., 2019). Su interacción con la enzima ocurre entre el subsitio aniónico y el PAS, como se muestra en la estructura cristalina representada en Figura 12 A (Harel et al., 1993). La estructura planar de la tacrina le permite intercalarse entre residuos claves de la enzima como el Trp86, estableciendo contactos de π -stacking. Muchos estudios se han centrado en la modulación de la interacción de *stacking* entre tacrina y AChE, demostrando la gran versatilidad de estas interacciones en el diseño de fármacos. La variación de la polaridad de los anillos aromáticos del compuesto mediante la introducción de sustituyentes es una estrategia común. En este sentido, varios grupos atraedores de electrones han llevado a un incremento significativo de la actividad inhibitoria. Por ejemplo, la 6-clorotacrina tiene un valor de IC_{50} frente a la hAChE 7,4 veces menor que el de la tacrina (Gregor et al., 1992).

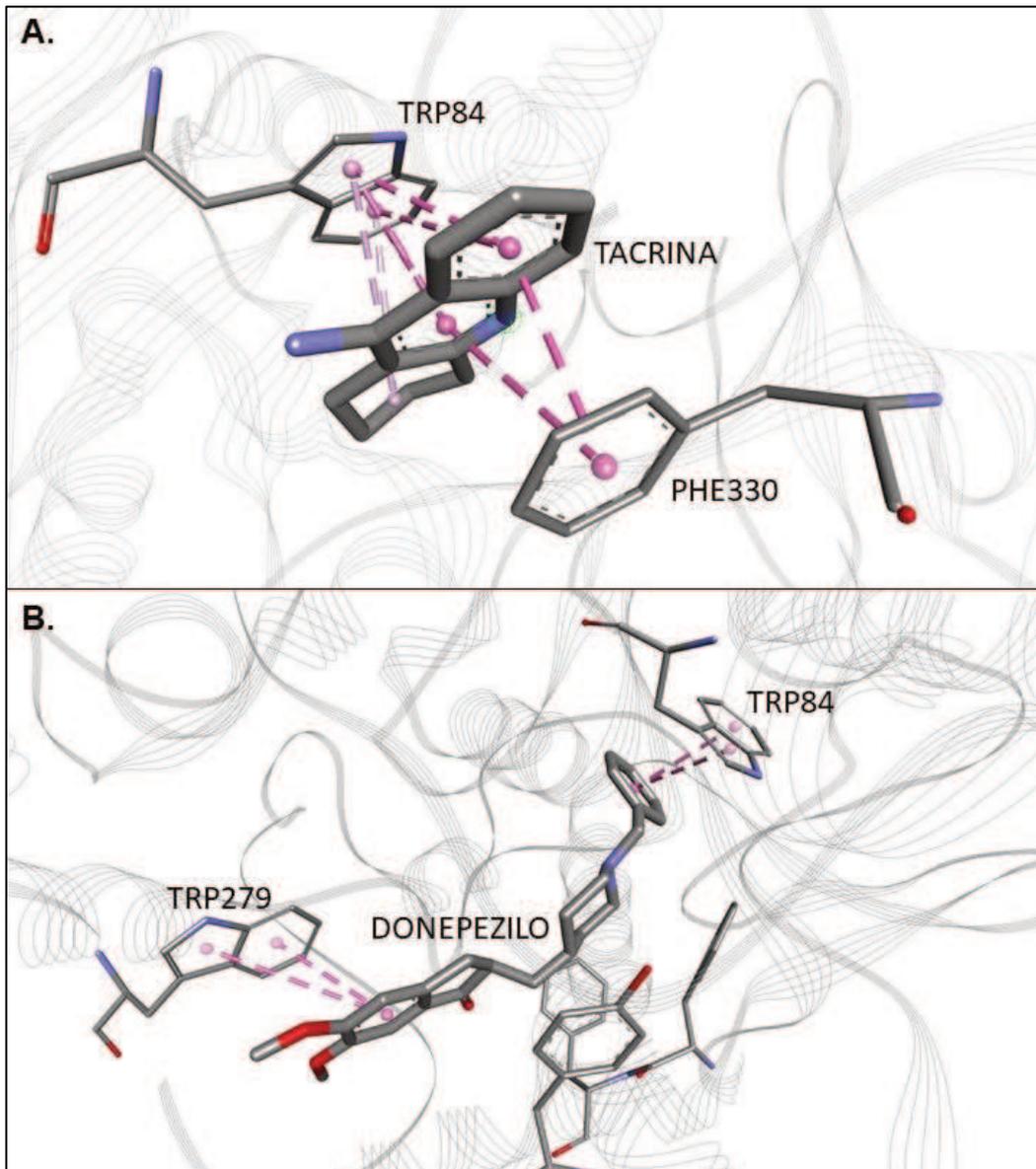


Figura 12: **A** Interacciones de π -stacking de la tacrina en el subsitio aniónico de la TcAChE. Imagen elaborada a partir de la estructura cristalográfica del complejo TcAChE - tacrina con código de acceso PDB: 1ACJ (Harel et al., 1993) **B** Representación de las interacciones de π -stacking del donepezilo en el PAS y subsitio aniónico de la TcAChE. Imagen elaborada a partir de la estructura cristalográfica del complejo TcAChE - donepezilo con código de acceso PDB: 1EVE (Kryger et al., 1999). Ilustraciones realizadas con el programa DS Visualizer (BIOVIA).

Contactos no covalentes de esta clase también los establece el donepezilo, último inhibidor de las colinesterasas en ser aprobado para la EA. Este compuesto es un derivado de N-bencilpiperidina con una estructura de dimetoxiindanona (Figura 10) (Kryger et al., 1999). El grupo bencilo forma una configuración de π -stacking con Trp84, actuando en el subsitio aniónico,

mientras que el núcleo de dimetoxiindanona actúa sobre la cadena lateral del residuo crítico del sitio PAS Trp279 (numeración de *T. californica*) (Figura 12 B).

Otro grupo de inhibidores que actúan de manera no competitiva mediante interacciones no covalentes en la región del PAS, son algunos péptidos con propiedades anticolinesterásicas que se han aislado en venenos de animales de especies poco relacionadas, como *Apis mellifera* (abeja europea) y *Dendroaspis angusticeps* (mamba verde). Del veneno de la primera se aisló la melitina, inicialmente conocida por su actividad hemolítica (Nabil et al., 1998), mientras que en el veneno de la mamba verde se encontraron dos polipéptidos con potente actividad anticolinesterásica, las fasciculinas I y II (FAS), inhibidores duales del sitio PAS clasificados como toxinas (Rodríguez-Ithurralde et al., 1983).

El grupo de trabajo del Laboratorio de Péptidos Bioactivos del Departamento de Química Orgánica (FBCB - UNL), aisló diversos péptidos de pieles de anfibios del Litoral argentino con capacidad inhibitoria de las colinesterasas. Entre éstos, se destacan el Hp-1971, de 21 aminoácidos, y el Hp-1935, de 19 aminoácidos, aislados a partir de la piel de *Boana pulchella* (rana de zarzal) que mostraron una actividad moderada frente a BChE (Siano et al., 2014; Siano et al., 2017). Mediante estudios computacionales de *docking* y DM, se determinó la configuración de la estructura del complejo conformado por el péptido Hp-1971 y la BChE, que depende de interacciones no covalentes en la región aniónica de la enzima. Un mismo comportamiento se observó con derivados del Hp-1971 más cortos (Siano et al., 2017).

1.3. Los péptidos bioactivos

1.3.1. Péptidos bioactivos en la naturaleza

No hay duda de que los péptidos se encuentran entre las biomoléculas más importantes de la naturaleza (Flores-Holguín et al., 2022). Estos compuestos se definen de forma general como moléculas que contienen entre 2 y 50 aminoácidos unidos mediante el enlace amida o peptídico. Por su peso molecular, se los puede ubicar entre las pequeñas (MM < 0,5 kDa) y las macro

moléculas (MM > 5 kDa), lo que les confiere propiedades de ambas clases de compuestos (Musaimi et al., 2022). En particular, presentan bajo riesgo de inmunogenicidad y la posibilidad de ser obtenidos mediante síntesis química como las pequeñas moléculas y la capacidad de lograr interacciones de alta especificidad como las macromoléculas, debido a su gran área de interacción. Estas propiedades, que pueden ser logradas gracias a la variedad de aminoácidos disponibles y su estructura predecible los han convertido en compuestos de gran importancia para la química bioorgánica, medicinal y supra molecular (Apostolopoulos et al., 2021; Peighambardoust et al., 2021; Wang et al., 2022).

En la naturaleza, muchos péptidos participan activamente en procesos fisiológicos relevantes, por lo que se los denomina péptidos bioactivos (PBs). Algunos ejemplos son procesos de señalización molecular, hormonales y fisiopatológicos (Akbarian et al., 2022).

Señalización molecular: Las bacterias, plantas y otros organismos tienen la capacidad de comunicarse entre sí a través de señales moleculares. En muchos casos, las moléculas involucradas son péptidos secretados por las células (Lindsey et al., 2002). Uno de los casos típicos es el fenómeno de autoinducción (en inglés, *quorum sensing*) que regula la densidad de población celular. Las bacterias Gram positivas producen oligopéptidos que son hidrolizados en el espacio extracelular para luego interactuar con las células vecinas mediante el reconocimiento de receptores que activan cascadas de señalización, regulando la proliferación celular (Janssens et al., 2021). Algunos ejemplos relevantes son la regulación de la expresión de una proteasa extracelular de *Enterococcus faecalis* y la formación de biofilm regulado por AIP2 en *Staphylococcus epidermidis*. La actividad de estos PBs es específica de cada especie bacteriana gracias a que pueden adoptar conformaciones cíclicas o lineales y sufrir modificaciones postraduccionales, entre otras propiedades. El análisis de la composición aminoacídica de estas secuencias demostró que son ricas en residuos aromáticos (Rajput et al., 2015).

Hormonales: En organismos vivos diversos como insectos, plantas o vertebrados, algunos PBs actúan como hormonas, tanto mediante la vía

paracrina como autocrina. En humanos, importantes hormonas como la hormona estimulante de melanocitos (MSH) que regula pigmentación de la piel, la insulina y el glucagón que tienen funciones en la regulación del metabolismo o las hormonas pituitarias oxitocina y ADH (hormona antidiurética), son péptidos de diversa longitud y propiedades químicas (Singh & Mukhopadhyay, 2014; Pontiroli, 1998). Mientras la insulina y el glucagón son péptidos largos (51 y 29 aminoácidos, respectivamente), la oxitocina y ADH son nanopéptidos amidados en su extremo y con puentes disulfuro, y pertenecen al amplio grupo de los neuropéptidos (Cid-Jofré et al., 2021).

Fisiopatológicos: Se ha sugerido que algunas de las cascadas de señalización que dependen de interacciones con PBs, como la vía canónica Wnt/ β -catenina, pueden conducir a la activación de procesos de crecimiento tumoral (Zhan et al., 2016). Este es el caso de algunos péptidos de la microbiota intestinal, que promueven la invasión celular y angiogénesis en cáncer colorrectal (Wynendaele et al., 2022). Mientras que estos péptidos actúan por un mecanismo de señalización molecular exógeno, también se han reportado péptidos promotores de oncogénesis expresados directamente por las células tumorales ante situaciones de estrés, que actúan modulando la actividad de la ATP sintetasa mitocondrial (Ge et al., 2021). Otras secuencias involucradas en procesos patológicos actúan, en cambio, mediante la agregación molecular debido a su hidrofobicidad, que depende tanto de su composición aminoacídica como de su estructura tridimensional (Poulson et al., 2019). Este fenómeno se observa en procesos como el ya descrito de agregación de péptido A β para formar las placas seniles en la EA.

1.3.2. Péptidos bioactivos terapéuticos

A medida que crece el conocimiento sobre las características químicas y la importancia biológica de los PBs como las mencionadas hasta ahora, crece también el interés por su estudio para el desarrollo de compuestos que aporten un beneficio para la salud. De hecho, durante la última década, las publicaciones concernientes a los PBs se triplicaron. En la Figura 13 se muestra un crecimiento de estos reportes en el período 2010-2021 (Du & Li, 2022).

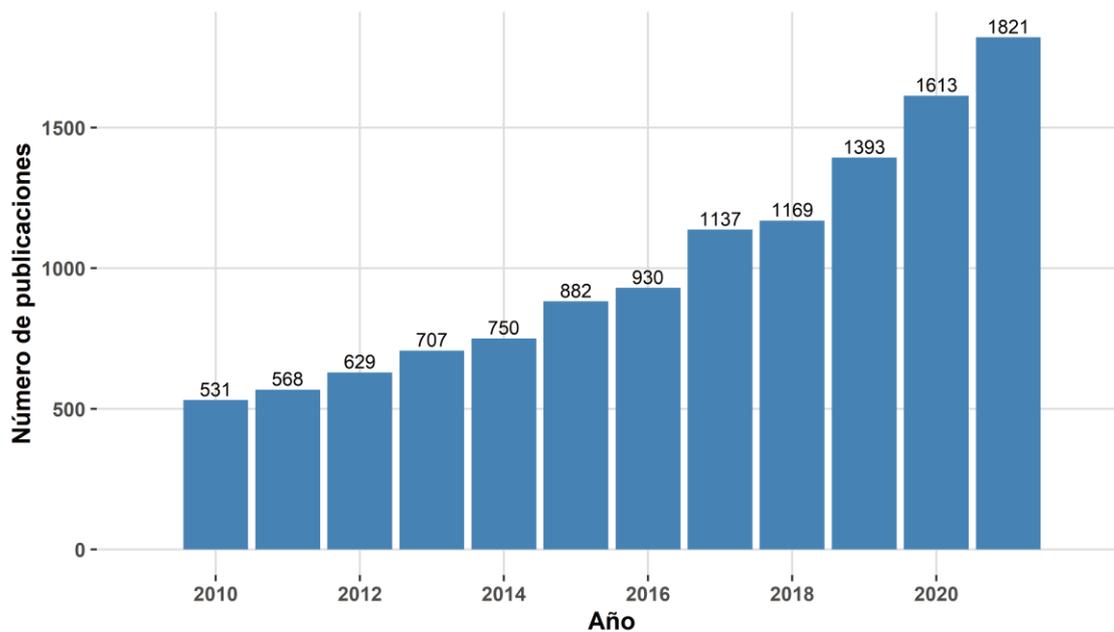


Figura 13: Evolución temporal del número de publicaciones sobre péptidos bioactivos. Número de publicaciones por año con el término “péptido bioactivo” como palabra clave. Elaborado a partir de datos de Du & Li, 2022.

Se ha informado que muchos PBs pueden ser utilizados como antioxidantes, antihipertensivos, antidiabéticos, antitumorales, antimicrobianos, antiobesidad, antiinflamatorios y promotores del crecimiento óseo, lo que sugiere su amplio potencial en la prevención y mitigación de enfermedades agudas o crónicas (Duffuler et al., 2022; Sánchez y Vázquez, 2017).

Desde la aprobación de la insulina para el tratamiento de la diabetes en 1921, más de 80 péptidos recibieron aprobación por parte de organismos de salud para uso terapéutico y más de 170 se encuentran en alguna fase clínica de desarrollo farmacéutico (Wang et al., 2022). La cuota de mercado cubierta actualmente por los péptidos terapéuticos es del 5% (Muttenthaler et al., 2021). La mayor parte de estas drogas se obtienen mediante síntesis química, mientras que otras, en especial las de mayor longitud, se producen por expresión recombinante en células (Rodríguez et al., 2014; Wang et al., 2022). Además de estas dos vías de obtención, también pueden aislarse péptidos directamente de fuentes naturales, estrategia que representa el método principal para el descubrimiento de nuevas secuencias bioactivas.

Los PBs terapéuticos pueden estar formados sólo por residuos naturales o bien incluir en su secuencia aa no naturales o grupos químicos de otro tipo. Estas modificaciones suelen aportar beneficios especiales a las secuencias, siendo la más común la estabilidad frente al ataque de enzimas proteolíticas, entre otras actividades particulares (Lu et al., 2020). Este tipo de secuencias también pueden ser de origen natural e incluir las modificaciones en su proceso de biosíntesis, o de origen sintético, mediante estrategias químicas que permiten otorgar o mejorar propiedades especiales en secuencias de interés (Wenski et al., 2022; Vagner et al., 2008). Los avances en las técnicas de síntesis y modificación de péptidos, así como en los métodos computacionales para predecir la estructura y actividad de los péptidos han ampliado considerablemente las aplicaciones potenciales de los péptidos en el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Henninot et al., 2018).

En general, se busca que los péptidos terapéuticos sean altamente específicos, para dirigirse de manera precisa a receptores o enzimas específicas en el cuerpo. Además, estos péptidos deben exhibir una notable eficacia, siendo capaces de generar efectos biológicos significativos incluso a dosis bajas (Barman et al., 2023). Tienen también que ser seguros, presentando baja toxicidad en estudios *in vitro* e *in vivo*. Esta propiedad destaca a aquellos de origen natural, que suelen ser compuestos biocompatibles que minimizan la probabilidad de reacciones adversas (Zaky et al., 2021).

La caracterización toxicológica es de gran importancia en compuestos con fines terapéuticos. Para los péptidos, resulta de gran utilidad, particularmente en las etapas iniciales de desarrollo, la evaluación de su efecto tóxico frente a células y pequeños organismos modelo. En este sentido, el ensayo de hemólisis de glóbulos rojos humanos (GRh) representa la evaluación de toxicidad inicial más comúnmente empleada (Greco et al., 2020). En este ensayo, se mide la cantidad de hemoglobina liberada por eritrocitos expuestos al compuesto en estudio. Si la sustancia causa hemólisis significativa, puede indicar toxicidad y daño potencial a los tejidos y órganos del cuerpo (Sæbø et al., 2023). Es un ensayo particularmente útil para péptidos con fines terapéuticos, ya que la estructura y composición de los péptidos puede determinar la disrupción y

destrucción de las membranas de los glóbulos rojos, para las cuales se ha determinado una gran similitud con las membranas de otras células humanas (Mohandas & Gallagher, 2008). De hecho, la mayor parte de los modelos de predicción de toxicidad desarrollados para péptidos en los últimos años apuntan a la estimación de su potencial hemolítico (Robles-Loaiza et al., 2022).

Uno de los grupos más estudiados de PBs con fines terapéuticos es el de los péptidos con actividad antimicrobiana (PAMs). Una de las principales bases de datos de PAMs disponibles contiene actualmente 3569 secuencias provenientes de distintas fuentes, aunque la mayor proporción provienen de organismos del reino animal ya que actúan como compuestos de defensa natural contra patógenos. Las secuencias depositadas en esta base de datos tienen un promedio de longitud de 33 aa y una carga promedio de +3,40, dado que la gran mayoría de PAMs son catiónicos (Wang et al., 2023). Otra propiedad común a los PAMs es la de poseer una estructura secundaria de α -hélice, aunque no son raras las secuencias antimicrobianas con otras configuraciones como lámina β con dos o más enlaces disulfuro, péptidos de horquilla o β -loop con un enlace disulfuro y/o ciclación de la cadena peptídica o, finalmente, péptidos con estructuras extendidas (Moretta et al., 2021). Diversos PAMs ya han sido aprobados por la FDA para uso en humanos, como la gramicidina, péptido lineal que actúa mediante la formación de poros; la daptomicina y la coliestina, lipopéptidos cíclicos y líticos de la membrana celular y diversos glucopéptidos que inhiben la síntesis de la pared celular como vancomicina, oritavancina y dalbavancina (Chen & Lu, 2020; Usmani et al., 2017). Existen además péptidos aprobados para tratar infecciones virales como la enfuvirtida, un péptido sintético de 36 residuos derivado de la proteína gp41, que se utiliza en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y actúa mediante la unión a una proteína esencial para el proceso de fusión del virus con la célula huésped (Matthews et al., 2004).

Otros péptidos terapéuticos actúan como hormonas, inmunomoduladores, antioxidantes, transportadores de drogas o inhibidores enzimáticos (Perlikowska et al., 2022; Gokhale & Satyanarayanajois, 2014; Berillo et al., 2021). Estos últimos representan un importante grupo de PBs ya

que aproximadamente la mitad de las drogas que se comercializan, incluyendo los compuestos pequeños, actúan inhibiendo enzimas que son blancos moleculares en el tratamiento de enfermedades (Holdgate et al., 2017). Diversos péptidos que se componen de residuos naturales y actúan mediante inhibición enzimática ya han sido aprobados como fármacos, como el inhibidor de proteasas de serina aprotinina o la linaclotida (cíclico), inhibidor de la guanilato ciclasa-C (Zhirnov et al., 2011; Layer & Stanghellini, 2014).

1.3.3. Fuentes de péptidos bioactivos y terapéuticos

Como se mencionó anteriormente, los PBs pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes, que incluyen las proteínas alimentarias, venenos y secreciones, microorganismos o plantas, entre otras (Du & Li, 2022).

Matrices alimentarias: por ejemplo, la caseína y las proteínas del suero de la leche. La hidrólisis enzimática es la técnica más común para la generación de péptidos a partir de estas matrices, utilizando enzimas como la tripsina, la quimotripsina y la pepsina. Actualmente, se extraen proteínas y péptidos de la leche de todo tipo de animales (Park & Nam, 2015). De la fermentación de las proteínas de la leche por parte de *L. helveticus* se obtuvieron los péptidos IPP, VPP, TP y KVLPVPQ, que han demostrado tener efectos inhibidores de la ECA en modelos animales hipertensos (Jäkälä & Vapaatalo 2010). La leche de burra, a su vez, ha demostrado ser una fuente de varios péptidos antioxidantes, como GQGAKDMWR y EWFTFLKEAGQGAKDMWR (Zenezini Chiozzi et al., 2016). Las propiedades de los péptidos derivados de la leche varían según factores como la proteína de origen, el método de hidrólisis e incluso el tipo de animal huésped (Akbarian et al., 2022).

Venenos y/o secreciones: Algunos péptidos encontrados en venenos de serpientes, arañas o escorpiones han evolucionado como intervenciones terapéuticas complejas que modulan potente y selectivamente una variedad de objetivos terapéuticos como canales iónicos, receptores y vías de señalización de procesos fisiológicos, lo que los convierte en posibles péptidos terapéuticos (Lewis & Garcia, 2003). De la misma manera, secreciones de anfibios y organismos marinos como peces, mariscos y algas, son ricos en PBs para la

defensa contra patógenos o depredadores. Se estima que en estas matrices existen unos 50 millones de productos naturales diferentes, de los cuales se ha identificado y caracterizado sólo el 0.01%, debido a las dificultades de los procesos de purificación y caracterización (Ageitos et al., 2022; El-Aziz et al., 2019).

A partir de algunas de estas secuencias se han desarrollado fármacos aprobados para tratar enfermedades. Algunos ejemplos son los péptidos aislados del veneno de serpientes del género *Bothrops* como el captopril, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) aprobado como Capoten® (Bristol-Myers Squibb, BMS, New York, NY, USA) para tratar enfermedades cardiovasculares y el enalapril, aprobado como Vasotec® para tratar la hipertensión y la insuficiencia cardíaca (Bordon et al., 2020). Los péptidos ICK aislados de tarántulas han mostrado capacidad para bloquear los canales Nav y ser utilizados para tratamiento de dolor (Monge-Fuentes et al., 2018). Del veneno de la tarántula *Psalmopoeus cambridge* se obtuvo el péptido ICK PcTx-1, que se encuentra en ensayos preclínicos y, recientemente, se desarrolló JNJ63955918, un péptido derivado del protocin-II (ProTX-II, de la tarántula *Thrixopelma pruriens*) optimizado mediante evolución dirigida con mayor selectividad hacia los canales Nav1.7 (Ageitos et al., 2022). Esta actividad es de interés de compañías farmacéuticas como Amgen que está estudiando el péptido GpTx-1 (Chen et al., 2018). Estas empresas trabajan activamente en el mejoramiento de secuencias para mejorar su actividad. Por ejemplo, el péptido HYL del veneno de la abeja *Hylaeus signatus*, de baja actividad antimicrobiana, fue optimizado generando análogos guiados por estudios computacionales y luego utilizado gracias a su efecto sinérgico en combinación con otros antibióticos, lo que representa otro método de empleo de los péptidos terapéuticos (Nešuta et al., 2016).

Bacterias y otras fuentes: los péptidos antimicrobianos bacterianos, conocidos como bacteriocinas, son secretados por una variedad de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas (Simons et al., 2020). Generalmente tienen como blanco la membrana celular, mientras que algunos inhiben la biosíntesis de biopolímeros o la actividad de enzimas. Las bacteriocinas son

generalmente sensibles a las proteasas intestinales humanas, lo que las convierte en un recurso valioso para la conservación de alimentos sin efectos perjudiciales para la salud humana (Huang et al., 2021). Además, se pueden extraer péptidos antimicrobianos de la hemolinfa de insectos o del exterior de sus cuerpos (Diniz et al., 2018). También se presta atención a los PBs derivados de microorganismos marinos. Algunos compuestos bioactivos marinos son producidos por microbios que coexisten con especies marinas. Por ejemplo, los actinomicetos marinos son una fuente de compuestos bioactivos secundarios con actividad anticancerígena y antimicrobiana (Wang et al., 2020). Se han aislado diferentes péptidos marinos, como las cyclomarinas A, B y C, que han demostrado actividad antiinflamatoria y anticelular en estudios de laboratorio (Schultz et al., 2008). Otros ejemplos son las salinamidas A-E, péptidos con actividad antiinflamatoria y antimicrobiana que se utilizan en el tratamiento de la inflamación de tejidos y algunas infecciones (Hassan et al., 2020).

Entre las fuentes mencionadas, las secreciones de pieles de anfibios se han destacado como fuente de PBs con efectos terapéuticos sobre el sistema nervioso, lo que ha permitido encontrar secuencias de interés para el tratamiento de enfermedades que involucran un deterioro cognitivo (Chen et al., 2022). Los anfibios secretan PBs de sus glándulas granulares presentes en sus pieles como una forma de defensa contra predadores y para comunicación intraespecífica. Estas secuencias pueden tener efectos diversos, incluyendo analgesia, parálisis muscular, estimulación o inhibición del sistema nervioso, entre otros (Gomes et al., 2007; Conlon et al., 2014). De esta manera, su espectro de bioactividad ha demostrado ser muy amplio, desde antimicrobianos, antitumorales, antivirales, antioxidantes hasta inhibidores enzimáticos. En la Tabla 1 se listan una serie de péptidos obtenidos a partir de pieles de anfibios con diversas propiedades bioactivas. Algunas secuencias fueron aisladas y estudiadas originalmente por su actividad antimicrobiana y luego se encontró que poseían un potencial como agentes frente a otras patologías como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas, principalmente por su capacidad inhibitoria de enzimas específicas. Este es el caso de las dermaseptinas, aisladas de la piel de la rana arborícola sudamericana *Phyllomedusa sauvagei* (Bartels et al., 2019), las magaininas, que derivan de la rana africana *Xenopus laevis* (Lehmann et al.,

2006), o los péptidos Hp-1971 y Hp-1935, obtenidos a partir de la piel de la rana del zarzal (*B. pulchella*), del litoral argentino (Siano et al., 2017).

Tabla 1. Péptidos bioactivos obtenidos a partir de pieles de anfibios

Anuro	Péptido(s)	Actividad biológica	Ref.
<i>B. maxima</i>	Maximina 3	Antiviral	Lai et al., 2002
<i>B. ephippium</i>	BPP-Brachy-NH ₂	Inhibidor de ACE	Arcanjo et al., 2015
<i>B. andrewsi</i>	BAS-AH	Antiviral	Zhao et al., 2005
<i>B. gargarizans</i>	Buforinas (I, II)	Antimicrobiana	Park et al., 2000
<i>R. arenarum</i>	LBP-1, LBP-2	Antimicrobiana	Sánchez Riera et al., 2003
<i>X. laevis</i>	Magaininas	Antimicrobiana	Zasloff., 1987
<i>N. pleskei</i>	Nigroaina (B-MS1, C-MS1)	Antioxidante	Wang et al., 2017
<i>B. pulchella</i>	Hp-1971, Hp-1935, Hp-1891	Antimicrobiana	Siano et al., 2014
	Hp-1971, Hp-1891	Inhibidor AChE/BChE	Siano et al., 2017
<i>L. lesueuri</i>	Caeruleína	Analgésica	Doyle et al., 2002
<i>B. cordobae</i>	BC1	Inhibidor BChE/MAO-B	Spinelli et al., 2023
<i>P. bicolor</i>	Dermaseptinas (B2, B3)	Antitumoral	van Zoggel et al., 2012
<i>P. sauvagii</i>	Dermorfina	Analgésica	Gomes et al., 2007
	Dermaseptinas (I, B)	Antimicrobiana	Patocka et al., 2019
<i>L. latrans</i>	Ocelatinas (1, 2, 3)	Antimicrobiana	Nascimento et al., 2004
	LI-1577, LI-1298, LI-2085	Antimicrobiana	Siano et al., 2018
<i>P. nattereri</i>	Antioxidina-I	Antioxidante	Barbosa et al., 2018

Un paso crucial para el estudio de péptidos naturales es la definición de la secuencia de aminoácidos que lo constituyen. Para esto, si bien se puede recurrir a la secuenciación mediante degradación de Edman, que es el método más tradicional, actualmente se emplea la técnica de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), especialmente para muestras complejas con mezclas

contenientes péptidos. Esta técnica normalmente se combina con técnicas cromatográficas (HPLC-MS/MS) y resuelve la secuencia utilizando métodos informáticos como el secuenciamiento asistido por base de datos que ha permitido, junto con la ionización por electroespray (ESI) de la muestra, mejorar la fiabilidad del secuenciamiento por MS/MS (Nong & Hsu, 2022).

Una vez que se conoce la secuencia de un péptido natural, o si se busca obtener un péptido diseñado específicamente, se requiere producirlo con alta pureza y en cantidad. Para este fin, se recurre principalmente a la síntesis química de la secuencia o se aplican técnicas de ADN recombinante. La técnica de síntesis más utilizada para los péptidos es la síntesis en fase sólida, y será tratada en detalle en el siguiente apartado. Las técnicas de ADN recombinante, a su vez, implican el uso de ingeniería genética y se usan para producir una variedad de péptidos terapéuticos, incluidos los análogos de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) en el tratamiento de las deficiencias de la hormona del crecimiento (GR). En estos sistemas, un gen que codifica la secuencia del péptido deseado se enlaza al gen de una proteína transportadora para facilitar su purificación (Sinha et al., 2021). Este método permite la producción masiva de péptidos como la ecalantida, inhibidor reversible de la calicreína plasmática humana, y desirudina, anticoagulante inhibidor selectivo de la trombina libre (Akbarian et al., 2022).

1.3.4. Síntesis de péptidos en fase sólida

Las técnicas de síntesis aplicadas a péptidos pueden diferenciarse dos grupos: síntesis en solución y síntesis en fase sólida (SPPS). En la primera técnica, los aminoácidos se acoplan sobre cadenas crecientes libres en solución. Es un enfoque más tradicional que se utiliza principalmente para la síntesis de péptidos de menor tamaño o cuando se requiere la introducción de modificaciones químicas específicas. La síntesis en solución puede requerir pasos adicionales de purificación y es menos eficiente para la producción a gran escala en comparación con la SPPS, que representa actualmente el método más utilizado para la obtención de PBs (Stawikowski & Fields, 2012).

La SPPS implica la construcción secuencial del péptido sobre una resina sólida. Se destaca frente a la síntesis en solución debido a su alta eficiencia y rendimiento, además de su versatilidad para obtener péptidos de diferentes longitudes y estructuras, la posibilidad de automatización y escalabilidad, junto a una purificación más simple y una amplia gama de aplicaciones. Estas características han llevado esta técnica de síntesis a su adopción generalizada en la industria farmacéutica. En la actualidad, una amplia variedad de medicamentos basados en péptidos comercializados se fabrica utilizando este enfoque (Martin et al., 2020).

Esta técnica fue desarrollada por Robert Bruce Merrifield en 1963. Merrifield fue un químico y premio Nobel que desarrolló la SPPS como un método más eficiente y simplificado para sintetizar péptidos en comparación con la síntesis en solución, revolucionando esta área de estudio. Desde entonces, la SPPS se ha convertido en la técnica más utilizada e importante en la síntesis de péptidos, ya que permite la producción de una amplia gama de PBs con aplicaciones en el descubrimiento de fármacos, la biotecnología y la investigación básica (Merrifield, 1969; Stawikowski & Fields, 2012).

Dado que los aminoácidos contienen grupos funcionales que pueden reaccionar entre sí, con el solvente o con los reactivos utilizados en la síntesis, lo que lleva a productos no deseados, en SPPS los grupos funcionales están protegidos por grupos químicos específicos llamados protectores. Para la protección del grupo amino terminal, los grupos principales utilizados en SPPS son el t-butiloxicarbonilo (Boc), fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y aliloxicarbonilo (Alloc). Estos grupos presentan diversa reactividad frente a agentes químicos, lo que permite combinarlos y eliminarlos selectivamente para estrategias de síntesis más complejas. La síntesis mediante la química Fmoc (Fmoc-SPPS) es la más utilizada, en donde el protector del α -amino terminal es justamente el Fmoc. La estructura de este grupo, como protector del extremo amino de una L-Ala (Fmoc-L-Ala-OH) se muestra en Figura 14.

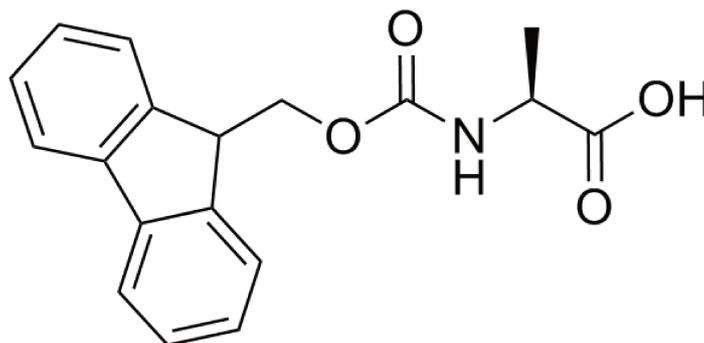


Figura 14: Estructura del grupo Fmoc unido al grupo α -amino terminal de una L-Ala (Fmoc-L-Ala-OH).

Para la protección de los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aa en la Fmoc-SPPS existen una variedad de protectores, dependiendo del grupo protegido y de la estrategia de síntesis. El grupo protector lábil en medio ácido *tert*-Bu (tBu) se utiliza para proteger los grupos funcionales de las cadenas laterales de Ser, Thr, Tyr, Glu y Asp. El grupo tritilo (Trt) se emplea para Cys, Asn, Gln e His. Para Arg, el 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) es el más utilizado (Carpino et al., 1993). Finalmente, el grupo Boc es preferido para Lys y Trp (Hansen & Oddo, 2015). Los refinamientos de la técnica se orientan principalmente al desarrollo de nuevos grupos protectores de las cadenas laterales funcionalizadas.

El Fmoc es un protector que posee gran estabilidad, compatibilidad con varios solventes y facilidad de eliminación. En esta técnica, la síntesis se realiza extendiendo el péptido desde el extremo C hacia el N-terminal. El Fmoc está unido al grupo amino del aminoácido y su eliminación (desprotección) se logra mediante el tratamiento con una base débil, preferiblemente una amina secundaria, como la piperidina. Al aminoácido desprotegido en su grupo amino se le acopla el aminoácido siguiente en la cadena (protegido) en una reacción de acoplamiento catalizada por activadores del grupo carbonilo. Luego se repite el proceso con el aa siguiente, de manera cíclica. Una vez que todos los aa se acoplaron a la cadena, se debe separar (clivar) el péptido de la resina mediante la acción de un ácido (Amblard et al., 2006). A continuación, se detallan los pasos de la síntesis con química Fmoc que se esquematiza en la Figura 15:

- **Elección de la resina:** Si bien existen distintas clases de resinas, en Fmoc-SPPS se emplean comúnmente las de tipo Rink-amida para péptidos con un grupo C-terminal amida (Hou et al., 2017). Se trata de resinas de poliestireno modificadas con *linkers* con grupo amida, protegidas con Fmoc. Están específicamente diseñadas para este tipo de síntesis y ofrecen una alta capacidad de carga, estabilidad y compatibilidad con los reactivos que se utilizan. Otras resinas muy empleadas son las de poliestireno funcionalizado grupos clorometilo (por ejemplo, la resina de Merrifield), aunque se emplean principalmente SPPS basada en Boc por su inestabilidad frente a las condiciones básicas de la desprotección del grupo Fmoc (Yang et al., 2013). Algunas resinas están protegidas con Fmoc y deben ser desprotegidas con piperidina.
- **Acoplamiento.** El primer aa se acopla utilizando reactivos que activan el grupo carbonilo, como N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA), dicitclohexilcarbodiimida (DIC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o tetrafluoroborato de (O-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), para formar un enlace peptídico. Este proceso se repite para cada aa subsiguiente en la secuencia. Si bien el HOBt es el reactivo más empleado para obtener el éster activado, se puede evitar su uso empleando el activador Oxyma, que es más seguro (Subirós-Funosas et al., 2009). El mecanismo de reacción de acoplamiento de un aa activado con HOBt se muestra en Figura 16. Inicialmente ocurre una sustitución nucleofílica en la que el grupo -NH₂ de la resina (o de un aa desprotegido) se acopla al carbonilo del aa Fmoc activado, y luego ocurre la eliminación del HOBt tras una transferencia de protones desde el grupo amino de la resina. Un mecanismo análogo ocurre para la unión de aa a otro ya unido a la resina (Pires et al., 2014; Montalbetti & Falque, 2005).
- **Desprotección:** Después de cada paso de acoplamiento, el grupo protector en el amino del aa agregado debe ser removido para continuar la síntesis. El mecanismo de eliminación del Fmoc transcurre en dos pasos: primero, la base débil remueve el protón ácido en la posición 9 del anillo de fluoreno, y luego una β-eliminación produce residuo de dibenzofulveno (DBF) altamente reactivo que es atrapado

inmediatamente por la amina secundaria formando aductos estables. Estas reacciones funcionan mejor en un medio donador de electrones y relativamente polares como N,N-dimetilformamida (DMF) o N-Metil-2-pirrolidona (NMP) respecto a medios relativamente no polares como diclorometano (DCM) (Luna et al., 2016).

- **Clivaje y desprotección.** Una vez que se completa la secuencia peptídica, el péptido se escinde del soporte sólido y se eliminan los grupos protectores de los grupos funcionales de los aa. Para ambos fines se utiliza un ácido fuerte, como el ácido trifluoroacético (TFA). Esta reacción de clivaje se realiza generalmente en presencia de *scavengers* (captadores de grupos químicos) para atrapar los grupos protectores liberados y prevenir reacciones secundarias no deseadas, como el triisopropilsilano (TIS) para capturar especies catiónicas (Kings et al., 1990; Ste Marie & Hondal, 2018).
- **Purificación.** El péptido crudo se purifica utilizando técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para obtener el producto final.

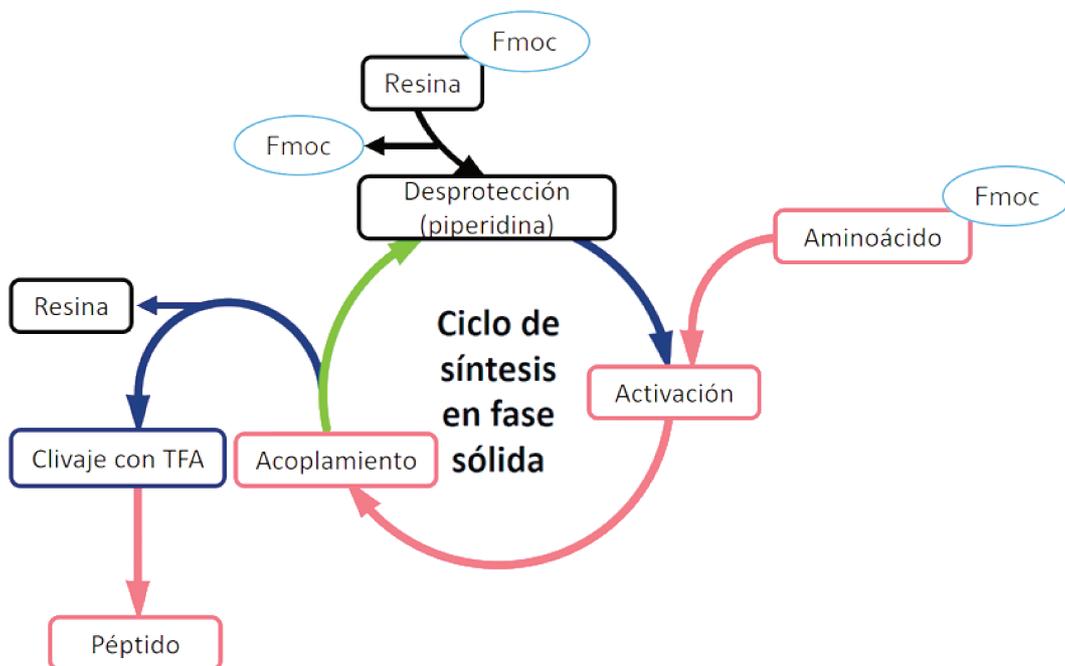


Figura 15: Esquema de los pasos de una SPPS con química Fmoc.

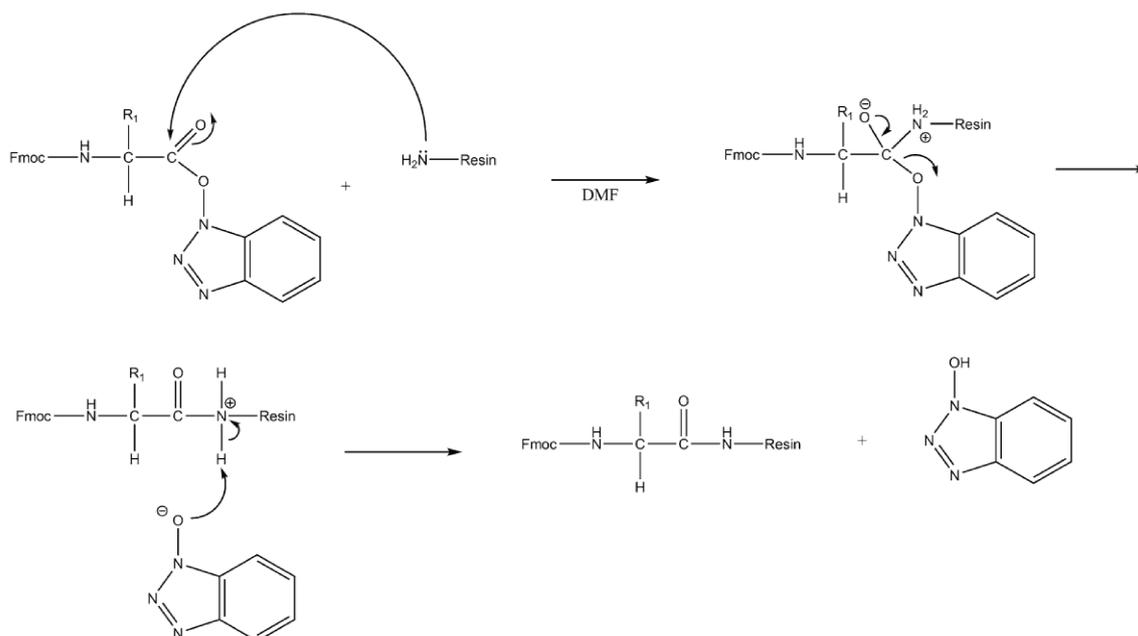


Figura 16: Mecanismo de reacción del acoplamiento a la resina de un aminoácido protegido con Fmoc y activado con HOBt. R1 es la cadena lateral de un aminoácido. Fuente: Pires et al., 2014.

1.3.3.1. Tratamiento post-síntesis

Al finalizar un proceso de síntesis, es de gran utilidad la obtención del producto sólido para poder conservarlo y estudiarlo. Esto se puede lograr mediante su liofilización, que consiste en congelarlo para luego introducirlo en una cámara de vacío donde se realiza la separación del agua por sublimación. Es decir, el agua pasa desde el estado sólido al gaseoso sin pasar por el estado líquido. Esto permite la conservación de las muestras, bajo ciertas condiciones, por largos períodos de tiempo (Matejtschuk, 2007).

Además, el producto debe ser purificado y analizado para determinar su pureza y controlar si su composición aminoacídica es la correcta. Una de las técnicas que se emplea para estudiar la homogeneidad del producto es la cromatografía líquida de alta performance en fase reversa (RP-HPLC por su nombre en inglés: *Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography*) (Mant et al., 2007). Se trata de una técnica cromatográfica en la cual la fase estacionaria está formada por partículas de sílica modificadas con hidrocarburos de diferentes tipos, lo que la convierte en una matriz apolar. Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas, que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente

apolar, y una fase estacionaria apolar. Los compuestos no polares tienden a interactuar con las cadenas alquílicas a través de fuerzas de Van der Waals, por lo que estarán menos tiempo en la fase móvil y su elución se verá retrasada. Por lo tanto, el tiempo de retención (t_r) es mayor para las moléculas de naturaleza apolar o hidrofóbicas, mientras que las moléculas de carácter polar o hidrofílicas eluyen más rápidamente.

Las características del compuesto a separar juegan un papel muy importante en la retención. Un compuesto de cadena alquílica larga posee mayor hidrofobicidad y presenta un mayor t_r , el cual aumenta con el área de la superficie hidrofóbica. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida (Petrova & Sauer 2017).

La hidrofobicidad y la hidrofiliidad de un péptido van a depender de sus residuos, el largo de la secuencia y la estructura. Las cadenas laterales de los aminoácidos pueden ser no polares o hidrófobas o polares o hidrófilas. Además, pueden ser polares sin carga, cargadas positivamente (básicas) o negativamente (ácidas). Incluso dentro de cada grupo, existen diferencias notables en el tamaño, la forma y las características de las cadenas. En consecuencia, la naturaleza hidrófila o hidrófoba del péptido y la presencia de grupos cargados juegan un papel importante en la separación de péptidos. La estructura secundaria, a su vez, va a depender del entorno hidrófobo de la RP-HPLC. Estas condiciones suelen promover y estabilizar la formación de estructuras α -helicoidales en cadenas polipeptídicas. En consecuencia, cuando una molécula sufre la formación de una estructura helicoidal con una cara de una hélice α anfipática no polar que puede interactuar con la fase estacionaria, su interacción hidrofóbica será más fuerte en comparación con la unión como una región de *random coil* o una α -hélice no anfipática. Este fenómeno da como resultado una desviación notable del comportamiento de retención esperado basado únicamente en la composición de aminoácidos (Tripet et al., 2007).

La elución se realiza empleando mezclas de solventes polares como agua, acetonitrilo, acetato de etilo y alcoholes alifáticos. En la separación de

aminoácidos y péptidos, se utilizan usualmente columnas con cadenas lineales de 18 carbonos (C_{18} : $|\text{SiO}_2|-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$) (Mant et al., 2010).

Además de controlar la homogeneidad del producto, para comprobar la correcta síntesis de los péptidos es necesario determinar su peso molecular por alguna técnica de Espectrometría de Masas (MS). A estas determinaciones pueden sumarse el análisis de aa y el secuenciamiento químico mediante Degradación de Edman. No obstante, y dado que se conoce de antemano la secuencia de aminoácidos, el análisis por MS suele ser suficiente para caracterizar el péptido, particularmente cuando se excluye la posibilidad de reacciones secundarias importantes (Burdick & Stults, 1997).

Una técnica de MS ampliamente utilizada para medir la masa de péptidos y otras biomoléculas es la espectroscopía MALDI-TOF (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight*). En este análisis se prepara, en primer lugar, una mezcla de la muestra del péptido con una matriz absorbente, que puede ser una sustancia orgánica como el ácido sináptico o el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. La matriz tiene la función de ayudar a desorber e ionizar el péptido cuando se somete a un láser pulsado. A continuación, la muestra se coloca en un objetivo y se irradia con un láser. La energía del láser hace que la matriz absorba la radiación y se produzcan la desorción y la ionización de los analitos, incluyendo el péptido de interés. Los iones generados se cargan positiva o negativamente dependiendo de las condiciones experimentales.

Después de la ionización, los iones son acelerados en un campo eléctrico y enfocados hacia el analizador TOF. Este analizador es un dispositivo que permite separar los iones según su relación masa/carga (m/z). La separación se basa en el tiempo que tarda cada ión en recorrer un tubo de vuelo hasta alcanzar el detector al final del mismo. Iones más livianos o con mayor carga viajan más rápido que iones más pesados o con menor carga. Una vez que los iones alcanzan el detector, se registra la señal generada. Esta señal se convierte en un espectro de masas que muestra la distribución de iones en función de su masa. Cada pico en el espectro representa un ión con una determinada masa.

Analizando el espectro, es posible determinar la masa del péptido de interés (Burdick & Stults, 1997).

1.4. Inhibidores enzimáticos en farmacología

Tal como se mencionó anteriormente, las enzimas son, en la actualidad, objetivos moleculares clave para el diseño y desarrollo de nuevos medicamentos, ya que, modulando su actividad, se pueden lograr efectos fisiológicos inmediatos y bien definidos.

Una amplia gama de problemas de salud, desde infecciones bacterianas y virales hasta enfermedades crónicas como la diabetes, la hipertensión, el cáncer e incluso trastornos de la personalidad como la depresión y la demencia, se tratan farmacológicamente mediante el uso de inhibidores enzimáticos que actúan sobre diferentes enzimas involucradas en la fisiopatología de estas enfermedades. En la Tabla 2 se enumeran algunos ejemplos de fármacos que actúan mediante inhibición enzimática, junto sus enzimas blanco y las enfermedades asociadas.

Tabla 2. Ejemplos de fármacos cuyos principios activos son IE *

Fármaco	Enzima blanco	Enfermedad
Amprenavir	Proteasa de VIH	SIDA
Alopurinol	Xantina oxidasa	Gota
Amoxicilina	Proteínas de unión a penicilina	Infección bacteriana
Combivir	Transcriptasa reversa	SIDA
Flurouracil	Timidilato sintasa	Cáncer
Digoxina	ATPasa Na ⁺ /K ⁺	Fibrilación auricular
Dutasterida	5- α -reductasa	Hiperplasia prostática benigna
Levitra	Fosfodiesterasa V	Disfunción eréctil
Lisinopril	Enzima convertidora de angiotensina	Hipertensión
Leflunomida	Dihidrorotato deshidrogenasa	Inflamación
Nitecapona	Catecol-O-metiltransferasa	Enfermedad de Parkinson
Omeprazol	Bomba electrogénica H ⁺ / K ⁺	Úlcera péptica
Trazodona	Adenosina deaminasa	Depresión

* Fuente: Kenakin, 2017.

1.4.1. Tipos de inhibidores

Los inhibidores enzimáticos se pueden clasificar principalmente como reversibles o irreversibles. En el caso de los inhibidores reversibles, la unión entre la enzima y el inhibidor ocurre a través de interacciones no covalentes, como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waals (Robinson, 2015). Esta unión puede revertirse mediante dilución o diálisis. Los inhibidores reversibles son los más utilizados como medicamentos (Ring et al., 2014). Por otro lado, los inhibidores irreversibles forman enlaces covalentes con la enzima, lo que no puede ser revertido por dilución. Esto generalmente resulta en la pérdida de funcionalidad tanto del inhibidor como de la enzima. Si bien existen inhibidores irreversibles de uso clínico, como el ácido acetilsalicílico o la penicilina, su número es mucho menor en comparación con los inhibidores no covalentes (González-Bello, 2015). Muchos inhibidores irreversibles son venenos y se utilizan como herbicidas,

desinfectantes o armas químicas, entre otros usos (Ganesan et al., 2010; Polsinelli et al., 2010).

El estudio de las reacciones de inhibición reversible se basa en la interacción entre un sustrato (S) y una enzima (E) para formar un complejo enzima-sustrato (ES), que se cuantifica mediante la constante K_s . El complejo ES genera uno o más productos a través de reacciones químicas definidas por la constante de velocidad k_{cat} . Con respecto al inhibidor, la interacción más común es la unión directa a la enzima libre, y el equilibrio entre el complejo binario enzima-inhibidor se define por la constante de disociación K_i (también conocida como constante de inhibición).

El complejo formado entre la enzima y el inhibidor (EI) puede unirse al sustrato para formar un complejo ternario ESI, y la afinidad del complejo EI por el sustrato puede diferir de la afinidad de la enzima libre. Por lo tanto, la constante de disociación K_s se ve modificada, y el valor de otra constante, α , define el grado en que la unión del inhibidor afecta la afinidad de la enzima por el sustrato (Copeland, 2005). La Figura 17 muestra un esquema de estas interacciones.

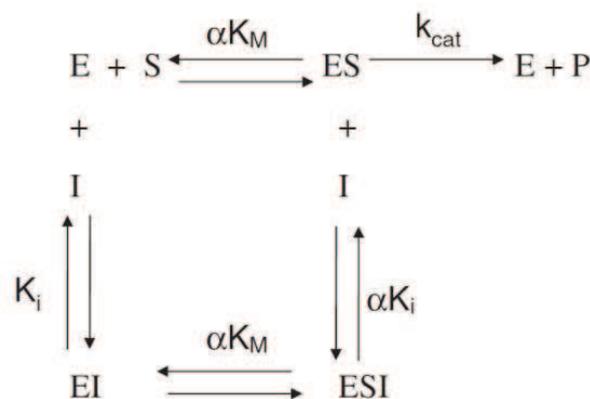


Figura 17: Esquema del equilibrio entre enzima, sustrato e inhibidor reversible. Fuente: Copeland, 2005.

Si no hay cambio en la afinidad, entonces $\alpha = 1$. Si la formación del complejo EI impide la unión del sustrato, entonces $\alpha = \infty$, y si la formación de EI aumenta la afinidad de E por S, entonces $\alpha < 1$. Por lo tanto, la constante K_i representa la disociación del complejo EI, y αK_i representa la disociación del complejo ESI. Estas constantes permiten definir tres tipos potenciales de

interacciones entre la enzima y el inhibidor reversible: inhibidores competitivos, que se unen exclusivamente a la enzima libre; inhibidores no competitivos, que se unen tanto a la enzima libre como al complejo ES con cierta afinidad; e inhibidores acompetitivos, que se unen exclusivamente al complejo ES o especies subsecuentes (Copeland, 2005).

Dado que los inhibidores disminuyen la actividad enzimática, los parámetros cinéticos K_M y V_{max} se modifican según el tipo de inhibición que esté presente. Las siguientes ecuaciones representan la ecuación de velocidad de reacción de Michaelis-Menten (MM) y las diferentes formas que adopta en presencia de un inhibidor competitivo y uno no competitivo con $\alpha = 1$, respectivamente (Ecuaciones 1, 2 y 3):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{([S] + K_M) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Los inhibidores competitivos aumentan el valor de K_M de la enzima sin afectar el valor de V_{max} . Si trazamos un gráfico de la velocidad inicial de reacción (V_0) en función de la concentración de sustrato a diferentes concentraciones de un inhibidor competitivo, obtendremos un gráfico como se muestra en la Figura 18A. Estos inhibidores se unen exclusivamente a la enzima libre y bloquean la unión del sustrato. Son compuestos que compiten directamente con el sustrato por el sitio activo de la enzima (Bisswanger, 2017).

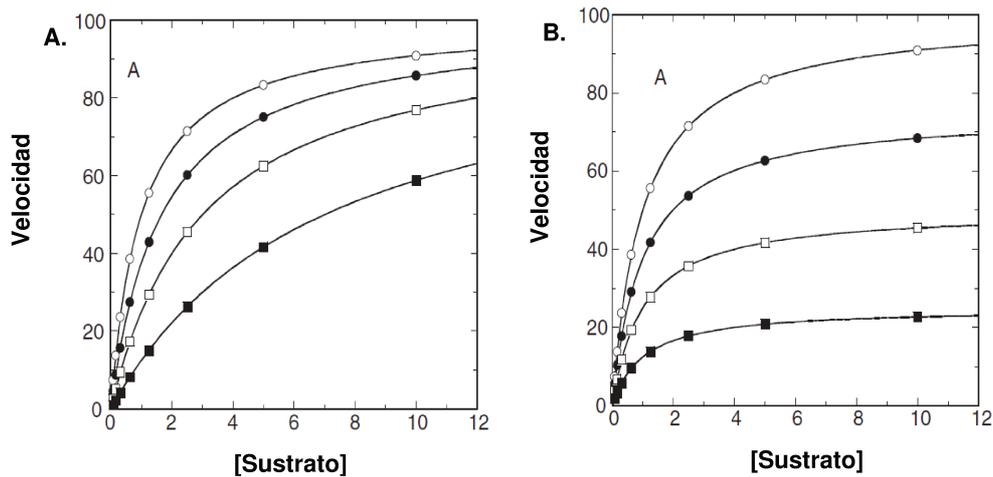


Figura 18: **A** Representación de las curvas de velocidad inicial de una reacción enzimática en función de la concentración de sustrato en presencia de diferentes concentraciones de un inhibidor competitivo y no competitivo con $\alpha = 1$. **B** En ambas imágenes la curva superior representa la enzima sin inhibidor y las curvas inferiores son las que se obtienen al aumentar la concentración de inhibidor. Fuente: adaptado de Copeland, 2005.

Los inhibidores no competitivos más comunes tienen un valor $\alpha=1$, lo que significa que se unen a la enzima con o sin sustrato con igual afinidad. Estos inhibidores modifican (disminuyen) el valor de V_{max} de la enzima pero no afectan el valor de K_M (Delaune & Alsayouri, 2022). La Figura 18 B muestra el tipo de gráfico de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato que se obtiene en presencia de estos inhibidores, que se unen a sitios diferentes del sitio activo de la enzima.

En cambio, los inhibidores no competitivos con un valor $\alpha \neq 1$, generalmente conocidos como inhibidores de tipo mixto, disminuyen V_{max} y aumentan K_M cuando $\alpha > 1$, y disminuyen ambos cuando $\alpha < 1$. Por último, existen inhibidores llamados acompetitivos que modifican tanto V_{max} como K_M en la misma proporción.

1.4.2. Cuantificación de la capacidad inhibitoria

Los ensayos cinéticos enzimáticos implican estudiar la V_0 enzimática en relación con la concentración de sustrato y de inhibidor. Estos ensayos son esenciales para caracterizar un inhibidor, ya que permiten construir curvas de

inhibición, determinar el tipo de inhibición y calcular el valor de la constante de inhibición K_i .

La K_i es un indicador cuantitativo clave de la potencia inhibitoria del compuesto. Otro valor importante es su valor de IC_{50} (concentración inhibitoria 50), que representa la concentración en la cual el inhibidor genera una inhibición del 50% de una determinada actividad enzimática, usualmente a reacción completa (punto final). Una mayor actividad inhibitoria se refleja en valores más bajos de K_i e IC_{50} . Sin embargo, el indicador cuantitativo principal es la K_i , ya que es una medida de la afinidad de un determinado compuesto por la enzima y no depende de la concentración de sustrato como el IC_{50} . Mientras la K_i es un parámetro constante para un compuesto específico con una enzima, el valor IC_{50} es relativo y depende de la concentración de sustrato utilizada en el ensayo. Si se realizan cinco ensayos diferentes con concentraciones de sustrato variables, un compuesto exhibirá cinco valores IC_{50} diferentes para la misma enzima (Burlingham & Widlanski, 2003). De todas maneras, la determinación del IC_{50} es más simple y facilita la comparación de la actividad de un determinado inhibidor con otros reportados en la bibliografía, teniendo en cuenta las condiciones empleadas para su cálculo. El valor de IC_{50} es la métrica más utilizada en las etapas iniciales de desarrollo de fármacos.

La distinción entre IC_{50} y K_i se hace evidente cuando se consideran los métodos utilizados para determinar estos valores. Para calcular el valor de K_i de un inhibidor, es necesario medir las velocidades iniciales (V_0) de las reacciones catalizadas por la enzima mientras se varía de forma independiente la concentración de sustrato $[S]$ y la concentración de inhibidor $[I]$. El experimento consiste en medir la V_0 para un rango de concentraciones de sustrato frente a una concentración fija de inhibidor. Este proceso se repite varias veces, normalmente cinco o seis, con diferentes concentraciones de inhibidor. Estos puntos, que normalmente requieren de 75 a 100 mediciones de velocidad individuales a realizarse por triplicado, se utilizan luego para determinar el valor de K_i mediante un ajuste matemático con el modelo de MM adaptado (Ecuaciones 2 y 3) (Burlingham & Widlanski, 2003).

Por otro lado, los valores de IC_{50} se obtienen con un esfuerzo considerablemente menor. El valor IC_{50} se determina a una sola concentración de sustrato mientras se varían las concentraciones de inhibidor. Dado que este enfoque requiere solo alrededor del 15 - 20 % de los puntos de datos, es más eficiente a la hora de probar una gran variedad de compuestos (Burlingham & Widlanski, 2003).

Una vez que se obtiene los valores de inhibición en función de la concentración de inhibidor, el valor de IC_{50} se obtiene mediante la construcción de una curva de ajuste denominada curva de dosis - respuesta. Para este fin, el modelo matemático más utilizado es el logístico de cuatro parámetros, aunque también se emplea el logarítmico simple. El modelo logístico de cuatro parámetros permite describir de manera precisa un patrón de respuesta sigmoideal para los valores de inhibición, especialmente en casos donde hay una fase de saturación o una región de transición gradual entre la ausencia y la máxima inhibición (Sebaugh, 2011). La curva está descrita por la Ecuación 4. Este modelo, respecto al logarítmico simple, proporciona parámetros adicionales que pueden ayudar a caracterizar la inhibición enzimática de manera más completa.

$$Y = \frac{a-b}{1+(X/c)^b} + d \quad \text{(Ecuación 4)}$$

En la Ecuación 4, Y es la respuesta o actividad (normalmente, porcentaje de inhibición respecto a una actividad sin inhibidor o basal) y X es la concentración. El valor a indica la asíntota inferior o valor mínimo y la asíntota superior es d , la parte superior de la curva o meseta superior. La inclinación de la porción lineal de la curva está descrita por el factor de pendiente, b . El parámetro c es la concentración correspondiente a la respuesta a medio camino entre a y d (Sebaugh, 2011).

1.4.3. Herramientas computacionales para el estudio de los IEs

Los métodos computacionales de estudio de biomoléculas son herramientas extremadamente útiles que, actualmente, alcanzan casi todos los aspectos del proceso descubrimiento de nuevos fármacos (Luque, 2018). Empleando técnicas bioinformáticas, los investigadores pueden, por ejemplo, examinar grandes bases de datos para encontrar moléculas de interés de manera más rápida y económica que basándose sólo en los métodos experimentales. Esto puede acelerar el desarrollo de fármacos mediante la identificación de posibles candidatos a fármacos y la optimización de sus propiedades antes de sintetizarlos y probarlos en el laboratorio. La química computacional también puede ofrecer modelos predictivos aplicados a la afinidad de unión y selectividad de compuestos de interés a objetivos específicos, así como sus perfiles farmacocinéticos y de toxicidad (Sliwoski et al., 2014).

Para el diseño y estudio de inhibidores enzimáticos con potencial terapéutico, se destacan dos técnicas computacionales: las simulaciones de dinámica (DM) y de *docking* molecular (De Vivo et al., 2016). Estas herramientas permiten simular y modelar el comportamiento de moléculas en su interacción con la enzima a través de ecuaciones, lo que facilita la representación, comprensión y predicción de diversas propiedades moleculares dinámicas, como geometrías de interacción, energías y otras. Si bien son técnicas aplicables a un gran número de sistemas y moléculas, son especialmente útiles en las proteínas y péptidos.

1.4.3.1. Dinámica molecular

El objetivo típico de un estudio de DM es simular el comportamiento de un sistema bioquímico, entendido como las posibles configuraciones que el sistema puede adquirir durante un determinado tiempo, normalmente en el orden de los nano hasta microsegundos para un sistema compuesto por una proteína rodeada de un solvente, como moléculas de agua. Entre muchos tipos diferentes de técnicas de simulación, la DM es la más utilizada para investigar las

propiedades estructurales, cinéticas y termodinámicas de las proteínas (Rizzuti, 2022).

La primera simulación de DM de una proteína globular (inhibidor de la tripsina pancreática bovina) se reportó en 1977 y duró 9,2 ps (McCammon et al., 1997). Esta proteína se simuló sin solvente, es decir, en el vacío. Posteriormente, en 1988, se simuló la misma proteína durante un tiempo mucho mayor (210 ps) y en medio acuoso (Levitt & Sharon, 1988). Desde entonces, ha habido un avance notable en el poder de cómputo, lo que permite ejecutar rutinariamente simulaciones en proteínas significativamente más grandes (Karplus & Kuriyan, 2005). Estas simulaciones se han utilizado para estudiar la función de las proteínas, su estabilidad, las interacciones proteína-proteína, las reacciones enzimáticas e interacciones fármaco-proteína, así como las proteínas de membrana (Sinha et al., 2022). En la siguiente figura (Figura 19) se muestra una representación de un sistema compuesto por una proteína globular solvatada en medio acuoso sometido a una simulación durante 100 ns.

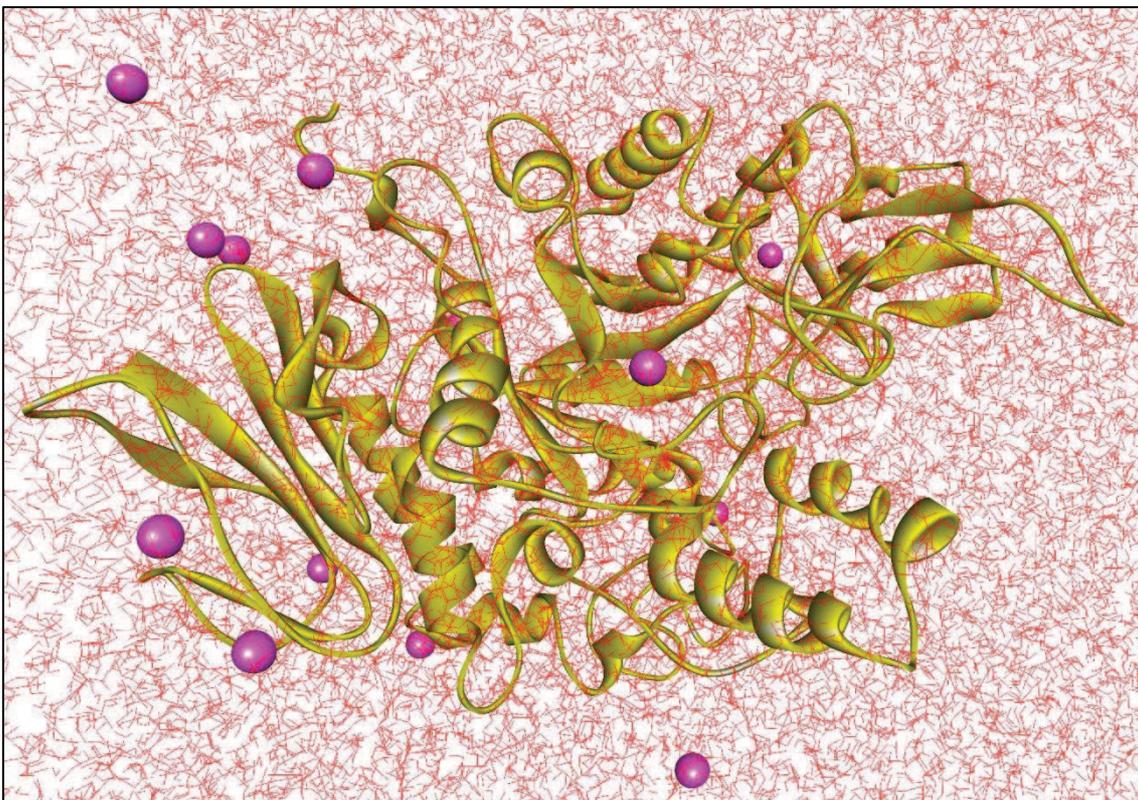


Figura 19: Simulación de una proteína en solución: modelo de α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (dorado) rodeada por $\approx 15,000$ moléculas de agua (rojo). El sistema de simulación consta de \approx

50 000 átomos, incluidos los iones de sodio (esferas). Imagen elaborada con el programa DS Visualizer (BIOVIA).

Para describir y predecir el comportamiento de las moléculas se utiliza la teoría de la mecánica clásica. El objetivo es resolver las ecuaciones de movimiento newtonianas para cada átomo en el sistema y obtener información sobre las propiedades y el comportamiento del sistema en función del tiempo. En esencia, es una técnica de muestreo de posiciones para un sistema multiatómico, que predice el movimiento de los átomos en función de las fuerzas interatómicas y las interacciones moleculares en las que están involucrados (Rizzuti, 2022).

Las fuerzas involucradas en el sistema se calculan utilizando un conjunto de expresiones matemáticas y parámetros que describen las interacciones entre los átomos, llamadas campo de fuerzas (CF). Estos campos incluyen los parámetros químicos y fisicoquímicos para los tipos de átomos del sistema, las interacciones intra e inter-atómicas, electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals, entre otros parámetros, que se utilizan para simular el sistema. La Ecuación 5 representa la forma funcional típica de un CF. Se describe la variación de la longitud y ángulo de enlace utilizando un potencial armónico, además del cambio de energía a medida que rota un enlace (potencial torsional), y un cuarto término representa las interacciones no-enlazantes. Para éstas últimas, se utiliza normalmente el potencial de Coulomb para las interacciones electrostáticas y el de Lennard-Jones para las de Van der Waals.

$$V(\mathbf{r}^N) = \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_{b,i}}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angulos}} \frac{k_{\theta,i}}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{\nu_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

(Ecuación 5)

Se han desarrollado diversos campos de fuerzas, agrupados en tres modelos moleculares principales: modelo todo-átomo (del inglés, *all-atom*), de grano grueso (CG, del inglés *coarse-grain*) y modelos mixtos *all-atom* / grano grueso.

El modelo molecular *all-atom* es el más detallado y preciso. En este enfoque, se representa cada átomo de la molécula de manera individual, teniendo en cuenta sus interacciones específicas. Esto permite una descripción más precisa de las propiedades estructurales y dinámicas de las biomoléculas. Sin embargo, debido a su nivel de detalle, estos modelos requieren un poder computacional más alto y pueden limitar el tamaño y el tiempo de simulación. Por otro lado, el modelo de grano grueso reduce la complejidad del sistema al agrupar varios átomos en unidades más grandes, conocidas como "granos". Estos granos representan regiones funcionales de la molécula, lo que permite una simulación a mayor escala (tanto en dimensiones de la molécula como en tiempo) con menor costo computacional. Aunque el modelo de grano grueso pierde parte de la resolución atómica, es útil para estudiar fenómenos moleculares en sistemas de que involucran un gran número de moléculas, como complejos de proteínas de membrana. Finalmente, los modelos mixtos combinan lo mejor de ambos enfoques. En estas simulaciones, se utilizan modelos *all-atom* para regiones críticas o detalladas de la molécula, mientras que se emplea un enfoque de grano grueso para las regiones menos relevantes o para reducir la carga computacional. Esto permite un equilibrio entre precisión y eficiencia computacional, siendo especialmente útil para estudiar sistemas más grandes y complejos (Sinha et al., 2022).

Para las simulaciones *all-atom* existen varios tipos de campos de fuerza disponibles, como AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS, entre otros. Cada uno tiene su propio conjunto de parámetros y aproximaciones, y su elección depende del sistema y las moléculas específicas que se estén estudiando. Para la simulación de proteínas y polipéptidos, el campo de fuerza más utilizado es el ff19SB de AMBER (junto con las versiones anteriores ff14SB y ff99SB) que fue parametrizado específicamente para estas biomoléculas y ha demostrado que reproduce con precisión datos experimentales como cambios químicos de RMN y estructuras cristalográficas (Tian et al., 2020; Maier et al., 2015). Para CG, uno de los modelos más populares es el campo de fuerza MARTINI para proteínas de membrana, en el cual varios átomos en la proteína y los lípidos se aproximan como una sola partícula, y cuatro moléculas de agua se tratan como una sola

partícula (conocido como mapeo de una partícula por cada cuatro, o 4:1), aunque las partículas pueden diferir en su polaridad o hidrofiliidad (Marrink et al., 2017).

La definición del CF que se aplicará a los componentes del sistema se realiza al momento de iniciar una simulación. Se definen también las velocidades y direcciones iniciales de los átomos, normalmente de manera aleatoria. Estas condiciones iniciales pueden basarse en estructuras experimentales o modelos teóricos. A partir de estas posiciones y velocidades iniciales, se integran las ecuaciones de Newton para calcular las trayectorias y las velocidades de los átomos al pasar de un momento determinado al siguiente, luego de transcurrido un salto de tiempo seleccionado para la simulación. Durante la simulación, se calculan las fuerzas entre los átomos en cada paso de tiempo utilizando los potenciales de fuerza previamente definidos (Hollingsworth & Dror, 2018). Además de las fuerzas interatómicas, se pueden tener en cuenta otros factores, como la temperatura y la presión, mediante la aplicación de técnicas de termostato y barostato que mantienen el sistema en condiciones controladas. Para el termostato, una técnica común es el termostato de Langevin, que aplica una fuerza estocástica a las partículas del sistema para simular la interacción con un baño térmico. Esto permite que el sistema alcance una temperatura deseada y se mantenga estable durante la simulación. Otra técnica popular es el termostato de Nose-Hoover, que utiliza una serie de grados de libertad adicionales para regular la temperatura. Este termostato ajusta las velocidades de las partículas en función de las desviaciones de la temperatura deseada, lo que permite un control más preciso (Ke et al., 2022).

En cuanto al barostato, se utilizan diferentes técnicas para controlar la presión en el sistema. Una de ellas es el barostato de Parrinello-Rahman, que aplica una tensión a la caja de simulación para mantener la presión deseada. Esta técnica ajusta las dimensiones de la caja y las velocidades de las partículas para lograr un equilibrio entre la presión interna y externa. Es muy común el uso de un barostato isotérmico-isobárico (NPT), que combina el control de temperatura y presión en una sola simulación mediante la aplicación de un termostato y un barostato simultáneamente (Ke et al., 2022).

Una simulación determinada puede realizarse utilizando diversas plataformas y conjuntos de algoritmos específicos para tal fin, como GROMACS, AMBER, vCHARMM, DL_POLY, NAMD o LAMMPS. A continuación, se resumen los pasos principales de un protocolo para realizar una simulación de DM de un sistema enzima-ligando (Braun et al., 2019):

1. **Preparación del sistema y parametrización:** El primer paso es la preparación del sistema de interés. Normalmente se parte de un modelo tridimensional obtenido mediante técnicas experimentales de resolución de estructura como la cristalografía de rayos X, o proveniente de otro estudio computacional como modelado o *docking* molecular. A esta estructura se le aplica el campo de fuerza seleccionado. De esta manera, se genera un archivo que contiene la información sobre átomos, tipos de enlaces y parámetros que empleará el algoritmo para realizar los cálculos de energía durante la simulación, llamado topología del sistema (Ramos et al., 2021).

En este paso se suele realizar también el proceso de solvatación del sistema, para los casos en los que se quiera el estudiar el comportamiento de moléculas o macromoléculas en agua o algún otro solvente. Se debe definir un contenedor virtual para el sistema llamado caja de simulación, que pueden presentar distintos tamaños y geometrías (cúbica, octaedro truncado, dodecaedro rómbico o prisma hexagonal). Dentro de este contenedor se encuentra el sistema a estudiar y, a través de un algoritmo, se adicionan las moléculas de solvente rellenando la caja. El solvente puede haber sido creado específicamente para la simulación que se quiere realizar o, más comúnmente, se utiliza un modelo predeterminado de moléculas de agua, como el modelo TIP3P (del inglés, *Transferable Intermolecular Potential 3 Points*). Se trata de un modelo de tres puntos rígido ampliamente empleado para biomoléculas y el más empleado en el caso de simulaciones AMBER por su compatibilidad con estos campos de fuerza (Harrach et al., 2014; Florová et al., 2010). También se pueden adicionar iones y contraiones para crear condiciones específicas para la simulación.

La definición de la caja de simulación implica la imposición de un límite (borde) para el movimiento de las moléculas, y la interacción con los bordes

puede ser determinante para los resultados de la simulación. Para evitar perturbaciones debidas al efecto del borde se aplican, durante la simulación, condiciones periódicas de contorno (CPC). Esta técnica permite simular sistemas infinitos o extensos mediante la repetición periódica de una caja de simulación finita. De esta manera, se simula el sistema como un sistema ficticio que se extiende indefinidamente en todas las direcciones. Cuando un átomo atraviesa un límite de la caja de simulación, aparece en el lado opuesto como si fuera una imagen reflejada. Esto se logra aplicando transformaciones a las coordenadas de las partículas para asegurar que se mantengan dentro de la caja principal. La geometría de la caja que se seleccione no tiene grandes implicancias en el comportamiento del sistema (Wassenaar & Mark, 2005).

2 **Minimización:** Una vez definida la topología del sistema, se le aplica una minimización energética (también llamada relajación) para eliminar choques estéricos u otras irregularidades estructurales. El objetivo es encontrar configuraciones del sistema que representen puntos mínimos de energía potencial, es decir, estados estables. La energía potencial es una función multi-dimensional de las coordenadas, conocida como superficie de energía potencial. La función de energía potencial presenta, en general, varios mínimos locales y uno global (Braun et al., 2014).

Para encontrar un mínimo, el algoritmo más comúnmente utilizado, tanto en dinámica molecular como en protocolos de *machine learning*, es el algoritmo de descenso de gradiente (del inglés, *steepest descent*). Este algoritmo se basa en calcular y seguir la dirección del gradiente negativo de la energía potencial del sistema para encontrar mínimos locales. El proceso implica iteraciones en las que se actualizan las posiciones de las partículas en función del gradiente negativo de la energía. En cada iteración, se calcula el gradiente de la energía respecto a las coordenadas de las partículas y se realiza un paso (modificación de las posiciones) en la dirección opuesta al gradiente multiplicado por un factor. Este factor se ajusta luego para controlar la velocidad de convergencia y evitar oscilaciones indeseadas. Este algoritmo es ampliamente utilizado debido a su eficacia y fácil implementación. Sin embargo, en sistemas más complejos y con superficies de energía potencial rugosas, puede ser necesario recurrir a

algoritmos más avanzados, como ser el método del gradiente conjugado, que es más eficaz en la zonas de mínimo (Mackay et al., 1989). En algunos casos, se pueden aplicar enfoques más sofisticados que combinen la minimización de energía con otros métodos de optimización, como el recocido simulado (del inglés, *simulated annealing*) o el muestreo Monte Carlo, para explorar el espacio conformacional de manera más eficiente y evitar mínimos locales (Nayeem et al., 1991).

En la Figura 20 A se muestra un ejemplo de minimización energética para todos los átomos de un sistema aplicando un protocolo de minimización combinado de descenso de gradiente y gradiente conjugado con 1000 iteraciones.

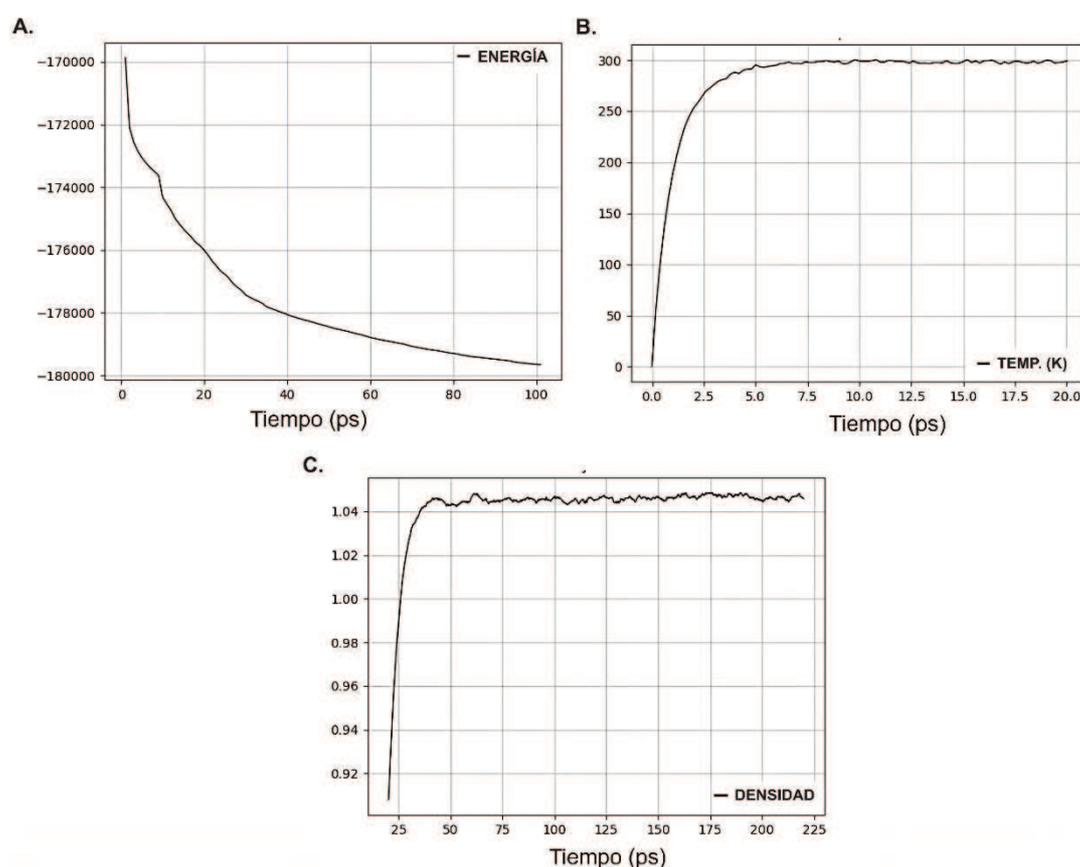


Figura 20: Procesamiento del sistema previo a la corrida de producción de una simulación de dinámica molecular. **A.** Disminución de la energía total del sistema luego de una minimización de 100 ps **B.** Ajuste progresivo de la temperatura hasta 300 K mediante una termalización de 20 ps **C.** Corrección de la densidad del sistema en una fase de equilibrado de 200 ps.

3 **Termalización:** Luego de definir la topología del sistema y asignar velocidades iniciales, se suele aumentar gradualmente la temperatura inicial para establecer una distribución adecuada de energía cinética entre las partículas. Para esto se selecciona y aplica un termostato y se somete el sistema a una simulación breve, donde la temperatura se incrementa de manera controlada y gradualmente desde un valor inicial hasta la temperatura de equilibrio deseada, de manera de ayudar al sistema acomodarse al salto térmico total (Gallo et al., 2009). Esto facilita que las propiedades y comportamientos observados luego en la simulación sean representativos de las condiciones termodinámicas deseadas evitando ciertas desviaciones debidas a una inicialización inadecuada del sistema. Los programas utilizados como AMBER o LAMMPS incluyen módulos específicos para realizar el paso de termalización. En la Figura 20 B se muestra un ejemplo de la variación de la temperatura luego de una termalización de 20 ps para alcanzar una temperatura de 300 K.

3. **Equilibrado:** Una vez que se llevó el sistema a la temperatura de interés, se realiza una simulación breve (aprox. 1 ns) bajo condiciones similares a las que se utilizarán en la simulación de mayor duración (corrida de producción). Este paso se conoce como equilibrado del sistema. Aquí, la temperatura y la presión son constantes, y el objetivo principal es lograr que el sistema ajuste su densidad, que normalmente aumenta progresivamente luego de cada salto de tiempo hasta llegar a un valor de equilibrio (Braun et al., 2014). En la Figura 20 C se muestra un ejemplo de ajuste de la densidad del sistema en una fase de equilibrado de 200 ps.

4. **Corrida de producción:** Una vez que el sistema se encuentra a la temperatura y densidad indicadas, se puede ejecutar la corrida de producción. Esta fase es la de mayor duración y costo de cálculo, siendo una corrida típica a partir de los 100 ns. A partir de los resultados de esta fase se derivan las conclusiones y análisis principales del experimento computacional.

En esta etapa, las condiciones de simulación no difieren de las utilizadas en la fase de equilibrado, por lo que se podría pensar que estas dos fases pueden juntarse en una sola. En realidad, el ajuste de la densidad no puede ocurrir en la mayoría de las corridas de producción por el tipo de *hardware* que se utiliza para

realizarlas. Por el alto costo de cómputo que implican, para las simulaciones de varios ns los programas actuales aplican módulos que les permiten derivar parte de los cálculos a la *Graphics Processing Unit* o GPU. Para tal fin, el paquete AMBER lanzó en 2011 su módulo `pmemd.cuda`, que desde entonces ha sido perfeccionado para replicar eficazmente los resultados que se obtienen al ejecutar todos los cálculos en la CPU (del inglés, *Central Processing Units*) (Lee et al., 2018). Ambas unidades tienen diferencias fundamentales en su estructura de cálculo, siendo la GPU más rápida en términos de poder de cálculo crudo (Friedrichs et al., 2009). De todas maneras, algunas operaciones sólo las realiza de manera correcta la versión del código que emplea la CPU. Una de éstas es la corrección de la densidad del sistema, ya que el código para simular en GPU no reorganiza automáticamente las celdas de la cuadrícula. Es por esto que la fase de equilibrado debe ejecutarse utilizando el código tradicional que realiza cálculos sólo con la CPU para luego correr la fase más larga de la simulación utilizando el código adaptado a la GPU.

5 **Análisis:** Finalmente, se analizan los resultados de la corrida de producción. A lo largo de la simulación, el programa registra sistemáticamente la disposición espacial y velocidad de todos los átomos luego de un determinado número de pasos indicado por el usuario. Esto resulta en un número de estructuras llamadas trayectorias que tienen una relación secuencial y permiten estudiar la evolución del sistema. Sobre las trayectorias se aplican una serie de análisis para extraer resultados y elaborar conclusiones sobre las propiedades dinámicas del sistema.

De todas maneras, se debe inicialmente evaluar la calidad del modelo dinámico obtenido a partir de la simulación. Para esto se evalúan una serie de variables como la evolución de la energía cinética y total, temperatura y presión a lo largo de la simulación, para las cuales se busca que mantengan valores estables en el tiempo. Además de éstas (que se evalúan de manera estándar también en las etapas de preparación) el interés principal para una corrida de producción es lograr que los cambios conformacionales que ocurren por interacción entre los átomos conduzcan a una estructura o un conjunto de estructuras estables para elaborar conclusiones a partir de ellas.

La variable más utilizada para evaluar los cambios estructurales de macromoléculas luego de una simulación es la desviación cuadrática media RMSD (del inglés, *Root-mean-square deviation*) de las coordenadas atómicas, que es una medida de la distancia promedio entre todos los átomos de dos estructuras, que son, normalmente, la estructura inicial de referencia y la obtenida luego de un determinado tiempo de simulación y tiene unidades de distancia (Å típicamente). Se puede calcular utilizando programas que aplican la siguiente ecuación sobre los átomos del sistema (Ecuación 6), donde x_i e y_i son las coordenadas del átomo i y el átomo en la estructura de referencia correspondiente, con N siendo el número total de átomos en el sistema (Kumar et al., 2021):

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |x_i - y_i|^2} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Cuando se analiza la evolución del RMSD a lo largo del tiempo de simulación, es deseable que éste alcance la convergencia entorno a un determinado valor, lo que es indicio de que los cambios estructurales condujeron el sistema hacia un punto de estabilidad estructural. En Figura 21 se muestra un ejemplo de gráfico de RMSD para diversas proteínas en agua, producto del trabajo Zhang et al. (2019). Aquí se observa, por ejemplo, que la estructura de la proteína salvaje (en inglés, *wild-type* o *wt*) (C1C2-WT) se estabiliza luego de unos 200 ns de simulación, pasando una fase de acomodamiento estructural entre los 75 y 175 ns aproximadamente. Al contrario, otras proteínas como la ER-TC sufren cambios conformacionales (variaciones o saltos en los valores de RMSD) aún luego de los 250 ns.

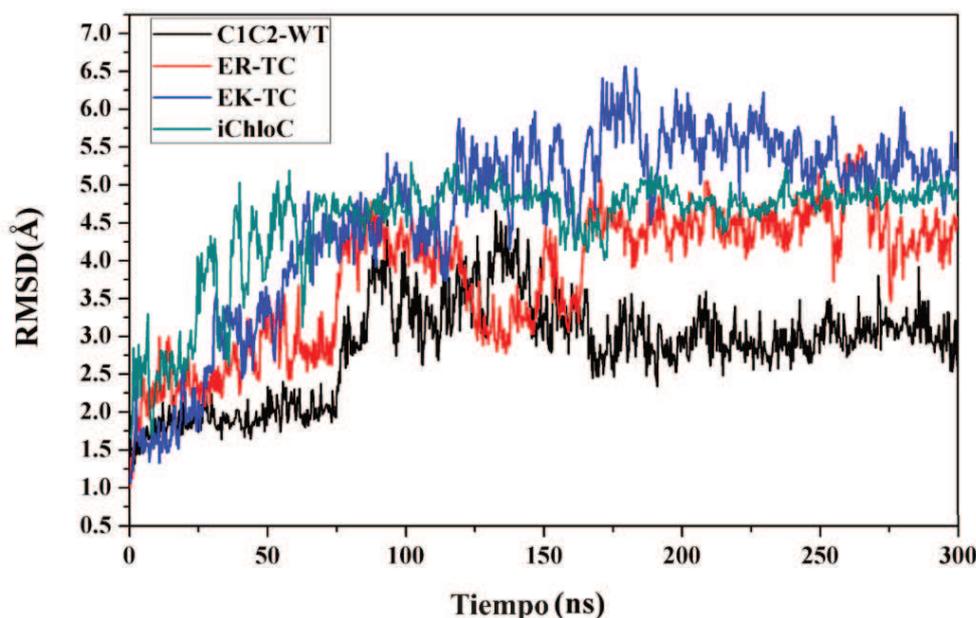


Figura 21: Desviación cuadrática media (RMSD) vs. tiempo de simulación de una serie de proteínas químicas estudiadas por Zhang et al., 2019 (figura adaptada).

Con respecto a los cambios conformacionales del sistema simulado, es importante conocer el comportamiento de ciertos residuos específicos. Aun cuando el gráfico de RMSD indica una convergencia estructural, ciertas zonas de la macromolécula o del complejo pueden presentar variaciones. Esto es común en las zonas de *loops*. Para encontrar estos sitios de mayor variación puntual se recurre al cálculo de otra variable cuyo cálculo es similar al del RMSD, pero muestra la variación de residuos específicos, llamada fluctuación cuadrática o RMSF. Este análisis permite observar la movilidad promedio del *backbone* de cada residuo a lo largo de la dinámica y se realiza con Ecuación 7, donde t es el número de estructuras a evaluar, T el número total de estructuras, t' es la estructura de referencia y r es la posición del átomo a evaluar. Los valores calculados para cada residuo suelen graficarse junto con el número de residuo para evidenciar zonas de mayor o menor movilidad.

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^T |r(t) - r(t')|^2}{T}} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

La Figura 22 muestra el RMSF en función del número de residuo obtenido por Kumar et al. (2021) al simular la enzima anhidrasa carbónica SazCA a diferentes temperaturas. Este análisis les permitió identificar seis residuos

altamente flexibles (98, 99, 100, 101, 145 y 207) que fueron destacados por la mayor flexibilidad y degradación estructural de SazCA a temperaturas elevadas.

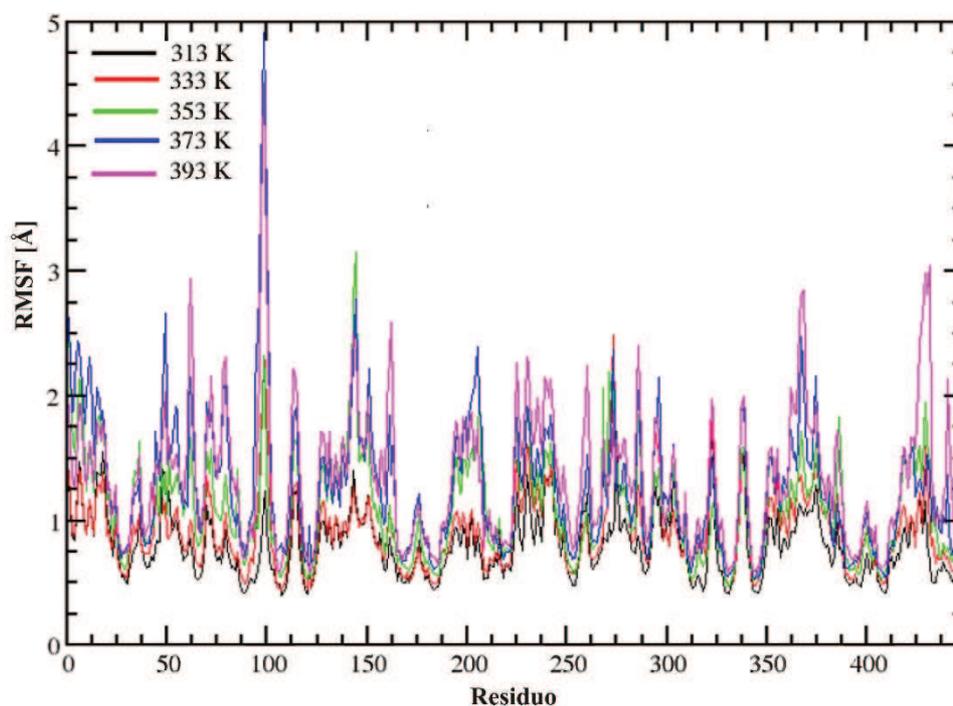


Figura 22: RMSF de la anhidrasa carbónica SazCA simulada a diferentes temperaturas. Adaptado de Kumar et al. (2021).

Una vez que se evaluó si el sistema alcanza cierta estabilidad estructural con la simulación, se procede a realizar análisis más específicos que apunten a elaborar las conclusiones para las cuales se llevó a cabo el experimento. Los análisis que se pueden realizar son muy numerosos y dependen mucho del fenómeno que se pretende estudiar. Un primer análisis es la observación visual de la evolución del sistema. Este puede realizarse empleando un programa de visualización de trayectorias como el Visual Molecular Dynamics (VMD) desarrollado por la Universidad de Illinois (Humphrey et al., 1996). Normalmente se busca evaluar el comportamiento de determinados átomos o moléculas a lo largo de la simulación, en particular de los que involucran interacción enzima-ligando cuando se trata de un inhibidor enzimático. Para evaluar esta interacción se puede medir la evolución de la distancia entre dos particulares átomos o entre un átomo y un residuo, por ejemplo, además de la evolución de la formación de

puentes de hidrógeno utilizando módulo donde se suele indicar el ángulo y distancia para determinar la presencia o ausencia de un puente (Omar, 2020).

Un tipo de análisis muy útil a los fines de comprender la interacción enzima-ligando es el cálculo de la energía libre teórica de interacción (ΔG), ya que es una medida de la fuerza de atracción entre ambas moléculas y puede estimarse de manera global o de manera específica para cada residuo involucrado en la interacción.

Existen diversos métodos para realizar este cálculo, siendo los más comunes el método MM/GBSA (del inglés, *molecular mechanics generalized Born surface area*) y el MM/PBSA (del inglés, *molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area*), que normalmente calculan una energía promedio utilizando un conjunto de estructuras tomadas a partir de una trayectoria estabilizada. Ambos pueden realizarse utilizando el paquete AMBER. Estos métodos permiten estimar la afinidad de unión entre el enzima y el inhibidor. Ambos involucran un enfoque de mecánica molecular para calcular la energía de interacción entre las moléculas del sistema y un solvente implícito. El método MM/GBSA se basa en una descomposición de la energía libre de Gibbs en términos de energías de enlace, energías de solvatación y términos entrópicos. Por otro lado, el método MM/PBSA utiliza una aproximación similar, pero incorpora cálculos basados en el modelo de solvente Poisson-Boltzmann, que implica resolver la ecuación correspondiente que demanda mayor tiempo de cómputo. Esto no implica que el método MM/PBSA ofrezca mejores resultados, ya que esto depende del sistema en particular y se ha demostrado que en muchos casos el método MM/GBSA resulta más preciso (Hou et al., 2011; Yang et al., 2011; Genheden & Ryde, 2015).

1.4.3.2. Clustering

Para analizar la configuración de un sistema luego de una simulación, es práctico poder disponer de una estructura particular sobre la cual elaborar conclusiones, pero las estructuras que se generan con dinámica molecular son muchas y distintas entre sí. Por este motivo, se recurre a algoritmos que permiten identificar las configuraciones más probables adoptadas por el sistema durante

una corrida de producción, además de subconjuntos estructurales relevantes, normalmente asociándolas en grupos (en inglés, *clusters*) según su similitud, siempre partiendo de estructuras extraídas dentro de una región estabilizada de la simulación. Los algoritmos que se pueden emplear para un análisis de *clustering* son muchos, tienen distintas características y no son propios de la química computacional, ya que se emplean ampliamente en otros campos de la bioinformática y el *machine learning* (Abramyan et al., 2016).

Uno de los métodos de *clustering* más utilizados es el método k-means. Este algoritmo agrupa un conjunto de datos (en este caso coordenadas atómicas) en k grupos distintos. El objetivo es minimizar la distancia entre los puntos dentro de cada grupo y maximizar la distancia entre los grupos. El algoritmo comienza seleccionando k centros iniciales de manera aleatoria y luego asigna cada punto al grupo cuyo centro esté más cercano. A continuación, se actualizan los centros de cada grupo tomando como referencia los puntos asignados. Este proceso se repite iterativamente hasta que se alcanza un criterio de convergencia, generalmente cuando la asignación de puntos ya no cambia significativamente. Al final, se obtienen k grupos que representan conjuntos de puntos similares (De Paris et al., 2015).

El método k-means es muy utilizado debido a su simplicidad y eficiencia computacional. Sin embargo, su resultado puede depender mucho de la inicialización de los centros y converger a óptimos locales en lugar de la solución global óptima. Por este motivo y según las características cada simulación en particular, se pueden emplear métodos superiores como el *clustering* jerárquico, que construye una jerarquía de *clusters* mediante la agrupación sucesiva de puntos o grupos similares (De Paris et al., 2015). Estos algoritmos son utilizados ampliamente también en las técnicas de *screening* virtual y de *docking* molecular, como se verá a continuación.

1.4.3.3. Docking molecular

Otra herramienta computacional extensamente empleada en farmacología es el *docking* molecular, que comparte algunos algoritmos con la dinámica molecular, aunque su uso tiene una aplicación más específica. Esta

técnica se utiliza para predecir y analizar la interacción entre una molécula (ligando) y una macromolécula (generalmente una proteína). El objetivo principal del *docking* molecular es determinar cómo se unen y se encajan el ligando y la proteína a nivel tridimensional, prediciendo la afinidad y la geometría de la interacción. Se utilizan algoritmos y métodos de muestreo que evalúan diferentes conformaciones y orientaciones del ligando en el sitio de interés de la proteína para encontrar la interacción más probable (Meng et al., 2011). Mientras que la DM simula el movimiento y la dinámica de las moléculas, los estudios de *docking* se enfocan en el análisis de la interacción específica entre una molécula y una macromolécula objetivo, utilizando modelos ampliamente parametrizados y aplicando rigidez a las moléculas para reducir la dificultad de cómputo, en comparación con las simulaciones de DM. La implementación principal que tienen estos algoritmos es en estudios de *screening* virtual de bibliotecas de compuestos o en la predicción de configuraciones de unión de ligandos para los casos en los que no se dispone de estructuras experimentales para el complejo.

El *docking* molecular es una combinación de dos procesos: uno en el cual se realiza la exploración del espacio conformacional (que incluye todas las configuraciones posibles del complejo ligando-receptor) mediante la implementación de algoritmos de muestreo (función de búsqueda); y otro con el cual se evalúa la afinidad de unión de cada complejo (pose o modo de unión) y se asigna un puntaje (*score*) a cada pose, para poder seleccionar las más probables entre las predichas (mayor puntaje). A pesar de ser algoritmos diferentes, pueden estar significativamente correlacionados debido a que las funciones de puntaje a menudo guían el método de muestreo (Crampon et al., 2022). Los métodos de muestreo pueden ser sistemáticos o estocásticos. En los sistemáticos, el muestreo se realiza en intervalos predefinidos y de manera determinística. En los estocásticos, en cambio, la exploración del espacio conformacional es aleatoria, y el algoritmo realiza alteraciones en ciertas variables del sistema hasta cumplir con una condición establecida por el usuario. También se pueden clasificar como métodos globales, que buscan configuraciones con el mínimo global de energía dentro del espacio de muestreo definido; y métodos locales, que se centran en encontrar mínimos energéticos cercanos a la conformación inicial (Huang & Zou, 2010).

La función de puntaje, también conocida como función de energía o función de afinidad, es una medida cuantitativa que evalúa la calidad de la interacción entre el ligando y el receptor en una determinada conformación. Esta función calcula un puntaje que refleja la energía o el grado de complementariedad entre las superficies de interacción del ligando y el receptor. El objetivo de la función de puntaje es discriminar entre las conformaciones del ligando y seleccionar aquellas que tienen una mayor probabilidad de representar la conformación de unión correcta. Las funciones de puntaje pueden basarse en términos de energía, solvatación, fuerzas estéricas, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, entre otros (Jain, 2006).

1.4.3.4. Método HADDOCK

Existen múltiples programas y procedimientos para realizar un estudio de *docking*, así como servidores y servicios para ejecutarlos de forma *on-line*. Para el *docking* de pequeñas moléculas con proteínas, uno de los programas más empleados es el AutoDock Vina desarrollado por el Center for Computational Structural Biology (California, USA) (Eberhardt et al., 2021). Para interacción péptido-péptido, proteína-péptido o proteína-proteína, en cambio, es muy utilizado un método de *docking* especializado para complejos macromoleculares (Saponaro et al., 2020), llamado HADDOCK (del inglés, *High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*) desarrollado por el Computational Structural Biology (Utrecht, Países Bajos) (Dominguez et al., 2003), que está disponible a través de un portal web.

La aplicación especial de HADDOCK para interacciones proteína-proteína se relaciona con los fundamentos del método. El *docking* proteína-péptido o proteína-proteína suele ser más desafiante que el de pequeñas moléculas debido a la mayor flexibilidad y número de grados de libertad involucrados. HADDOCK ha demostrado su alto rendimiento y confiabilidad para abordar estos desafíos (Vangone et al., 2016). Este algoritmo emplea información experimental como restricciones a interacciones ambiguas al momento de realizar el muestreo. El procedimiento incluye una etapa de orientación inicial aleatoria de los complejos de proteínas en el sitio de unión (seleccionado por el usuario), seguido de una minimización energética, donde las moléculas se tratan como

cuerpos rígidos (etapa *it0*), lo que resulta en la generación de 1000 estructuras complejas, para luego proseguir con una simulación semi-flexible de los 200 mejores modelos realizando un Recocido Simulado (*Simulated Annealing*) en el espacio de torsión (etapa *it1*). Este último algoritmo, que es ampliamente utilizado en modelado molecular, consiste en elevar la temperatura progresivamente para descontracturar las estructuras, para luego volver a enfriar el sistema y dejarlo reacomodar. Finalmente, se realiza un refinamiento de los modelos teniendo en cuenta la presencia de agua como solvente explícito (etapa *water*). En esta etapa se permite a las cadenas laterales de los aminoácidos moverse libremente. Las configuraciones finales se puntúan según una combinación lineal de términos energéticos y empíricos cuyos pesos dependen de la etapa del protocolo de HADDOCK (Ecuación 8 a,b,c). El cálculo combina interacciones electrostáticas (*Eelec*) y de Van der Waals (*Evdw*) del campo de fuerzas OPLS, con una estimación de la superficie accesible del solvente (BSA por *buried surface area*), así como términos empíricos relacionados con la desolvatación (*Edsolv*) y las restricciones impuestas (*EAIRs*).

a. *it0*: score = 0.01 *EvdW* + 0.1 *Eelec* + 1.0 *Edesolv* - 0.01 BSA + 0.01 *EAIR* (Ecuación 8a)

b. *it1*: score = 1.0 *EvdW* + 1.0 *Eelec* + 1.0 *Edesolv* - 0.01 BSA + 0.1 *EAIR* (Ecuación 8b)

c. *water*: score = 1.0 *EvdW* + 1.0 *Eelec* + 1.0 *Edesolv* + 0.01 *EAIR* (Ecuación 8c)

El HADDOCK es un ejemplo de algoritmo de *docking* molecular que se puede clasificar como semi-rígido (o semi-flexible). En este tipo de protocolos, que se diferencian de los de *docking* rígido, se permite el movimiento o flexibilidad de ciertas regiones, normalmente del receptor, como ocurre en simulaciones de DM (Andrusier et al., 2009). Si bien esto afecta el costo computacional del estudio, mejora la predicción, especialmente para macromoléculas. Las pequeñas moléculas suelen tener estructuras más rígidas, pero las macromoléculas como proteínas y péptidos tienen muchos grados de libertad para el movimiento de, por ejemplo, las cadenas laterales de los aa. El programa HADDOCK permite asignar flexibilidad a residuos específicos indicados por el usuario al momento de configurar la predicción. Para el caso en el que el ligando es un péptido, se puede establecer flexibilidad tanto en residuos específicos del receptor como en los del ligando, lo que permite mejorar el modelo.

1.4.3.5. Combinación de DM y *docking*

La DM y el *docking* son dos enfoques complementarios en la investigación y el diseño de fármacos. En este proceso, es muy común el uso de la DM para corroborar y perfeccionar predicciones realizadas mediante cálculos de *docking* (Sakano et al., 2016). El *docking* es específico para predecir configuraciones de unión de un ligando, pero se centra en las interacciones moleculares en un momento específico y en estructuras rígidas o semirígidas, mientras que la DM simula el movimiento y la evolución del sistema a lo largo del tiempo. Al combinar ambas técnicas, se pueden examinar los cambios conformacionales de la predicción de unión realizada mediante el *docking*, su estabilidad y la dinámica de las interacciones, y obtener información adicional sobre la energía libre de unión. Además, se pueden ajustar los modelos predichos. Cavalli et al. (2004), por ejemplo, demostraron que una serie de simulaciones *all-atom* de sólo 2,5 ns utilizando el campo de fuerza AMBER, fueron capaces de discriminar entre complejos estables y no estables obtenidos por *docking* molecular, luego de compararlos con las respectivas estructuras experimentales. Estos autores estudiaron el caso de la unión del inhibidor no competitivo de la enzima hAChE en el PAS. Resultados similares fueron obtenidos por Park et al. (2004) al estudiar los complejos formados por las enzimas CKD2 y CKD4 con inhibidores enzimáticos. En este caso, la DM fue efectiva para determinar la mayor estabilidad de los complejos formados por la CKD4 con los inhibidores en comparación con los formados por la CKD2, debida a una menor accesibilidad del solvente en esta última. Este trabajo es ejemplo del gran potencial de las simulaciones de DM para estudiar comportamientos dinámicos en comparación con estudios de *docking*, ya que la accesibilidad del solvente en las estas variantes de las enzimas CKD depende de la diferente flexibilidad de una región de *loop*.

Finalmente, además de mejorar el estudio de la estabilidad de un complejo, la DM aplicada a resultados de *docking* permite mejorar la estimación de la energía de unión para el complejo-receptor ligando. Las funciones de puntuación de los programas de *docking* ofrecen muchas veces una estimación de esta energía, pero se trata cálculos limitados debido, principalmente, a la

escasa exploración del espacio conformacional y a las aproximaciones relativas al solvente. Liu et al. (2022) compararon las predicciones realizadas por métodos basados en *docking* y DM con valores experimentales para una variedad de complejos. Si bien encontraron buenas correlaciones para las predicciones basadas en *docking* en complejos de inhibidores de las enzimas CDK8, c-Met, Eg5 y TNKS2, con valores de R de Pearson entre 0.394 y 0.852, el muestreo adicional proporcionado por la simulación de dinámica molecular (MD) condujo a una mejora significativa en la estimación.

OBJETIVOS

Diseño, síntesis y evaluación de péptidos con capacidad inhibitoria de enzimas involucradas en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo, mediante estrategias químicas, biotecnológicas y computacionales, de compuestos peptídicos y derivados con potencial terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras patologías que causan deterioro cognitivo.

2.2. Objetivos específicos

- Diseñar y sintetizar mediante la química Fmoc, quimiotecas de análogos peptídicos y peptidomiméticos partiendo de péptidos con comprobada actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BChE, principales blancos moleculares en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de los péptidos sintetizados y determinar las características cinéticas de su inhibición frente a la enzima modelo EeAChE: tipo de inhibición, constante cinética de inhibición K_i y reversibilidad de la inhibición.
- Realizar estudios teóricos de *docking* flexible y simulaciones de dinámica molecular con los péptidos de mayor interés, a fin de comprender mejor sus características inhibitorias y plantear las modificaciones químicas más convenientes.
- Extender los estudios de inhibición, tanto experimentales como computacionales, a las humanas de AChE y BChE expresadas de manera recombinante.
- Estimar la toxicidad de los análogos de mayor interés, para mejorar el conocimiento sobre su potencial uso terapéutico.

- Evaluar otras propiedades de interés para compuestos frente a la enfermedad de Alzheimer y otras patologías neurodegenerativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño y síntesis de las moléculas

3.1.1. Estrategia de diseño racional de análogos

Inicialmente, se tomó el péptido Hp-1935 de 19 aa, aislado y caracterizado previamente por el grupo de trabajo (Siano et al., 2014) como secuencia de base para la generación de análogos peptídicos. De esta manera, se diseñaron y evaluaron una serie de análogos más cortos con el objetivo de determinar la porción responsable de la actividad inhibitoria. De esta manera, se buscó obtener una secuencia más corta para luego mejorar la actividad a partir de sustituciones aminoacídicas.

Se consideró al péptido Hp-1935 como una buena secuencia para la generación de análogos debido a que en estudios previos había mostrado una moderada actividad inhibitoria de la AChE y baja toxicidad en ensayos de hemólisis y en células (Sanchis et al. 2020).

Para determinar la porción responsable de la actividad inhibitoria de Hp-1935, se diseñaron y evaluaron frente a la AChE cinco secuencias con una estrategia de desplazamiento de secuencia (del inglés, *sequence-shift*), con un desplazamiento de dos aa, para obtener un péptido correspondiente a cada porción de 10 aa de Hp-1935.

Luego, para diseñar los análogos de sustitución a partir de la porción activa de Hp-1935 y mejorar su actividad, se modeló su interacción con la enzima de manera computacional, llevando a cabo estudios de *docking* flexible, simulaciones de DM y análisis energéticos de tipo MM/GBSA. A partir de estos estudios, se propusieron modificaciones a la secuencia aminoacídica para mejorar la interacción con la enzima.

3.1.2. Síntesis en fase sólida (SPPS) por química Fmoc

Todos los péptidos estudiados se sintetizaron químicamente como amidas en el C-terminal mediante Fmoc-SPPS usando una resina Rink SS 1% divinilbenceno (DVB) (Advanced Chemtech, USA), con una capacidad de 0,7 mmol/g. Su estructura se muestra en Figura 23. Las reacciones se realizaron empleando como reactores jeringas de polipropileno, con disco filtrante de poliamida (CSPS Pharmaceuticals Inc, USA).

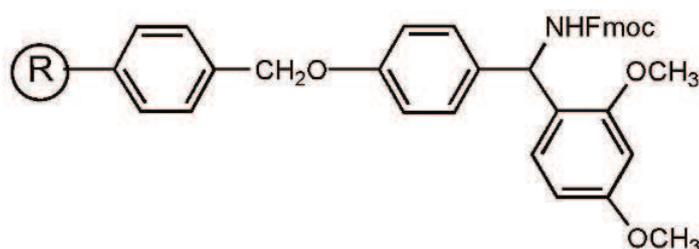


Figura 23: Estructura química de la resina utilizada para la síntesis en fase sólida de los péptidos.

Se realizó también la síntesis del péptido A β ₄₀, para la cual se empleó una resina H-Rink amide ChemMatrix (Sigma-Aldrich, Merck, USA) con una capacidad de 0,64 mmol/g, cuya estructura se muestra en Figura 24. Las resinas ChemMatrix están basadas en monómeros de polietilenglicol (PEG) unidos exclusivamente con enlaces éter primarios y con un elevado entrecruzamiento mediante *linkers*, que se emplean para obtener una pureza bruta mejorada en la síntesis de péptidos largos, complejos o hidrofóbicos en comparación con las resinas de poliestireno (Marani et al., 2017).

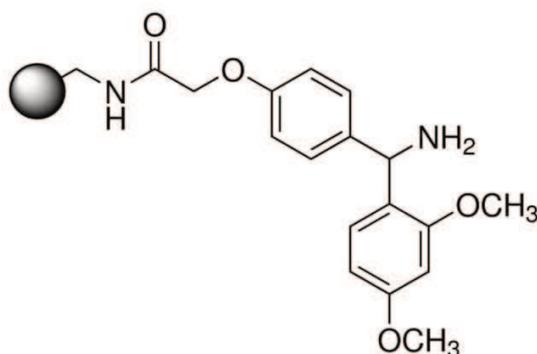


Figura 24: Estructura química de la resina ChemMatrix utilizada para la SPPS del péptido A β ₄₀.

Los Fmoc- α -aminoácidos fueron adquiridos de Calbiochem-Novabiochem, Corp (California, USA) y Fluka (USA). Se emplearon los siguientes derivados: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH y Fmoc-4-fluoro-L-Phe. Todos los aminoácidos utilizados fueron del tipo L-aminoácidos.

Como solvente se utilizó N,N-dimetilformamida (DMF), solvente aprótico con alta capacidad solvatante, previamente purificada por destilación fraccionada a presión reducida y conservada sobre tamices moleculares. Este solvente no debe contener agua o aminas, ya que el agua produce la hidrólisis de la DMF y la presencia de mínimas cantidades de aminas libres en el solvente puede afectar la síntesis. La ausencia de aminas se evaluó mediante la reacción de Sanger (*).

Al comienzo de cada jornada de síntesis se solvató la resina con DMF. Las desprotecciones del grupo Fmoc del α -amino se realizaron con piperidina al 20% en DMF, conservada sobre tamices moleculares. Los acoplamientos se realizaron con TBTU en presencia de HOBt y DIEA, en DMF. Estos reactivos permiten activar la función ácido carboxílico de cada aminoácido a acoplar para lograr la formación del enlace peptídico. Las cantidades de aminoácido empleado y de activadores se calcularon en función de los miligramos de resina utilizada y considerando un exceso del 100% para favorecer el acoplamiento. La solución para el acoplamiento fue preparada previo a la reacción de acoplamiento. Durante esta etapa, la resina se mantuvo homogéneamente suspendida en la mezcla de reacción mediante agitación suave durante 40 - 60 min, repitiéndose el acoplamiento en caso de ser necesario. A fin de eliminar el

(*) Reacción de Sanger: Para este ensayo, se agregaron 3,5 μ l de 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) a 5 ml de etanol absoluto. Se mezclaron 1 ml de este reactivo con igual volumen de DMF a testear y se incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Paralelamente se incubó un blanco del reactivo. La presencia de aminas se detecta por el desarrollo de un color amarillo en la solución debido a la formación de la 2,4-dinitrofenilamina.

exceso de reactivos y subproductos de reacción, luego de cada etapa, se realizaron lavados con DMF.

El éxito de las reacciones de acoplamiento y desprotección en cada ciclo de síntesis fueron evaluadas cualitativamente mediante reacción de ninhidrina (test de Kaiser), que permite detectar con alta sensibilidad la presencia de grupos aminos libres. Se repitieron los acoplamientos cuando con esta reacción se obtuvo un resultado positivo (color azul) por formación del azul de Ruhemann (Pires et al., 2014; Friedman et al., 2004). Para esta prueba, luego de los lavados en las etapas mencionadas, se toma una pequeña porción de la resina y se lava con gotas de metanol. Luego, se agrega una gota de cada uno de los siguientes reactivos: Reactivo A (ninhidrina al 5 % en etanol absoluto), Reactivo B (8:2 de fenol en etanol absoluto), y Reactivo C (piridina). El tubo de reacción se calienta a 110 °C durante 5 min. Además, se realiza un blanco sin resina. La reacción positiva coincide con la aparición de color azul indicativo de aminos libres.

Finalizada la síntesis, se quitó el Fmoc del α -amino del último aminoácido incorporado, se lavó la resina con DCM y se secó en desecador al vacío. La separación de la resina y la eliminación de los protectores se realizó con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de *scavengers*, que atrapan las especies intermediarias catiónicas que se forman durante la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales. La mezcla utilizada se seleccionó en función de los aminoácidos. Para todos los casos, se trató de una mezcla 95:5:5 (v/v) de TFA/H₂O/TIS (Triisopropilsilano).

El tiempo óptimo de clivaje se determinó siguiendo la reacción mediante RP- HPLC. Los péptidos clivados se separaron de la mezcla de reacción por precipitación en frío con éter etílico y posterior centrifugación. Luego de sucesivos lavados con éter, el producto se resuspendió en agua Milli-Q, congelado y liofilizado.

3.1.3. Cromatografía Líquida de Alta Performance en fase reversa (RP-HPLC)

Los péptidos se purificaron por RP-HPLC utilizando un equipo Waters 1525 (USA) y una columna semipreparativa ZORBAX 300SB C8 Agilent (USA), de 5 μm , 9,4 x 250 mm. Se empleó un sistema de solventes constituido por, Solventes A: agua Milli-Q con 0,1 % de TFA y Solvente B: ACN con 0,08 % de TFA. La detección se realizó mediante un detector Waters 2489 (USA) a 220 nm. Se utilizó un gradiente de elusión del 5 al 80 % de ACN en agua por 38 minutos. El flujo utilizado fue de 3 ml/min. Los purificados se evaporaron para eliminar el solvente, luego disolverlos en agua Milli-Q y liofilizados. Las masas de los péptidos sintetizados se analizaron por MALDI-MS en un MALDI-TOF-TOF Abi Sciex 4800 (Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay).

3.2. Actividad inhibitoria de las colinesterasas

3.2.1. Inhibición de AChE/BChE a punto final

Para la determinación de la capacidad inhibitoria de la AChE se utilizó un micrométodo basado en el ensayo de Ellman (Ellman et al., 1961). La actividad enzimática se determinó mediante el incremento de color producido por la tiocolina, procedente de la hidrólisis de la ACh, cuando ésta reacciona con el DTNB para formar el anión TNB^{2-} , de color amarillo.

Este ensayo se realizó con dos variantes de la AChE: la isoforma del organismo *Electrophorus electricus* EeAChE y la hAChE recombinante (rhAChE) y uno de la BChE: hBChE recombinante (rhBChE).

Para la determinación de la porción inhibitoria de Hp-1935 se utilizó la EeAChE, que es la variante más empleada en las etapas iniciales del desarrollo, mientras que la secuencia corta utilizada como base para las sustituciones y sus derivados se evaluaron frente a las tres enzimas. Si bien los blancos moleculares específicas son las isoformas humanas, resulta de interés el conocimiento de la actividad frente a EeAChE por ser esta variante usualmente más resistente frente a inhibidores, habiéndose reportado una actividad inhibitoria 10 veces más altas

frente a hAChE respecto a EeAChE para algunos inhibidores (Sepsova et al., 2013).

La EeAChE utilizada se adquirió comercialmente (EeAChE tipo VI-S de Sigma-Aldrich, Merck, USA) y se ensayó a una concentración de 0,25 U/mL. Las variantes humanas se expresaron de manera recombinante en colaboración con el Dr. Xavier Brazzolotto y el Dr. José Dias del Research Institute Biomédicale Des Armées (IRBA, Brétigny-sur-Orge, Francia).

La rhAChE se produjo y purificó según lo descrito por Rosenberry et al., 2017. Brevemente, la expresión se realizó utilizando células de ovario de hámster chino (CHO). La enzima secretada se recuperó del medio de cultivo y se purificó mediante cromatografía líquida de afinidad (HisTrap, monoQ, Cytiva, Francia) seguida de filtración en gel (Superdex 200, Cytiva, Francia). A continuación, la enzima recombinante se concentró, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C . La rhBChE se produjo y purificó como descrito en Meden et al., 2019. Brevemente, la enzima se secretó de las células CHO y se purificó del medio de cultivo siguiendo un protocolo de dos pasos usando cromatografía de afinidad específica de BChE (Hupresin®, Chemforase, Francia) seguida de filtración en gel (Superdex 200, Cytiva, Francia). Las concentraciones utilizadas en los ensayos de punto final de las enzimas humanas fueron 100 pm para la rhAChE y 1 nm para la rhBChE.

Como sustrato se empleó yoduro de acetilticolina (ATCI, Sigma-Aldrich, Merck, USA) y el reactivo de color fue 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma-Aldrich, Merck, USA).

Todos los reactivos y las muestras estudiadas se disolvieron al momento de ser utilizados en buffer fosfato 0.1 M (pH = 7.5). Las concentraciones finales fueron 0,24 mM para la ATCI en la reacción con la EeAChE y 0,4 mM en la reacción con las variantes humanas. La concentración final del DTNB fue 0,33 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos y cada reacción tuvo un volumen final de 100 μL .

Para realizar las reacciones, inicialmente se incubaron 25 µL de soluciones de concentraciones crecientes de los péptidos a ensayar con 25 µL de solución de la enzima correspondiente, durante 15 min en oscuridad (temperatura ambiente). Para las lecturas correspondientes a la actividad basal de la enzima se adicionó 25 µL de buffer. Luego, se adicionaron 25 µL de las soluciones de ATCl y DTNB. Las reacciones se incubaron durante 5 min y se midió luego la absorbancia del punto final de la reacción a 405 nm en un lector de microplacas ThermoFisher FC Multiskan.

Los ensayos se realizaron por triplicado y frente a un blanco de enzima y de muestra. Como control positivo se utilizó rivastigmina.

El porcentaje de inhibición se determinó mediante el siguiente cálculo (Ecuación 9):

$$\%I = 100 - \frac{(D-B)}{(C-B)} \times 100 \quad \text{(Ecuación 9)}$$

siendo: %I: porcentaje de inhibición; D: lectura con el inhibidor; C: lectura basal de la enzima; B lectura blanco.

Los valores del porcentaje de actividad residual de la enzima (equivalentes a 100 - %I) se utilizaron para calcular los valores de IC₅₀ de cada péptido mediante el ajuste de una curva descripta por un modelo logístico de cuatro parámetros, generada con un script de R (v. 4.0.4).

3.2.2. Determinación de tipo de inhibición y cálculo de K_i - Ensayo cinético

La molécula de mayor interés según los valores de IC₅₀ estimados, se evaluó frente las enzimas EeAChE y hAChE mediante un ensayo cinético para la construcción de las curvas de MM y la determinación de su mecanismo inhibitorio y la estimación de su K_i.

Los ensayos cinéticos se realizaron con un procedimiento similar al empleado para la evaluación de punto final. En este caso, la medición

espectrofotométrica comenzó al momento de adicionar el sustrato a distintas concentraciones en el medio de reacción y se leyó cada 2 s durante 3,3 min en el ensayo de la EeAChE cada 3 s durante 5 min en el ensayo de la rhAChE, respectivamente.

Para obtener los parámetros cinéticos V_{\max} y K_M y determinar el tipo de inhibición del péptido se estudiaron las velocidades iniciales de reacción (V_0) obtenidas para cada concentración de sustrato a las distintas concentraciones de péptido inhibidor. Estos valores se usaron para ajustar una curva de MM a partir de la cual se determinaron los parámetros cinéticos utilizando un script de R v. 4.0.4.

Las variaciones de V_{\max} y K_M de la enzima en presencia y ausencia del inhibidor, para estimar el tipo de inhibición, se compararon con una prueba de varianza (ANOVA) para un factor y se consideró estadísticamente significativa un valor $p < 0,05$. Una vez determinado el tipo de inhibición, se ajustaron las variables a las ecuaciones correspondientes al modelo de MM, para obtener el valor de la constante de inhibición K_i .

3.2.3. Estudio de la reversibilidad de la reacción

La reversibilidad de la inhibición del péptido más activo se evaluó realizando un ensayo de salto de dilución (del inglés *jump-dilution*) basado en las pautas de Strelow et al. (2012). Este protocolo evalúa la recuperación de la actividad enzimática luego de realizar una dilución del complejo enzima-inhibidor. Se emplearon los mismos reactivos y concentraciones finales para AChE, DTNB, ATCI y soluciones tampón de los ensayos de punto final y cinéticos.

Para este ensayo, se realizaron tres reacciones con diferentes concentraciones de inhibidor. En todos los casos, el inhibidor se preincubó con EeAChE durante 15 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia cada 2 s durante 5 min después de la adición del sustrato. Dos reacciones de control se realizaron con concentraciones finales de inhibidor de $10 \times K_i$ y $0,3 \times K_i$, respectivamente. En la tercera reacción, se preincubó la AChE con el péptido a

10 x K_i y la reacción se diluyó 33 veces con solución de ATCI y DTNB para obtener el péptido a una concentración final de 0,3 x K_i . La recuperación de la actividad enzimática después de la dilución se evaluó comparando la formación de TNB^{2-} en función del tiempo de reacción de los tres experimentos. Para la concentración de producto formada se utilizó un valor de coeficiente de extinción molar de TNB^{2-} de 14 050 $M^{-1}cm^{-1}$ (Eyer et al., 2003).

3.3. Bioactividad frente a otros blancos moleculares

3.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante – Ensayo del DPPH

La actividad antioxidante se estudió mediante el método de la captura del radical libre DPPH, acorde a los ensayos descritos por Memarpoor-Yazdi et al. (2013) con modificaciones menores. Para ello, se preparó una solución 0,15 mM de DPPH (Sigma-Aldrich, Merck, USA) en metanol (Cicarelli) y se mezclaron 50 μ l de concentraciones crecientes de los péptidos con esta solución, en microplacas de 96 pocillos. Luego, se llevaron las mezclas a un volumen de 150 μ l con metanol y se incubó en oscuridad por 30 min.

El basal de actividad se determinó utilizando 100 μ l de metanol junto a 50 μ l del radical DPPH. Como control positivo de actividad antioxidante se utilizó ácido ascórbico, el cual es un agente antioxidante ampliamente reportado (Njus et al., 2020).

Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbancia de las reacciones a 517 nm mediante un lector de microplacas Thermo Multiskan FC (Thermo Scientific).

Se determinaron el porcentaje de captura del radical libre DPPH (%RSA) con la Ecuación 10 y la EC_{50} (concentración efectiva del compuesto que reduce la concentración inicial del DPPH al 50 %) por ajuste de una curva logística de 4 parámetros de los valores de 100-%RSA.

$$\%RSA = 100 - \left(\frac{Am}{Ac} \right) \times 100 \quad \text{(Ecuación 10)}$$

siendo A_m y A_c los valores de absorbancia de la muestra y del control basal, respectivamente.

3.3.2. Actividad quelante de hierro (II)

La actividad quelante del ion Fe^{2+} se determinó mediante el método descrito por He et al. (2012) con pequeñas modificaciones.

Para ello, 50 μ l de soluciones acuosas a concentración creciente de los péptidos se incubaron con 5 μ l de una solución acuosa de sulfato ferroso 2 mM, seguido del agregado de 185 μ l de agua Milli-Q. Posteriormente se agregó 10 μ l de una solución comercial de ferrozina 5 mM, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.

La absorbancia se midió a 562 nm y el porcentaje de la actividad quelante del hierro (II) se calculó en base a la **Ecuación 11**:

$$\% \text{ Actividad quelante} = 100 - \left(\frac{A_m}{A_c} \right) \times 100 \quad \text{(Ecuación 11)}$$

siendo A_m y A_c , las absorbancias de la muestra y del control respectivamente. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se utilizó como control positivo.

3.3.3. Inhibición de la agregación *in vitro* del péptido A β

La actividad inhibidora de la agregación de A β inducida por AChE del derivado más activo se probó *in vitro* según lo descrito por Chen et al. (2014). El ensayo se realizó utilizando la isoforma de A β más abundante en el cerebro (A β_{40}), que se sintetizó según lo descrito anteriormente.

Para la preparación del péptido se preparó una solución de 20 mg/ml en hexafluoroisopropanol (HFIP). El disolvente se evaporó con una corriente de nitrógeno y se secó a alto vacío durante 2 horas. Luego, se preparó una solución madre de péptido A β 2 mM que se almacenó a -20°C , disolviendo el residuo en dimetilsulfóxido (DMSO).

Para realizar la reacción de agregación, se preparó una solución 100 μM de péptido A β y 5 μL de esta solución se incubaron con una solución de EeAChE 1 U/mL (40 μL) en un recipiente final de 100 μl en presencia y ausencia de una solución del derivado de interés (concentración final 10 μM), durante 3, 5 y 8 horas a 25 °C. La solución tampón empleada fue NaH_2PO_4 25 mM con NaCl 100 mM (pH = 8,0). Las sales agregadas al medio se utilizaron para favorecer la agregación del amiloide y optimizar los tiempos del ensayo.

A cada tiempo ensayado, se añadió una solución de tioflavina T (Sigma-Aldrich, concentración final 2,5 μM) y se controló la fluorescencia a 450 nm (λ_{exc}) y 482 nm (λ_{em}) con rendijas de excitación y emisión de 2 nm de ancho de banda con un Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS55. El espectro de emisión de fluorescencia se registró entre 450 y 600 nm con excitación a 446 nm. Se eliminó la fluorescencia de fondo de tioflavina T 2,5 μM y AChE. El porcentaje de inhibición de la agregación se calculó con la **Ecuación 12**. $100 - (IF_i - IF_o / 100)$

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left(\frac{IF_i}{IF_o} \right) \times 100 \quad \text{(Ecuación 12)}$$

donde IF_i e IF_o son las intensidades de fluorescencia obtenidas para el péptido A β y la solución de EeAChE en presencia y ausencia de inhibidor, respectivamente. Se utilizó yoduro de propidio (concentración final 74,5 μM) como control positivo. La muestra se ensayó por triplicado.

3.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Dado que una limitación del ensayo de ThT es su susceptibilidad para detectar ciertas protofibrillas u oligómeros (Sanchis et al., 2023), se comprobó la capacidad del péptido A β_{40} sintetizado de formar efectivamente fibrillas amiloides mediante un análisis de microscopía SEM.

Para este estudio, se dispersaron porciones representativas de la muestra (A β 50 μM disuelto en agua pura), en agua desionizada con agitación manual y se depositó una gota de la solución preparada sobre vidrio. Posteriormente, se recubrió con oro mediante pulverización catódica utilizando un sistema de

deposición combinado de metal/carbono, SPI SUPPLIES, SPI Module, SPI 12157-AX, operado bajo una atmósfera de argón. La muestra se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss CrossBeam 350. Las observaciones se realizaron en el modo de imágenes de electrones secundarios con un voltaje de aceleración de 2 kV.

3.4. Propiedades toxicológicas

3.4.1. Ensayo de lisis de eritrocitos (hemólisis)

Para estimar la toxicidad de los péptidos se estudió su actividad de lisis sobre GRh, que consiste en una medición colorimétrica de la liberación de hemoglobina por parte de los GRh cuando son expuestos a un agente. Se utilizaron protocolos descritos en la literatura y optimizados por el grupo de trabajo (Siano et al., 2011; Siano et al., 2010).

Los GRh se obtuvieron mediante centrifugación de un *pool* de sangre fresca [Grupo 0, Rh (+)] y se lavaron tres veces con solución fisiológica comercial. Para el ensayo, 100 μ L de diluciones seriadas de cada péptido en solución fisiológica comercial se agregaron sobre tubos Eppendorf conteniendo 100 μ L de una solución 0,4% (v/v) de GRh suspendidos en solución fisiológica comercial. Los tubos se incubaron por 1 h a 37°C y luego se centrifugaron a 1000 RPM durante 5 min. Posteriormente, se tomaron 100 μ l del sobrenadante y se transfirieron a microplacas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 405 nm. Para definir el 0 y 100% de hemólisis se agregaron 100 μ l de solución fisiológica y de una solución 1% de Triton-X 100, respectivamente.

Los péptidos se evaluaron a 6 concentraciones finales (400, 200, 100, 50, 25 y 12,5 μ M) por triplicado. El porcentaje de actividad hemolítica se calculó con la Ecuación 13, donde $AbsM$, $AbsSf$ y $AbsT$ representan la absorbancia de la muestra, la absorbancia al 0 % de hemólisis con solución fisiológica comercial, y la absorbancia al 100 % de hemólisis, respectivamente.

$$\% \text{ Hemólisis} = 100 - \left(\frac{AbsM - AbsSf}{AbsT - AbsSf} \right) \times 100 \quad \text{(Ecuación 13)}$$

3.4.2. Biotoxicidad frente a *Artemia salina*

Para mejorar la evaluación sobre el perfil tóxico de los mejores inhibidores se estimó su actividad tóxica *in vivo* sobre larvas de *A. salina*, aplicando métodos implementados anteriormente con ligeras modificaciones (Rajabi et al., 2015; Michael et al., 1956; dos Santos et al., 2017).

Para realizar el estudio, se preparó agua de mar siguiendo formulaciones y condiciones de la ordenanza marítima descritas anteriormente (Prefectura Naval Argentina, 1998). Se colocaron en probetas graduadas con aireación 100 mL de agua de mar previamente oxigenada hasta lograr una saturación de oxígeno del 90 %. Luego, se agregaron 100 mg de quistes de *A. salina* y se incubaron en presencia de luz visible (750 lm), a 25 °C durante 48 h. Luego, se detuvo la aireación y se recogieron los nauplios eclosionados, que permanecieron en la sección central del cilindro graduado.

Después de agregar 360 µL de soluciones de péptidos 100, 50, 25 y 12,5 µM, se agregaron 6 nauplios en pocillos de una microplaca de 96 pocillos. La incubación se realizó a 25 °C en ausencia de luz durante 24 h. Los nauplios muertos se contaron bajo un microscopio estereoscópico y el porcentaje de mortalidad en cada concentración se calculó como $(Ms/N) \times 100$ donde Ms es el número de individuos muertos en la muestra analizada y N es el número total de individuos expuestos. La DL₅₀ (dosis que produce el 50 % de mortalidad) se calculó con el paquete de R BioRssay (Karunarathne et al., 2022). Los ensayos se realizaron por triplicado, con dos controles positivos (larvas en metanol 99,9 % y larvas en solución acuosa de K₂Cr₂O₇ 408 µM) para 100 % de mortalidad y un control negativo (solución salina).

3.5. Estudios computacionales

Sobre el péptido Hp-1935, la secuencia base y los mejores candidatos, se realizaron estudios computacionales para estudiar las interacciones enzima-péptido responsables de la actividad inhibitoria.

3.5.1. Modelado estructural de los péptidos

Para predecir la estructura tridimensional de los péptidos sintetizados, inicialmente se utilizó la herramienta PEP-FOLD3.5 del servidor RPBS Web Portal (Lamiable et al., 2016; Thévenet et al., 2012) para obtener un modelo *de novo*. Se consideró como mejor modelo al de mejor puntaje (valor más negativo) según la función de puntuación del algoritmo PEP-FOLD (*sOPEP score*).

Al mejor modelo predicho por el programa se lo sometió a una simulación de dinámica molecular de 400 ns en solvente (agua pura) explícito, para obtener una mejor estimación de la configuración de la molécula en solución. Para esta simulación se empleó el mismo protocolo utilizado para la DM de los complejos enzima-péptido. La estructura final, que se empleó para los estudios de *docking*, se seleccionó aplicando un algoritmo de *clustering*. La metodología de estas etapas finales del modelado se describe en los apartados siguientes.

3.5.2. Docking molecular semiflexible

La interacción péptido-AChE se modeló tanto con la isoforma humana de la enzima como con una isoforma de organismo acuático eléctrico, ya que las pruebas *in vitro* se realizaron también sobre ambas variantes.

Con respecto a la variante de organismo eléctrico, se empleó una estructura correspondiente a la forma monomérica de la AChE de *Tetronarce californica* (TcAChE), registrada en el Protein Data Bank bajo el código de acceso 1FSS (Harel et al., 1995). Si bien los ensayos experimentales se realizaron con la EeAChE, la estrategia más común consiste en utilizar para el *docking* la TcAChE, para la cual se dispone de estructuras de mayor resolución y presenta una alta homología con la EeAChE, particularmente en los residuos de los sitios activos, en donde difieren solamente en un residuo (Tyr330 en lugar de Phe330). Además, en este caso, se utilizó una estructura en la cual el ligando fuese de naturaleza peptídica, siendo las únicas disponibles en el Protein Data Bank los complejos AChE-fasciculinas, para los cuales no hay estructuras con la EeAChE (Hebda et al., 2016).

Para modelar la interacción con las isoformas humanas se descargaron del Protein Data Bank las estructuras de código de acceso 4EY7 (Cheung et al., 2012) y 2PM8 (Ngamelue et al., 2007) para hAChE y hBChE, respectivamente. A las estructuras se le incorporaron los residuos faltantes mediante modelado por homología con el programa MODELLER (Martí-Renom et al., 2000). Todas las estructuras se prepararon luego con el programa UCSF Chimera, que se utilizó para remover los ligandos y moléculas de agua, adicionar los hidrógenos polares y minimizar las estructuras.

El programa HADDOCK2.4 se utilizó para ejecutar los cálculos de *docking* semiflexible con los parámetros por defecto del programa para el modelado de interacciones proteína-proteína (Dominguez et al., 2003; van Zundert et al., 2016). Los átomos se parametrizaron con el campo de fuerza OPLS. Todos los residuos de ligandos y los residuos activos de AChE y BChE (CAS, PAS y SA) se seleccionaron como residuos activos (flexibles). Los cálculos se realizaron en el Portal de *software* de interacciones biomoleculares de Utrecht (Universidad de Utrecht, Países Bajos). Las estructuras mejor puntuadas según la función de puntuación HADDOCK se promovieron a simulaciones MD.

3.5.3. Simulaciones de dinámica molecular

Las configuraciones de mejor puntaje en el análisis de *docking* semiflexible, se sometieron a simulaciones de DM en solvente explícito para comprobar la factibilidad de la predicción, comprender mejor el comportamiento dinámico de la interacción, optimizar los modelos y calcular luego el espectro de interacción por residuo mediante descomposición de la energía libre teórica, para evaluar la contribución de cada residuo del péptido al efecto inhibitorio, utilizando el método MM/GBSA implementado en Amber 18.0 (Song et al., 2019). Para estos análisis se emplearon módulos del paquete de programas Amber 18.0 y AmberTools19 (Case et al., 2003; Salomon-Ferrer et al., 2013).

Inicialmente, se parametrizó y solvató el sistema con el módulo LEaP. Para ello, se incorporaron los hidrógenos faltantes asignando el estado de protonación estándar a pH fisiológico a todos los residuos ionizables. La estructura resultante se incorporó a una caja de solvatación cúbica de agua pura

TIP3P, cuya distancia desde cualquier átomo proteico fue por lo menos 12 Å. Para la parametrización se utilizó el campo de fuerza ff14SB (Tian et al., 2020; Maier et al., 2015).

Previo a la corrida de producción de 100 ns, se optimizó la geometría de los sistemas con dos minimizaciones energéticas para ajustar la orientación del solvente, eliminar los choques locales y las imprecisiones estereoquímicas: en la primera, se ajustó la posición y orientación de las moléculas de solvente mediante la restricción de la estructura proteica, empleando un referencia estructural; en la segunda, no se aplicó ninguna restricción para minimizar la posición de todos los átomos del sistema. Luego, se termalizó con un protocolo a volumen constante, donde la temperatura se elevó lentamente de 100 a 298 K y, finalmente, se realizó un equilibrado de 1 ns a presión y temperatura constantes (1 bar, 298 K) para alcanzar la correcta densidad. En todas las simulaciones MD, el control de temperatura y presión se logró utilizando el termostato Langevin y el barostato Berendsen, respectivamente. Se realizaron análisis de estabilidad de otras magnitudes luego de cada paso de preparación, como energía total y energía cinética, temperatura y densidad del sistema.

Los sistemas se simularon utilizando CPC y empleando la suma de Ewald (separación en la malla de 0.2 nm) para tratar interacciones electrostáticas de largo alcance con un límite de 9 Å para interacciones directas. El algoritmo SHAKE se usó para mantener los enlaces que involucran átomos de H en su longitud de equilibrio, lo que permitió el empleo de un paso de tiempo de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton (Elber et al., 2012). Las corridas de producción de 100 ns (400 ns para el modelado estructural de los péptidos) se realizaron con la implementación PMEMD de SANDER en Amber 18 (Götz et al., 2012).

Finalmente, el módulo CPPTRAJ (Roe & Cheatham, 2013) se utilizó para calcular la RMSD, magnitud que se utilizó para verificar la estabilidad de la enzima a lo largo de cada simulación, utilizando como referencia la estructura cristalina correspondiente. Las trayectorias de los últimos 20 ns de simulación se sometieron a un proceso de *clustering* aplicando el algoritmo *k-means* ($k = 10$).

Luego se obtuvo una captura representativa extrayendo la estructura con la menor distancia acumulada de cualquier otro punto del *cluster* más poblado.

3.5.4. Cálculos MM/GBSA

Utilizando las trayectorias de la DM se realizó un cálculo de ΔG libre de unión teórico para el complejo enzima-péptido con el método MM/GBSA, junto con un análisis de descomposición de la energía por residuo para proporcionar información sobre las energías de interacción de cada residuo de los complejos predichos (Tsui y Case, 2000; Ratselli et al., 2010; Zoete et al., 2010).

Los cálculos se ejecutaron utilizando el script MMPBSA.py del paquete Amber 18.0, tomando 100 trayectorias de los últimos 20 ns de simulación.

3.5.5. Predicción de propiedades fisicoquímicas

El estudio *in silico* de los péptidos se complementó analizándolos con herramientas bioinformáticas para el cálculo de propiedades fisicoquímicas de interés.

La herramienta ProtParam del ExPASy Bioinformatics Resource Portal (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausana, Suiza, disponible en <https://web.expasy.org/protparam/>) se empleó para computar el Índice GRAVY (del inglés, *Grand Average of Hydropathy*). Este indicador brinda información sobre la hidrofobicidad de la secuencia, confiriéndole a cada residuo un valor de hidrofobicidad basado en la escala de Eisenberg y calculando los valores de hidrofobicidad como la suma de todos los valores de los aminoácidos dividida por el número de residuos en la secuencia. El valor de GRAVY de una secuencia es proporcional a su hidrofobicidad (Chang & Yang, 2013).

Se recurrió también al programa PepCalc.com - Peptide property calculator (Lear & Cobb, 2016) de Innovagen (Lund, Suecia, disponible en: <https://pepcalc.com/>), para el cálculo de la masa molecular y carga neta a pH = 7,0. Finalmente, se realizó una evaluación de la estabilidad de los péptidos estimando su vida media en un ambiente intestinal proteolítico mediante el

método HLP (en inglés, *Half Life Prediction*) para péptidos del Institute of Microbial Technology (Chandigarh, India, disponible en: <http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/>) (Sharma et al., 2014) y mediante la clasificación como Estable o Inestable según el Índice de inestabilidad estimado por el programa ProtParam utilizado para estimar el GRAVY.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Actividad inhibitoria de Hp-1935 y detección de la porción activa

4.1.1. Diseño y síntesis para determinar la porción activa

A los fines de encontrar una buena secuencia de base para diseñar y sintetizar luego análogos de sustitución, se partió de la secuencia del péptido Hp-1935 de 19 aa, que había demostrado actividad inhibitoria de AChE en estudios previos. A partir de su secuencia se diseñaron, sintetizaron y evaluaron análogos más cortos para definir la porción inhibitoria del péptido. Para ello, se aplicó una estrategia de diseño de desplazamiento de secuencia para obtener péptidos de 10 aa, con un desplazamiento de 2 entre un derivado y el siguiente. De esta manera, se diseñaron 5 secuencias (4 de 10 aa y una de 11), según se ilustra en Figura 25.

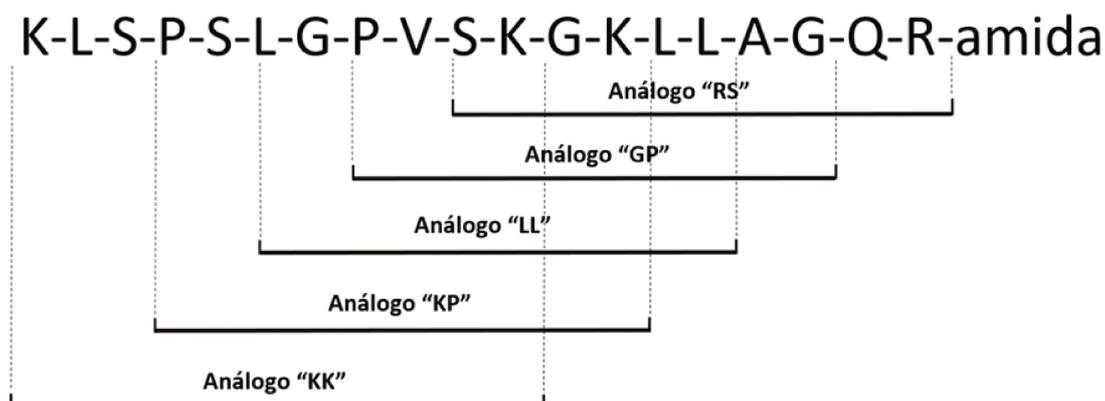


Figura 25: Secuencia del péptido Hp-1935 y de los análogos más cortos diseñados

El péptido Hp-1935 y sus derivados se sintetizaron con su extremo C-terminal amidado mediante Fmoc-SPPS. Los productos de síntesis se analizaron y purificaron por HPLC en fase reversa a modo de obtener una pureza superior al 90 % (Figura 1, Material Anexo). Por otro lado, se midió la masa molecular

mediante espectrometría de masas MALDI-Tof (ver Tabla 3). Las masas observadas coincidieron con las calculadas.

Tabla 3. Secuencias y propiedades de Hp-1935 y sus derivados más cortos

Péptido	Región	Secuencia	MM (Da)*	Rendimiento (%)	Carga (pH = 7.0)	GRAVY
Hp-1935	-	KLSPSLGPVSKGKL LAGQR-NH ₂	1935.32	84	+ 5	0,46
KK	1-11	KLSPSLGPVSK-NH ₂	1111.34	76	+ 3	0,49
KP	4-13	PSLGPVSKGK-NH ₂	968.15	73	+ 3	0,90
LL	6-15	LGPVSKGKLL-NH ₂	1010.27	77	+ 3	0,53
GP	8-17	PVSKGKLLAG-NH ₂	968.19	70	+ 3	0,41
RS	10-19	SKGKLLAGQR-NH ₂	1056.26	75	+ 4	0,40

Todos los péptidos están amidados en su C-terminal. Pureza > 90%. * Determinado por Maldi-Tof. GRAVY: calculado con ProtParam como la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos, dividido por el número de residuos en la secuencia.

4.1.2. Actividad inhibitoria de AChE de Hp-1935

4.1.2.1. Ensayo de punto final

Para evaluar la actividad inhibitoria de Hp-1935 y de los derivados se llevó a cabo un ensayo de inhibición a punto final *in vitro* utilizando la isoforma EeAChE. Los resultados se muestran en Figura 26.

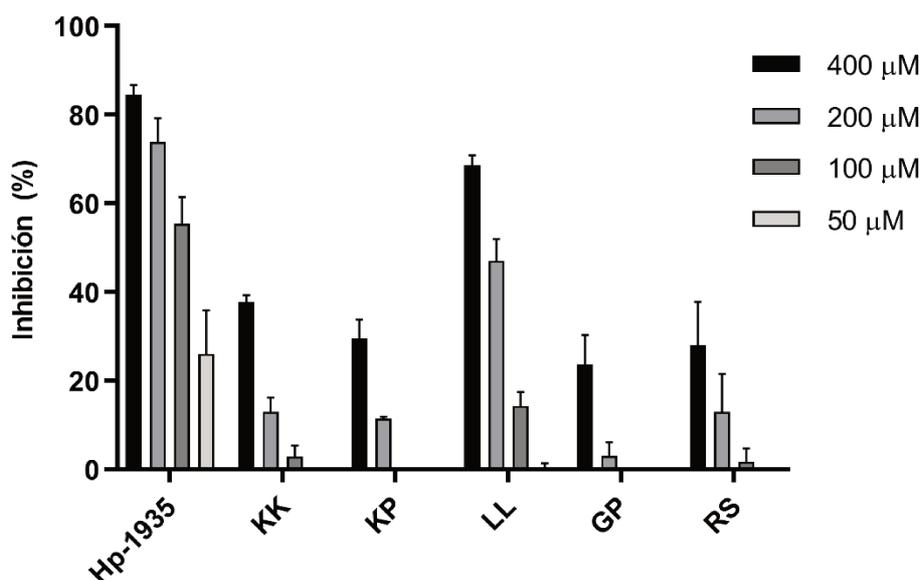


Figura 26: Inhibición de EeAChE de Hp-1935 y sus análogos. Datos expresados como media \pm DE (n = 3).

Los ensayos confirmaron la moderada actividad inhibitoria de la secuencia Hp-1935. Ésta inhibió el 73,9 % de la actividad enzimática basal a 200 μ M y se estimó un IC₅₀ de 89,8 μ M (\pm 16,8) mediante ajuste de una curva logística con los valores de porcentaje de inhibición calculados. En la Tabla 4 se muestra la comparación de la actividad de Hp-1935 frente a EeAChE con la de otras secuencias con residuos naturales (excluyendo toxinas) reportadas en la literatura.

Tabla 4. Actividad inhibitoria de EeAChE de péptidos naturales

Péptido*	Secuencia	Fuente	IC ₅₀ (μ M)	Inhibición máx.
Snakin-Z ¹	CARLNCVPGKGTSGNTETPCYASLHSCRKYG	Fruto jujuba	174.7	80% (452 μ M)
Hp-1971 ²	TKPTLLGLPLGAGPAAGPGKR-NH ₂	Piel de anfibio	-	20% (400 μ M)
Hp-1935 ³	KLSPSLGPVSKGKLLAGQR-NH ₂	Piel de anfibio	89.8	84% (400 μ M)

Se excluyen toxinas y secuencias más cortas derivadas de secuencias naturales

¹ Daneshmand et al, 2013; ² Siano et al, 2017; ³ Sanchis et al, 2020

La actividad inhibitoria de EeAChE de otros péptidos naturales fue discutida por Prasasty et al. (2018). El péptido catiónico Snakin-Z, reportado por Daneshmand et al. (2013), logró una inhibición del 80 % a 452 μ M con una IC₅₀ de 175 μ M. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo reportó la actividad del péptido Hp-1971, (que fue aislado junto con Hp-1935) y de sus análogos (Siano et al., 2017). El análogo de Hp-1971 más potente fue la secuencia 5-21, que inhibió el 50% de la actividad de AChE a 400 μ M. Yu et al. (2018) reportaron un péptido derivado de albúmina (KLPGF), que alcanzó el 61% de inhibición a 89 μ M. La actividad de este péptido es similar a la de Hp-1935, pero no es una secuencia natural ya que se deriva de una secuencia más larga.

Los péptidos naturales más potentes contra la EeAChE son algunas toxinas como las fasciculinas, cuyo valor como fármacos es bajo debido a su gran tamaño y toxicidad. Otros péptidos reportados con alta actividad inhibitoria

no son compuestos naturales y se han desarrollado principalmente mediante la introducción de modificaciones en secuencias naturales mediante diseño racional (Prasasty et al., 2018). Este enfoque es posible solo si se descubren nuevas secuencias con una actividad inhibitoria significativa, como es el caso de Hp-1935.

4.1.2.2. Caracterización cinética

Además del ensayo de punto final, se evaluó el mecanismo inhibitorio del péptido Hp-1935 mediante un ensayo cinético. El objetivo de este estudio fue determinar si el sitio de acción era el sitio activo o un sitio diferente. Este análisis fue complementado con un modelado computacional de la interacción de esta molécula con la AChE.

En la Figura 27 se muestran la velocidad inicial (V_0) de las reacciones realizadas en presencia de diferentes concentraciones de péptido, en función de la concentración de sustrato. Con estos valores se ajustó una curva de regresión descrita por el modelo de Michaelis-Menten.

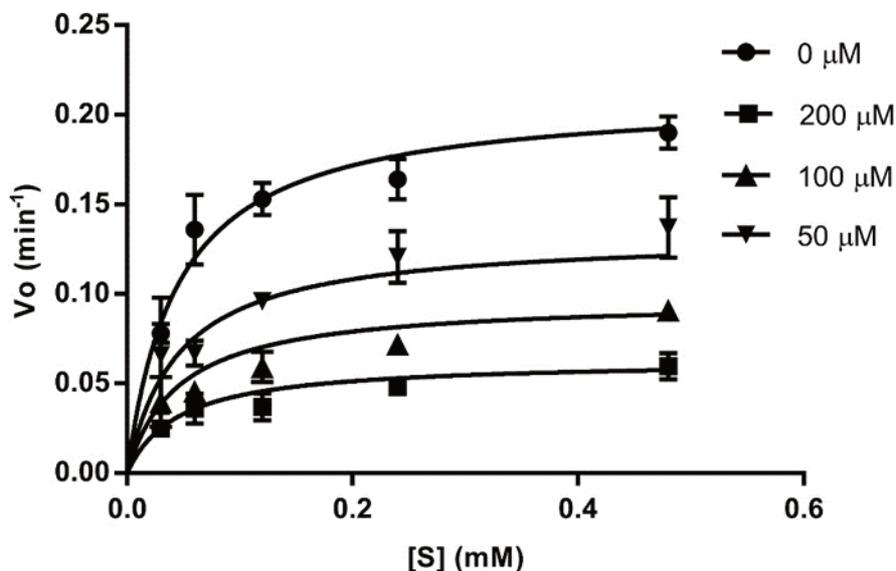


Figura 27: Estudio de la variación de la velocidad inicial de reacción (V_0) de la enzima EeAChE a distintas concentraciones de sustrato ($[S]$) y distintas concentraciones (0-200 μM) de péptido Hp-1935. Datos expresados como media \pm SD ($n = 3$).

El comportamiento de la V_0 frente a la concentración de sustrato se corresponde con el de una inhibición de tipo no competitiva. Esto sugiere que el péptido logra su acción inhibidora interactuando en un sitio diferente al sitio activo, formado por la tríada catalítica de AChE. Como un inhibidor no competitivo puro modifica el parámetro V_{max} de una enzima y no altera su K_M , se evaluó si los valores obtenidos para estos parámetros variaban significativamente cuando se realizaba la reacción enzimática con las diferentes concentraciones de inhibidor. Se muestran los resultados de este análisis en la Tabla 5. Como se puede observar aquí, solo el valor de la V_{max} mostró una variación significativa, lo que confirma el análisis cualitativo del comportamiento de las curvas de Michaelis-Menten.

Tabla 5. Variación de K_M y V_{max} de la reacción de EeAChE con ATCI en presencia del péptido Hp-1935

[Hp-1935] (μM)	Parámetro*	Valor estimado*	DE**	Valor p
0	-	0,2009	0,0085	-
	-	0,0384	0,0065	-
200	$V_{max \text{ app}}$	0,0622	0,0052	0,0029
	$K_M \text{ app}$	0,0540	0,016	0,1831
100	$V_{max \text{ app}}$	0,0945	0,0064	0,0001
	$K_M \text{ app}$	0,0575	0,0125	0,1241
50	$V_{max \text{ app}}$	0,1476	0,0114	0,0000
	$K_M \text{ app}$	0,0534	0,0149	0,1913

* V_{max} : min^{-1} ; K_M : mM

** $n \geq 3$

Una vez determinado el modelo cinético, se utilizaron las ecuaciones correspondientes para obtener el valor K_i del péptido Hp-1935 con la EeAChE. La K_i calculada experimentalmente fue de $85,2 \mu\text{M}$ ($\pm 6,5$). Este valor ubica al Hp-1935 entre los péptidos naturales más activos contra la AChE que se han reportado.

4.1.2.3. Modelado de la interacción Hp-1935-AChE

El estudio cinético sugiere que el péptido actúa sobre un sitio enzimático diferente del sitio activo. Para los inhibidores no competitivos de las

colinesterasas, este sitio suele ser el PAS. Para corroborar y complementar estos hallazgos sobre el sitio de unión, se implementó un protocolo de análisis computacional que incluyó el modelado molecular del péptido, el *docking* semiflexible con la enzima seguido de simulaciones de DM sobre el complejo predicho, para evaluar la factibilidad de las estimaciones del *docking*.

Las predicciones de los estudios de modelado del complejo enzima-péptido estuvieron en concordancia con lo determinado en el ensayo cinético. Todas las configuraciones del sistema predichas por los cálculos de *docking* colocaron al Hp-1935 en el sitio PAS en la superficie de la enzima, región de interacción predilecto de los inhibidores no competitivos de las colinesterasas. La pose de mejor puntaje se promovió a la simulación de DM. La fluctuación del RMSD del complejo a lo largo del tiempo de simulación se utilizó como métrica de la estabilidad del sistema y para evaluar la factibilidad de la conformación predicha. El gráfico RMSD vs. tiempo de simulación del complejo Hp-1935-TcAChE se muestra en la Figura 4 del Material Anexo.

En la siguiente imagen (Figura 28), se muestra una captura representativa extraída de los últimos 10 de los 100 ns de simulación aplicando un algoritmo de *clustering* sobre las conformaciones predichas.

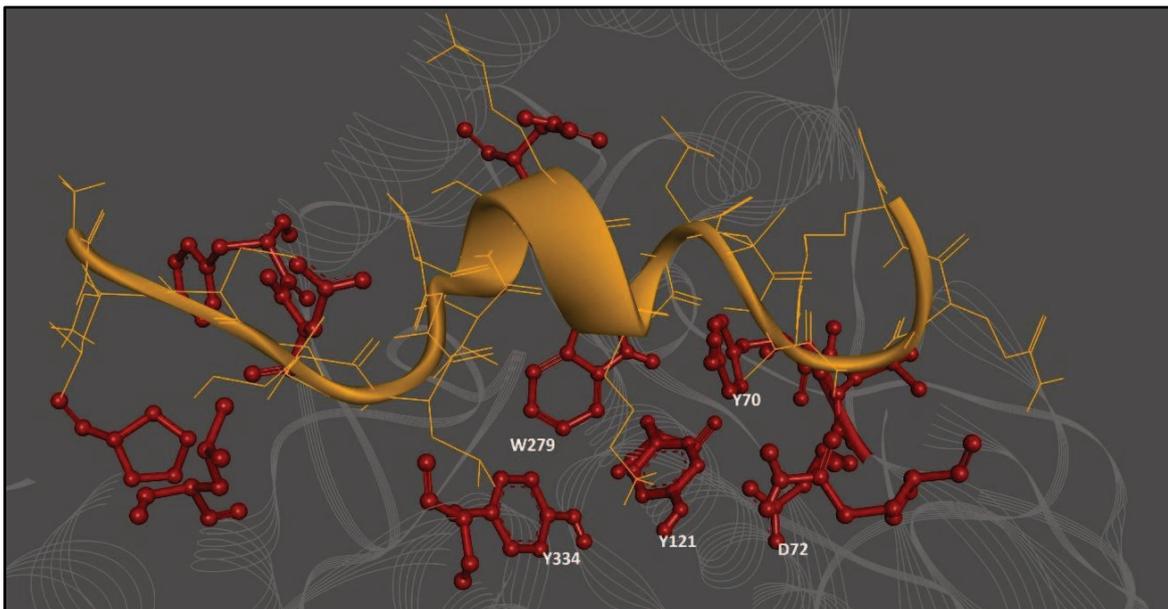


Figura 28: Modo de unión previsto para el péptido Hp-1935 con la TcAChE. El ligando se muestra en naranja. Los principales átomos que interactúan del receptor se representan con color rojo. Los residuos del PAS se indican con una etiqueta blanca.

Los análisis computacionales confirmaron la capacidad de Hp-1935 para establecer contactos con los principales residuos del PAS, lo que permite explicar la actividad inhibitoria de este compuesto. Para el residuo Trp279 (numeración de *T. californica*), residuo clave de este sitio, se predijo una interacción dependiente de contactos alquilo-aromático con la porción alquílica de la cadena lateral de un residuo de Lys situado en la región central de Hp-1935. La cadena lateral larga de esta lisina se extiende hacia los núcleos aromáticos del PAS, donde está rodeada por los residuos Tyr70, Tyr121, Trp279, Tyr334 mientras que su amonio cuaternario establece contactos catión- π con los grupos aromáticos. Este tipo de interacciones son cruciales en el proceso de entrada de compuestos cuaternarios al sitio enzimático de AChE (Branduardi et al., 2005).

Espectro de la energía libre de interacción por residuo

La energía de interacción entre Hp-1935 y AChE se calculó *in silico* y se desagregó por residuo utilizando el enfoque MM/GBSA, para evaluar los patrones de unión de la pose predicha. Los resultados de este análisis se corresponden con la predicción de la pose de unión ya que confirman que los residuos de PAS son esenciales para la formación del complejo Hp-1935-AChE y enfatizan el papel del residuo crítico del PAS Trp279 (Figura 29). Trp279 tiene la energía de interacción más baja con el ligando entre todos los residuos de AChE. Otros residuos importantes (con energía de interacción inferior a 1 kcal/mol) son Tyr70, Val71, Asp72, Phe84, Tyr334, Leu358, Pro361. Los residuos de la triada catalítica (Ser200, Glu 327 e His440), donde actúan los inhibidores competitivos, no mostraron atracción con el péptido, así como los residuos del subsitio aniónico (Trp84, Tyr130, Phe330 y Phe331) donde actúan algunos inhibidores no-competitivos, como la tacrina y la huperzina A (Harel 1993; Raves et al., 1997).

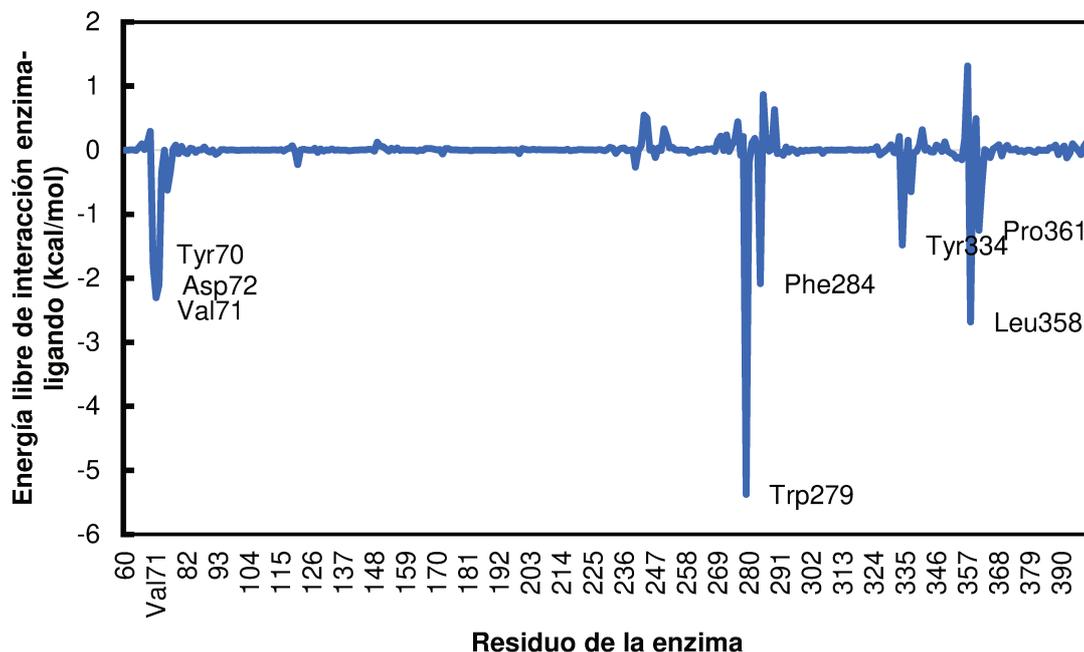


Figura 29: Energía de interacción entre el péptido Hp-1935 y los residuos de TcAChE, desagregada según residuo de la enzima. Los datos expresan el ΔG libre calculado por el método MM-GBSA. Se indica el nombre los residuos con mayor interacción.

Del análisis conjunto de los resultados de los estudios cinéticos y de modelado molecular, se puede concluir que Hp-1935 es un inhibidor puro de PAS, cuya actividad inhibitoria se explica por su importante interacción con el residuo Trp279, principal residuo de las funciones no colinérgicas de la enzima.

4.2. Actividad inhibitoria de los derivados de Hp-1935

Con respecto a los derivados más cortos sintetizados y diseñados según Figura 25, se encontró que la región central de la secuencia (análogo LL), por sí sola, conserva una buena parte de la inhibición total (Figura 26) con sólo 10 residuos. La longitud de la secuencia de LL permite una generación más rápida y sencilla de nuevos análogos para aumentar la actividad inhibitoria. Esta región central denominada LL, retiene un 81,3% de la actividad inhibitoria de Hp-1935 a 400 μM y un 63,7% a 200 μM . Si bien su actividad disminuye a las concentraciones más bajas, se seleccionó esta secuencia como molécula base

para la generación de análogos de sustitución, debido a su actividad inhibitoria con sólo 10 residuos. Además, los restantes análogos mostraron una actividad mucho más moderada que se observó sólo a la concentración más alta ensayada.

Las simulaciones de DM y la pose predicha para el complejo muestran que la región central de Hp-1935 (coincidente con la porción LL) es la que interacciona con el PAS. Al observar la tendencia estructural de las trayectorias de DM durante los 100 ns de simulación, se encuentra que, para esta región central, hay mayor estabilidad en la interacción con la enzima en comparación con las regiones N y amida-terminal, que mostraron mayor movilidad. Esta tendencia se puede explicar desagregando la energía libre de interacción por residuo del ligando (Figura 30). Según esta estimación, el mayor aporte a la energía global de interacción se da claramente en la región central de la secuencia de Hp-1935.

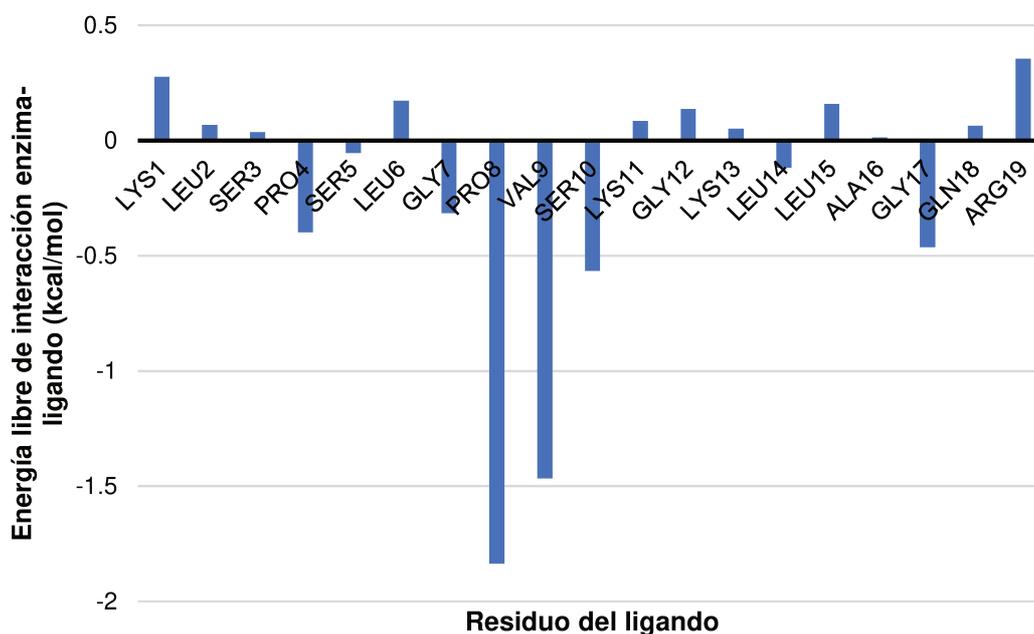


Figura 30: Energía de interacción entre el péptido Hp-1935 y los residuos de TcAChE, desagregada según residuo del ligando. Los datos expresan el ΔG libre calculado por el método MM-GBSA.

Se puede concluir, por lo tanto, que el comportamiento observado en el modelado de la interacción enzima-péptido se condice con los resultados del

ensayo *in vitro* de inhibición frente a EeAChE. A partir de estos resultados, se seleccionó y empleó la molécula LL como secuencia de base para el diseño y síntesis de análogos de sustitución. Los resultados se exponen y discuten en los siguientes apartados.

4.3. Diseño y síntesis de análogos de sustitución de la porción activa

4.3.1. Estrategia de diseño

La evaluación de la actividad inhibitoria de los derivados de Hp-1935, tanto en los estudios *in vitro* como *in silico*, indica que la región denominada LL es la principal responsable de la actividad inhibitoria. Por lo tanto, esta secuencia se tomó como base molecular para el diseño y síntesis de análogos de sustitución para aumentar la actividad inhibitoria. Habiendo determinado que la región de interacción es el sitio PAS, rico en residuos aromáticos, las modificaciones apuntaron a la sustitución de residuos alifáticos por aromáticos, para incluir en la secuencia grupos químicos muy presentes en inhibidores de las colinesterasas y aprovechar los contactos de tipo aromático-aromático, típicamente más fuertes que los alifático-aromático.

Para definir los residuos a modificar se utilizó un diseño guiado por computadora. La secuencia LL se modeló de forma computacional y se estudió su interacción a nivel atómico frente a la AChE, con el mismo protocolo utilizado para el péptido Hp-1935 de combinación de *docking* y dinámica molecular. A partir de las configuraciones predichas para el complejo enzima-péptido y del diagrama energético de interacción por residuo se seleccionaron los residuos blancos para la sustitución.

4.3.2. Mecanismo inhibitorio de LL

Estudio cinético

Además del estudio computacional, se realizó también un ensayo cinético para corroborar el mecanismo inhibitorio de este derivado en particular. En

Figura 31 se muestran los resultados de este análisis. Se observa que las curvas siguen el típico comportamiento de un inhibidor no competitivo, como esperado a partir de los resultados del mismo análisis aplicado a Hp-1935. Además, en presencia del inhibidor (a todas las concentraciones ensayadas) solamente la V_{max} de la enzima varió de manera estadísticamente significativa (Tabla 6), como ocurre en este tipo de inhibición. La constante de inhibición K_i del péptido fue de $387,5 \mu\text{M}$ ($\pm 26,69$), más elevada que la encontrada para Hp-1935.

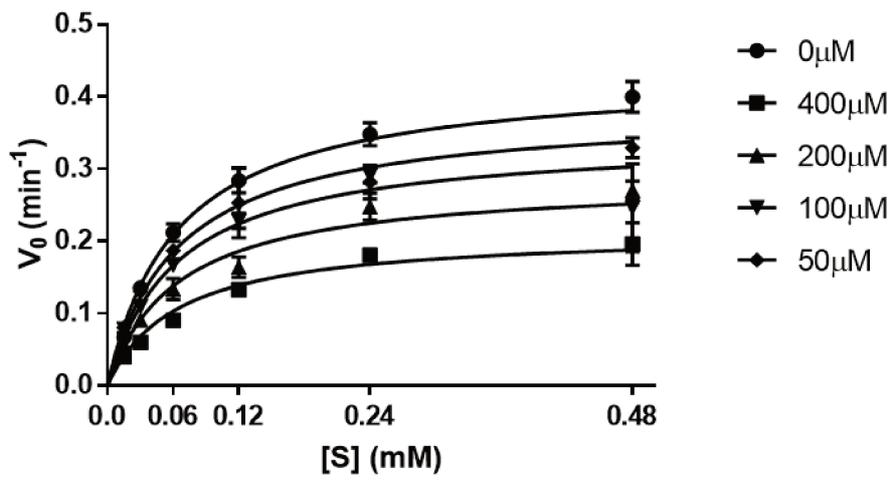


Figura 31: Variación de la velocidad inicial de reacción (V_0) de la AChE a distintas concentraciones de sustrato ($[S]$) y de péptido LL (0-400 μM). Datos expresados como media \pm DE ($n = 3$).

Tabla 6. Variación de K_M y V_{max} de la reacción de EeAChE con ATCI en presencia del péptido LL

[I] (μM)	Parámetro*	Valor estimado*	DE**	Valor p
0	-	0,4552	0,0112	-
	-	0,0709	0,0055	-
400	$V_{max \text{ app}}$	0,2417	0,0118	0,0000
	$K_M \text{ app}$	0,0953	0,0129	0,1567
200	$V_{max \text{ app}}$	0,3221	0,0108	0,0002
	$K_M \text{ app}$	0,0873	0,0052	0,2185
100	$V_{max \text{ app}}$	0,3038	0,0223	0,0005
	$K_M \text{ app}$	0,0458	0,0126	0,3620
50	$V_{max \text{ app}}$	0,3609	0,0145	0,0009
	$K_M \text{ app}$	0,0547	0,0080	0,3748

* $V_{max \text{ app}}$: min^{-1} ; $K_M \text{ app}$: mM

** $n \geq 3$

Estudios computacionales

El hallazgo sobre el mecanismo inhibitorio concuerda con los resultados de los estudios de *docking*. La configuración de mejor puntaje ubicó al péptido en el PAS, es decir en un sitio distinto del sitio activo. Los 5 residuos que componen este sitio están involucrados en la interacción.

La simulación de DM confirma la factibilidad del resultado del *docking*, ya que la conformación se mantuvo estable durante los 100 ns de simulación. La evolución del RMSD de la estructura en función del tiempo de simulación se muestra en Figura 6 - Material Anexo mientras que, en la Figura 32, se observa una representación 2D de las principales interacciones del péptido, extraída de los últimos 10 ns de simulación. Finalmente, en la Figura 33, se grafican las energías de interacción por residuo del ligando.

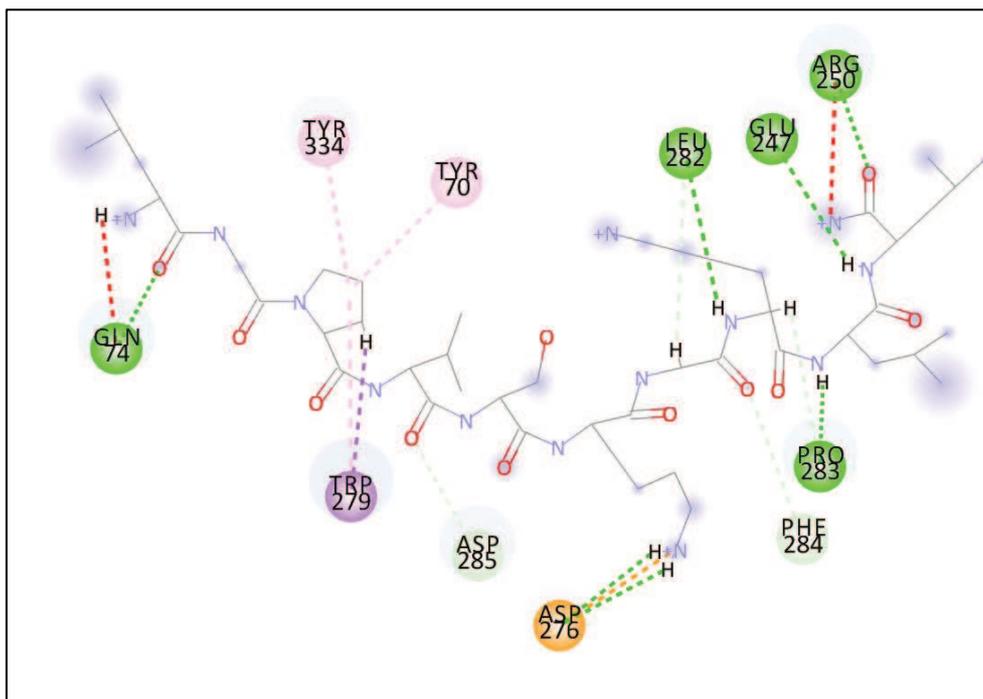


Figura 32: Mapa bidimensional de la interacción del LL con el sitio PAS de la AChE.

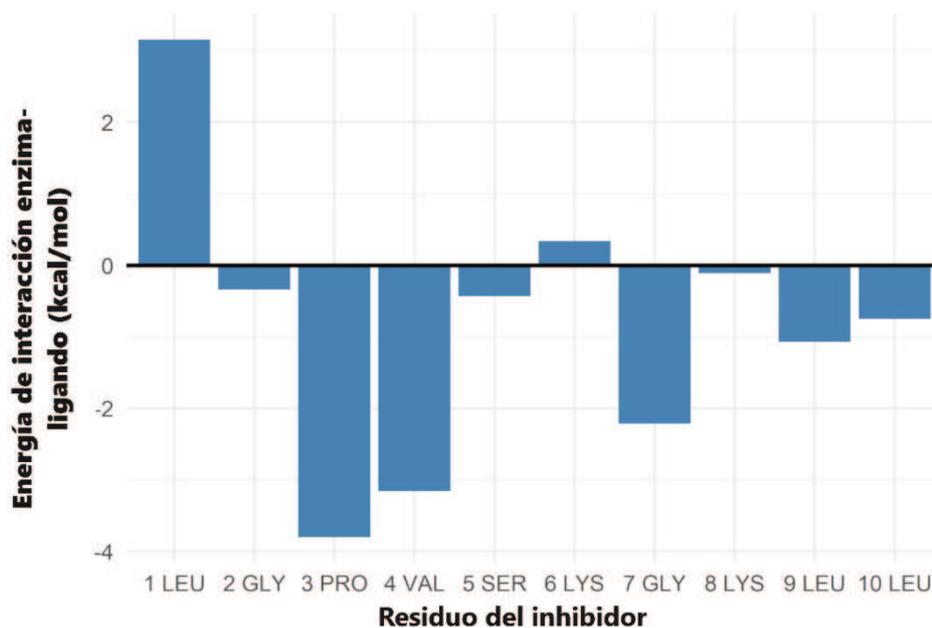


Figura 33: Descomposición por residuo del ligando de la energía de interacción LL-AChE, calculada mediante el método MM/GBSA.

Los contactos principales del péptido con los residuos clave del sitio PAS son hidrofóbicos, en particular de tipo alquil-aromático. El residuo con menor energía de interacción (mayor atracción) de la secuencia fue una prolina en

posición 3. Este residuo había mostrado la menor energía también en la predicción de la interacción de Hp-1935 con la enzima (Pro8, Figura 29).

Dados estos resultados, se decidió diseñar análogos de sustitución reemplazando la Pro3 por residuos aromáticos para potenciar la interacción, buscando establecer contactos de tipo aromático-aromático, normalmente de mayor intensidad respecto a los alquil-aromático y a través de los cuales actúan muchos de los inhibidores del sitio PAS ya reportados (Silva et al., 2020; Chen et al., 2018; Harel 1993; Raves et al., 1997; Bolognesi et al., 2015).

Síntesis

Con base en los hallazgos del estudio cinético y del modelado computacional del complejo LL-AChE, se diseñaron y sintetizaron mediante Fmoc-SPPS ocho nuevos péptidos introduciendo Tyr, Trp, Phe y 4-Fluoro-Phe con una o dos substituciones. Se incluyó un residuo de 4-Fluoro-Phe para evaluar el efecto de la introducción de un grupo aromático con sustituyentes electronegativos, una de las estrategias estudiadas para incrementar la energía de interacción en contactos entre grupos aromáticos.

En tres de los derivados, se introdujeron dos aromáticos: el primero en lugar de la prolina y el segundo en posición 7, a una distancia suficiente para evitar una interacción de π -stacking intramolecular. Se sintetizó también un derivado con una modificación sólo en la posición 7 para evaluar el aporte de esta posición específicamente.

Las secuencias de los péptidos sintetizados, junto con algunas propiedades de interés, se muestran en Tabla 7. Los perfiles de las corridas cromatográficas se muestran en Figura 2 del Material Anexo.

Tabla 7. Secuencias y propiedades de LL y sus derivados

Péptido	Inserción	Secuencia	MM (Da)*	Rendimiento (%)	GRAVY
LL	-	LGPVSKGKLL-NH ₂	1010.97	75	0,46
Y3	Tyr	LG YVSKGKLL-NH ₂	1077.09	70	0,49
F3	Phe	LGFVSKGKLL-NH ₂	1059.68	67	0,90
W3	Trp	LGWVSKGKLL-NH ₂	1100.12	70	0,53
W7	Trp	LGPVSKWKLL-NH ₂	1138.63	73	0,41
Y3Y7	Tyr, Tyr	LG YVSKYKLL-NH ₂	1182.95	70	0,40
Y3W7	Tyr, Trp	LG YVSKWKLL-NH ₂	1205.06	70	0,44
W3W7	Trp, Trp	LGWVSKWKLL-NH ₂	1229.43	73	0,48
F3(4-F)	4-F Phe	LG(4-Fluoro)FVSKWKLL-NH ₂	1079.18	65	-

Todos los péptidos están amidados en su C-terminal. Carga (pH = 7.0) = +3. Pureza > 90%.

* Determinado por Maldi-Tof. GRAVY: calculado con ProtParam como la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos, dividido por el número de residuos en la secuencia.

4.4. Actividad inhibitoria de AChE y BChE de los análogos de sustitución

4.4.1. Actividad frente a EeAChE

4.4.1.1. Estimación de la IC₅₀

Se llevó a cabo un ensayo inhibitorio *in vitro* de punto final para comparar la actividad contra la AChE de LL y los derivados sintetizados. Este estudio se realizó inicialmente utilizando la enzima del organismo eléctrico EeAChE, la más empleada en las etapas preliminares del desarrollo de inhibidores de las colinesterasas. Los resultados se muestran en la Fig. 34 y los valores de IC₅₀ en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad inhibitoria de EeAChE del péptido LL y sus análogos

Péptido	EeAChE IC ₅₀ (μM)
LL	317.90 ± 28.78
Y3	-
F3	-
W3	10.42 ± 1.02
W7	299.5 ± 37.69
Y3Y7	320.80 ± 17.69
Y3W7	85.91 ± 4.13
W3W7	56.63 ± 3.06
F3 (4-F)	-

Los datos expresan el promedio ± DE (n = 3).

Los valores de IC₅₀ se calcularon para los péptidos que alcanzaron al menos el 50% de inhibición a las concentraciones ensayadas.

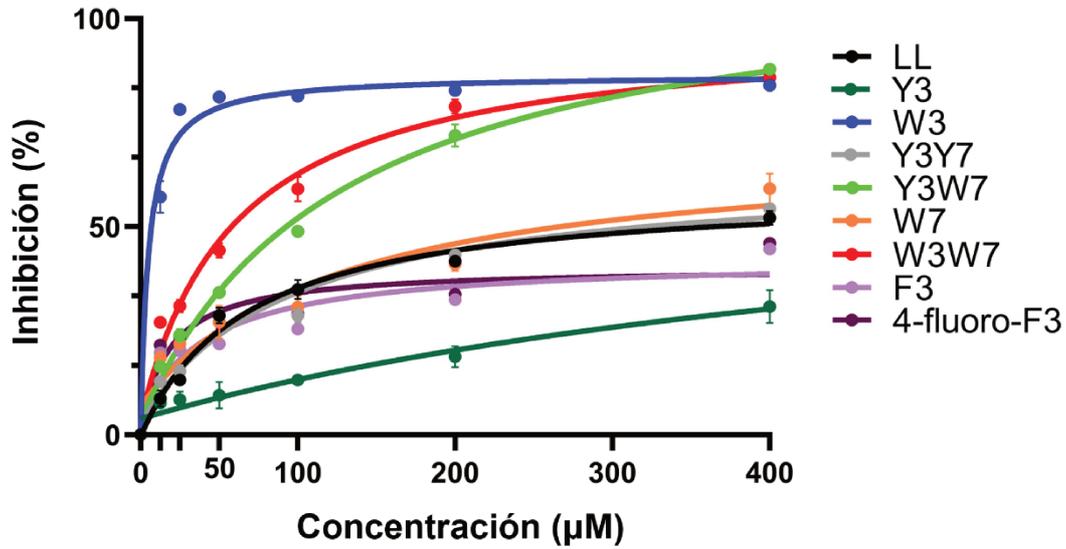


Figura 34: Inhibición de AChE de LL y sus análogos. Los puntos expresan la media \pm DE ($n = 3$).

En comparación con la secuencia original, LL, el análogo de W3, en el que Pro3 se reemplazó por un residuo de Trp, logró una elevada actividad inhibitoria. Este análogo inhibió más del 50 % de la actividad de AChE a todas las concentraciones evaluadas, mientras que LL alcanzó el 50 % de inhibición sólo a 400 μM . Por esta razón, repetimos el ensayo con W3 a concentraciones más bajas (1.56 - 50 μM) para calcular su IC_{50} mediante una regresión logística de cuatro parámetros (Figura 35). Se determinó que el derivado W3 tiene un valor de IC_{50} frente a la EeAChE de 10,42 μM ($\pm 1,02$).

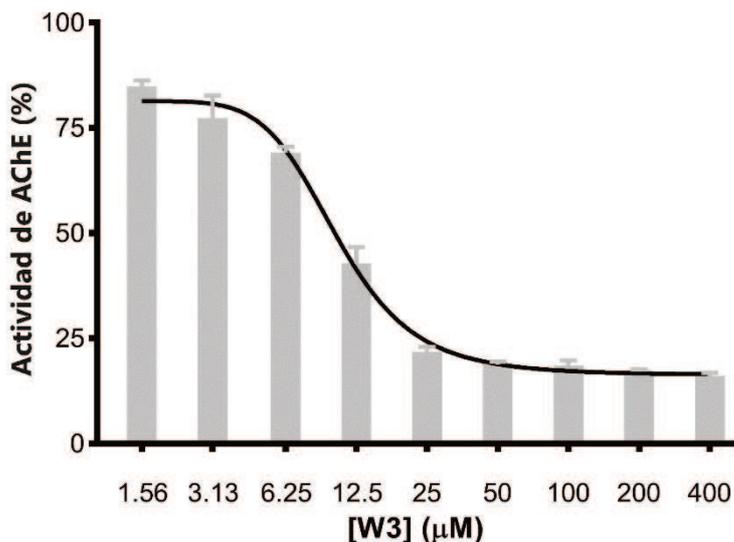


Figura 35: Porcentaje de actividad de AChE frente a concentración de péptido W3 (escala logarítmica). Las barras expresan la media \pm DE ($n = 3$).

El valor estimado convierte al análogo W3 en uno de los péptidos más potentes contra la EeAChE reportados. Excluyendo las fasciculinas y otras toxinas, no existen reportes de péptidos naturales o naturales modificados con mayor actividad frente a la EeAChE, la cual presenta, en general, mayor resistencia a la actividad de inhibidores enzimáticos en comparación con la isoforma humana (hAChE), que es más susceptible (Sepsova et al., 2013).

Entre los otros análogos, Y3W7 y W3W7 alcanzaron una actividad inhibitoria mayor a la del péptido base, LL. En general, la inserción de triptófano aumentó la actividad, mientras que las inserciones de Tyr o Phe provocaron una disminución. El análogo W3W7 (que contiene dos residuos de Trp) tuvo la segunda actividad más alta con una IC_{50} de $56,63 \pm 3,06 \mu\text{M}$ (Tabla 8).

4.4.2. Mecanismo de interacción y cinética del mejor análogo

4.4.2.1. Cinética y reversibilidad de reacción

Dada la elevada actividad inhibitoria encontrada para el derivado W3, se extendió el estudio de este compuesto mediante ensayos cinéticos y de

reversibilidad de la inhibición. El ensayo cinético se realizó de modo similar al implementado para el péptido base, ajustando la concentración de péptido en función del valor de IC_{50} calculado. Para evaluar la reversibilidad, por otra parte, se realizó un ensayo de salto de dilución.

Tal como se esperaba por los estudios realizados sobre la secuencia base LL, se encontró que la inhibición de W3 es reversible y no competitiva. Las curvas de MM del ensayo cinético (Figura 36) tienen la forma típica de un inhibidor de este tipo. El valor de W3 K_i fue de $18,71 \mu\text{M}$ ($\pm 0,85$), superior a su IC_{50} .

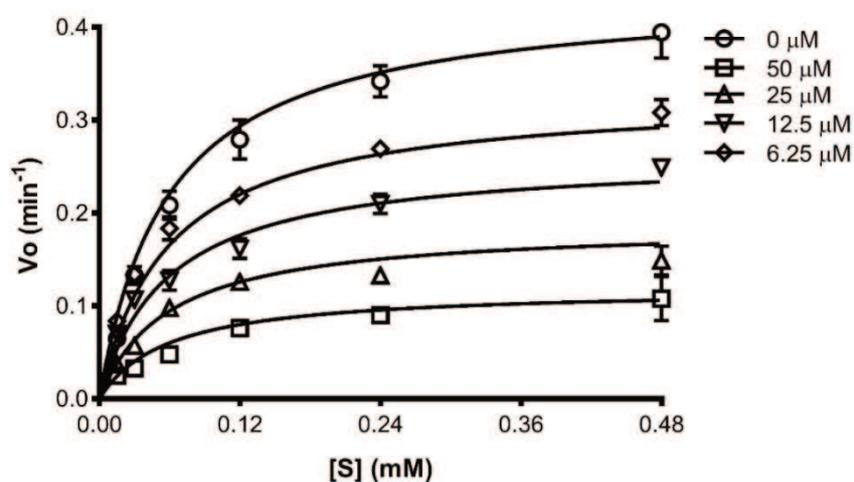


Figura 36: Velocidad inicial (V_0) de la reacción de EeAChE frente a la concentración de sustrato ($[S]$) en ausencia ($0 \mu\text{M}$) y presencia ($6,25 - 50 \mu\text{M}$) del péptido W3. Datos expresados como media \pm DE ($n = 3$).

La reversibilidad se ensayó realizando dos reacciones con el péptido a $0,3 \times K_i$ y $10 \times K_i$ y una tercera reacción en la que primero se incubó AChE con W3 a $10 \times K_i$ y la reacción comenzó después de una dilución de salto de 33 veces con sustrato (péptido a $0,3 \times K_i$). La actividad enzimática se recuperó después de la dilución con solución de sustrato, como se puede observar al comparar la curva de la reacción con W3 a $0,3 \times K_i$ con la reacción realizada posterior a la dilución (Figura 37).

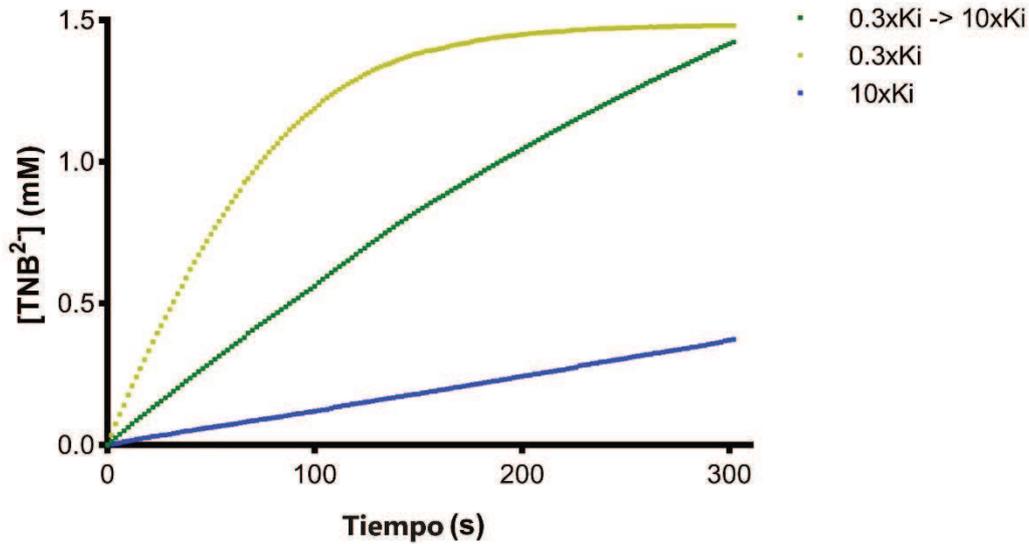


Figura 37: Recuperación de la actividad enzimática después del salto de dilución. Formación del producto (TNB²⁻) durante la reacción de AChE con el péptido W3 preincubado a $0,3 \times K_i$ y $10 \times K_i$ y con W3 preincubado a $10 \times K_i$ y diluido 33 veces ($0,3 \times K_i \rightarrow 10 \times K_i$). La concentración de TNB²⁻ se calculó utilizando un coeficiente de absorción molar de $14\ 050\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Estudios computacionales

El análisis del mecanismo de inhibición de W3 se complementó con la realización de un estudio computacional de su interacción con AChE utilizando el mismo procedimiento aplicado a LL, que incluyó el modelado molecular del péptido, *docking* molecular, simulaciones de MD y cálculos de MM/GBSA. En la Figura 7 - Material Anexo se representa la evolución del RMSD del complejo durante la simulación. Se puede observar que se alcanza el equilibrio estructural en las fases finales de la DM.

Los resultados muestran que la interacción de W3 con AChE se produce en la misma región que para la secuencia original (PAS) lo que, también en este caso, concuerda con los resultados del ensayo cinético. Además, el triptófano introducido permaneció cerca de tres residuos críticos de este sitio durante todo el tiempo de simulación. La Figura 38 A muestra un primer plano de este residuo dentro del complejo W3 - AChE en una captura representativa extraída de los últimos 10 de 100 ns de simulación y la Figura 38 B muestra la energía de interacción de cada residuo del péptido con AChE, a partir de los cálculos de MM/GBSA.

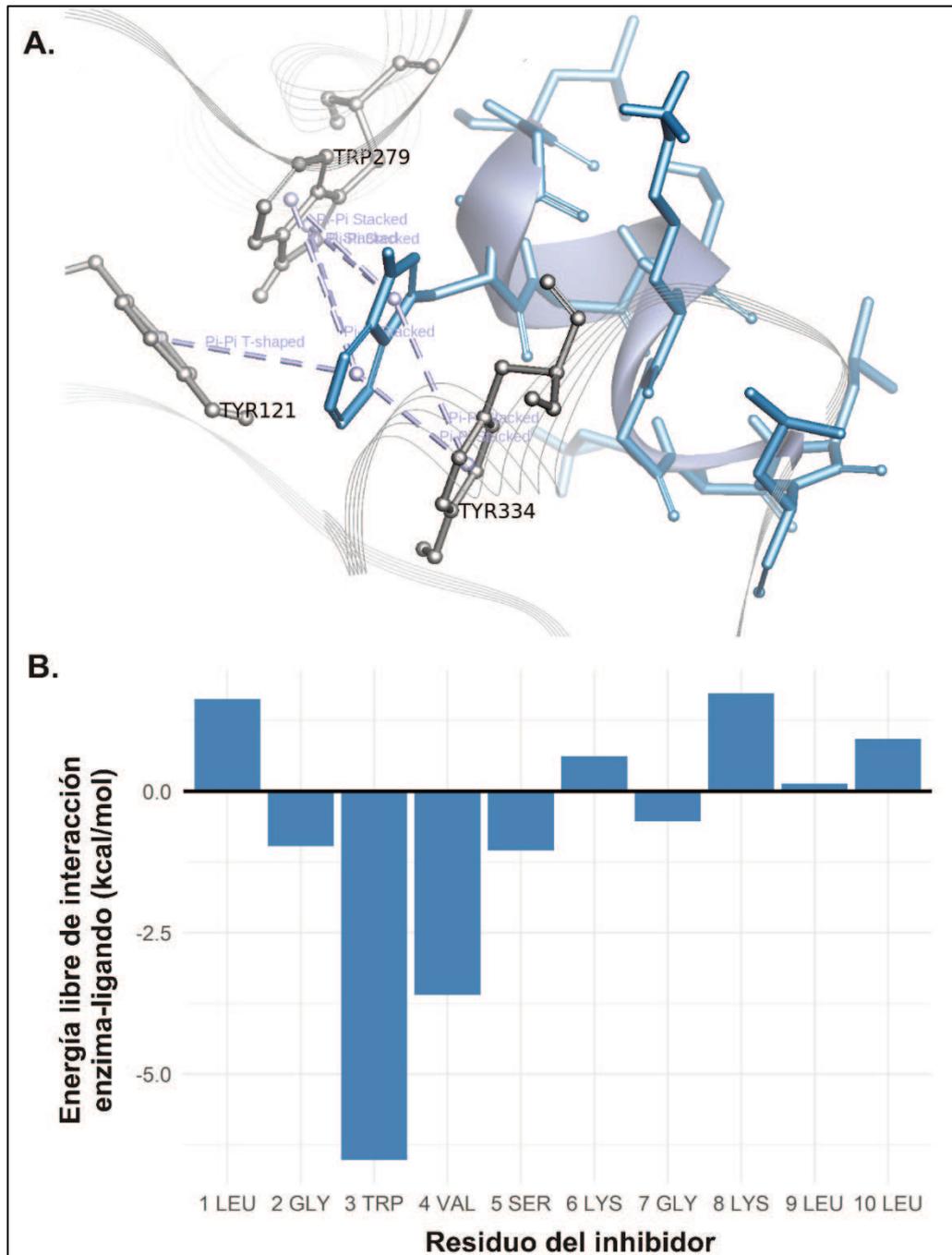


Figura 38: **A** Vista de primer plano de las interacciones aromáticas entre la cadena lateral de indol introducida del péptido W3 (azul) y los residuos críticos de la región PAS de AChE (gris). Procesado con el programa DS Visualizer (BIOVIA). **B** Energías de interacción ligando-residuo de la descomposición de energía MM-GBSA para el péptido W3, según residuo del ligando.

Como se puede observar en estas figuras, la cadena lateral indol del triptófano de W3 se intercala entre los residuos del PAS Tyr121, Trp279 y Tyr334 a través de interacciones de *stacking* aromática-aromática y este residuo tiene además la energía de interacción más baja de la secuencia. Su ΔG ($-6,52 \pm 0,11$

kcal/mol) fue muy inferior al estimado para la prolina de LL ($-3,80 \pm 0,03$ kcal/mol) en la simulación de esta secuencia con AChE (Figura 32), lo que justifica la notable diferencia en la actividad de estas dos secuencias frente a la AChE. Además, estos resultados sugieren que fue exitosa la estrategia implementada para intensificar las interacciones hidrofóbicas del residuo en la posición 3 de la secuencia base reemplazando las interacciones alifático-aromáticas de la cadena lateral de prolina por interacciones aromática-aromática.

La estrategia de diseño racional fue exitosa y al mismo tiempo diferente respecto a enfoques empleados por otros autores. Yaneva et al. (2017) obtuvieron un péptido modificado con un IC_{50} de $34,46 \mu\text{M}$ al fusionar galantamina (un típico inhibidor de AChE) con un tetrapéptido. Otro enfoque consiste en obtener péptidos a partir de proteínas o péptidos más grandes mediante estrategias de diseño aleatorio o racional. Yu et al. (2018) utilizaron un enfoque aleatorio evaluando la actividad de péptidos obtenidos por hidrólisis de albúmina. Su secuencia más activa alcanzó un 61% de inhibición de EeAChE a $400 \mu\text{M}$. Nuestro grupo de trabajo, por otra parte, empleó la estrategia racional para diseñar secuencias más cortas a partir de los péptidos Hp-1971 de *B. pulchella*. Los análogos de Hp-1971 se diseñaron mediante un análisis computacional del complejo Hp-1971-AChE (Siano et al. 2017). En la Tabla 9 se reporta la comparación entre varios inhibidores peptídicos de EeAChE naturales modificados y las estrategias utilizadas para obtenerlos. Se muestran los valores IC_{50} disponibles.

Tabla 9. Actividad inhibitoria de EeAChE de péptidos naturales modificados

Péptido	Secuencia	Fuente / Diseño	IC_{50} (μM)	Actividad frente a EeAChE	Referencia
LL	LGPVSKGKLL-NH ₂	Desplazamiento de secuencia	-	80% ($400 \mu\text{M}$)	-
W3	LGWVSKGKLL-NH ₂	Substitución aromática	10.42	83.95 % ($400 \mu\text{M}$)	-
KLPGF	KLPGF	Hidrolizado de albúmina	-	61% ($89 \mu\text{M}$)	Yu et al. 2018
I ₅	Boc-VNLAG-OGal	Fusión de galantamina	34.46	-	Yaneva et al. 2017
7-21	GLPLGAGPAAGPG KR-NH ₂	Computacional	-	33% ($400 \mu\text{M}$)	Siano et al. 2017

4.4.3. Actividad frente a las isoformas humanas recombinantes de AChE y BChE

4.4.3.1. Estimación de la IC₅₀

Aunque la EeAChE es muy útil en las etapas iniciales de descubrimiento y desarrollo de los inhibidores de las colinesterasas, debido a su bajo costo y alta estabilidad, es más importante probar potenciales candidatos frente a las variantes humanas. Por esta razón, se realizó un ensayo inhibitorio *in vitro* basado en la reacción de Ellman utilizando, esta vez, la isoforma humana de la AChE, obtenida mediante la tecnología de expresión recombinante en células de mamíferos (rhAChE). Además, se evaluó el potencial de estos compuestos como inhibidores duales de AChE y BChE, de gran interés farmacológico, al realizar el ensayo también utilizando la BChE humana recombinante rhBChE.

Los péptidos se ensayaron a seis concentraciones en todos los casos y, para los mejores inhibidores, se debió extender el rango de análisis a diez concentraciones. A partir de los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática se ajustaron curvas de dosis respuesta utilizando el modelo logístico de cuatro parámetros, con las cuales se estimaron los valores de IC₅₀. Dichos valores se reportan en la Tabla 10, mientras que las curvas de dosis-respuesta para hAChE y hBChE se muestran en Figura 39 A y 39 B, respectivamente.

Tabla 10. Actividad inhibitoria de las isoformas humanas de las colinesterasas del péptido LL y sus análogos

Péptido	rhAChE IC ₅₀ (μM)	rhBChE IC ₅₀ (μM)
LL	97,89 ± 7,13	192,20 ± 22,03
Y3	267,30 ± 10,21	23,27 ± 1,08
F3	208,20 ± 14,50	49,89 ± 3,52
W3	0,99 ± 0,02	15,44 ± 0,91
W7	25,77 ± 0,77	255,60 ± 17,50
Y3Y7	50,67 ± 2,09	19,11 ± 0,72
Y3W7	2,66 ± 0,05	16,16 ± 1,04
W3W7	1,70 ± 0,05	9,40 ± 0,48
F3 (4-F)	137,90 ± 7,81	47,18 ± 1,44
Rivastigmina	23,30 ± 0,44	0,08 ± 0,04

Los datos expresan el promedio ± DE (n = 3)

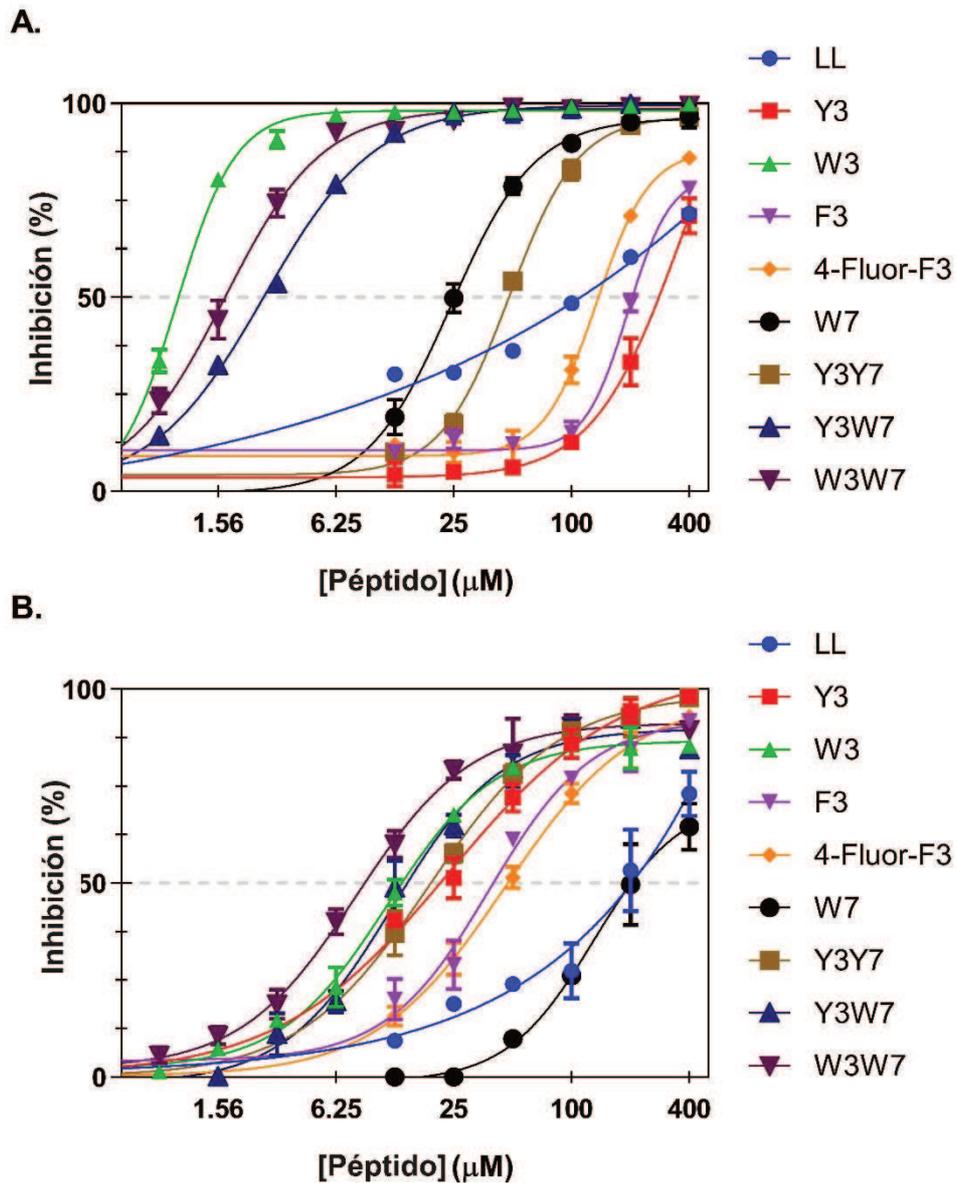


Figura 39: **A** Porcentaje de inhibición de la actividad de hAChE y **B** hBChE por LL y derivados frente a la concentración de péptido (escala logarítmica). Los puntos expresan la media \pm DE ($n = 3$).

Al igual que con EeAChE, el péptido más activo frente a rhAChE fue W3, pero en este caso su actividad fue diez veces mayor con una IC_{50} de $0,99 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Era esperable una mayor actividad contra rhAChE respecto a EeAChE, ya que la variante humana normalmente es más sensible a los inhibidores que la variante de *E. electricus* (Sepsova et al., 2013).

No hay reportes en la bibliografía de un inhibidor peptídico más potente frente a hAChE. Hasta la fecha, el más activo era el octapéptido OP5 obtenido mediante diseño *de novo* reportado por Mondal et al. (2018) (IC_{50} , $7,34 \mu\text{M}$).

Además, el péptido W3 también mostró una actividad inhibitoria significativa contra la rhBChE (IC_{50} , $15,44 \pm 0,91 \mu\text{M}$).

Los resultados de inhibición de los otros derivados revelaron que el péptido W3W7 con dos sustituciones de Trp inhibió la hAChE y la hBChE con valores de IC_{50} de $1,70 \pm 0,05 \mu\text{M}$ y $9,40 \pm 0,48 \mu\text{M}$, respectivamente. Este péptido fue el más potente contra hBChE. No hay reportes de un inhibidor péptídico de hBChE con actividad más elevada que la de W3W7.

Para los restantes análogos, los valores de IC_{50} variaron entre $2,66 \pm 0,05 \mu\text{M}$ y $267,30 \pm 10,21 \mu\text{M}$ para los inhibidores de hAChE y entre $16,16 \pm 1,04 \mu\text{M}$ y $255,60 \pm 17,50 \mu\text{M}$ para los inhibidores de hBChE, lo que indica un efecto positivo general de la estrategia de sustitución aromática para aumentar la inhibición.

4.4.3.2. Cinética y mecanismo inhibitorio de los mejores derivados sobre hAChE y hBChE

Los estudios cinéticos y computacionales previamente descritos determinaron que el mecanismo inhibitorio del péptido W3 frente a EeAChE es de tipo reversible no competitivo con interacción en la región del PAS. Para evaluar la interacción en este caso frente a hAChE, se modeló de manera similar la interacción enzima-ligando del complejo W3-hAChE, y se realizó un ensayo cinético para determinar su K_i . Además, se estudió computacionalmente la interacción de hBChE con el mejor inhibidor frente a esta enzima, el derivado W3W7.

Los experimentos computacionales siguieron el esquema de análisis aplicado para los complejos previamente estudiados, que incluye modelado molecular de las estructuras peptídicas en agua y cálculos de *docking* flexible de estas con estructuras experimentales de las enzimas, cuyas predicciones se sometieron a 100 ns de simulaciones de dinámica molecular para evaluar la confiabilidad de los resultados y, finalmente, un estudio energético MM/GBSA para perfeccionar el análisis sobre el mecanismo de interacción.

Con respecto al ensayo *in vitro* de cinética, la K_i del mejor inhibidor de hAChE, el péptido W3, fue de $1,61 \pm 0,47 \mu\text{M}$. Como se esperaba de los resultados anteriores, las curvas de Michaelis-Menten indican un mecanismo inhibidor no competitivo (Figura 40).

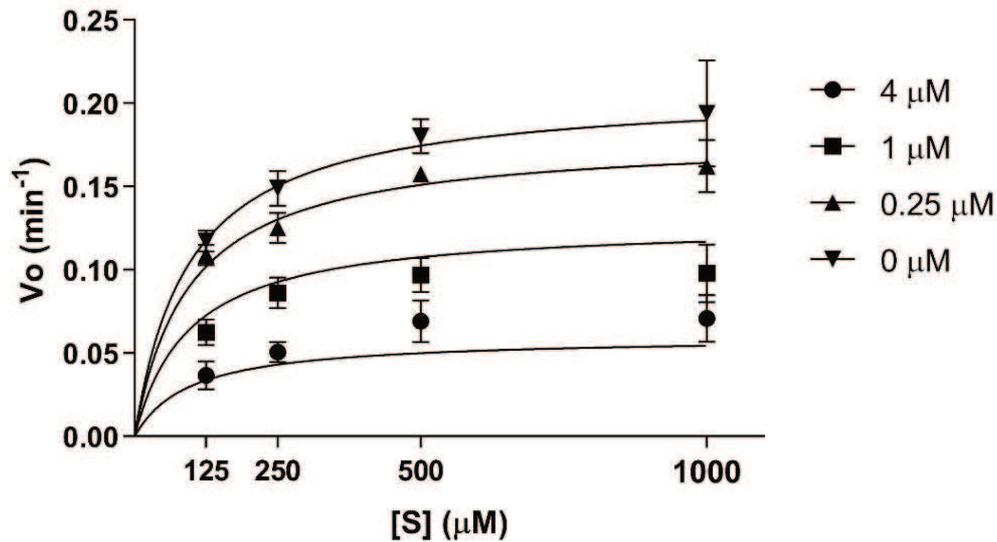


Figura 40: Velocidad inicial (V_0) de la reacción de AChE frente a la concentración de sustrato ($[S]$) en ausencia ($0 \mu\text{M}$) y presencia ($0,25 - 4 \mu\text{M}$) del péptido W3. Datos expresados como media \pm DE ($n = 3$).

Los resultados del ensayo de cinética enzimática concuerdan con los cálculos de *docking* para W3 con hAChE, que colocan al péptido en la región PAS de la enzima. Lo mismo se observó para W3W7 con hBChE. Las simulaciones de DM corroboraron estas predicciones, ya que las configuraciones predichas se mantuvieron durante las etapas de producción de las simulaciones con sólo leves reordenamientos (Figuras 8 y 9 - Material Anexo). En las Figuras 41 A y B se ilustran representaciones de primer plano de trayectorias representativas extraídas de los últimos 10 ns de simulación para los complejos de hAChE-W3 y hBChE-W3W7, respectivamente.

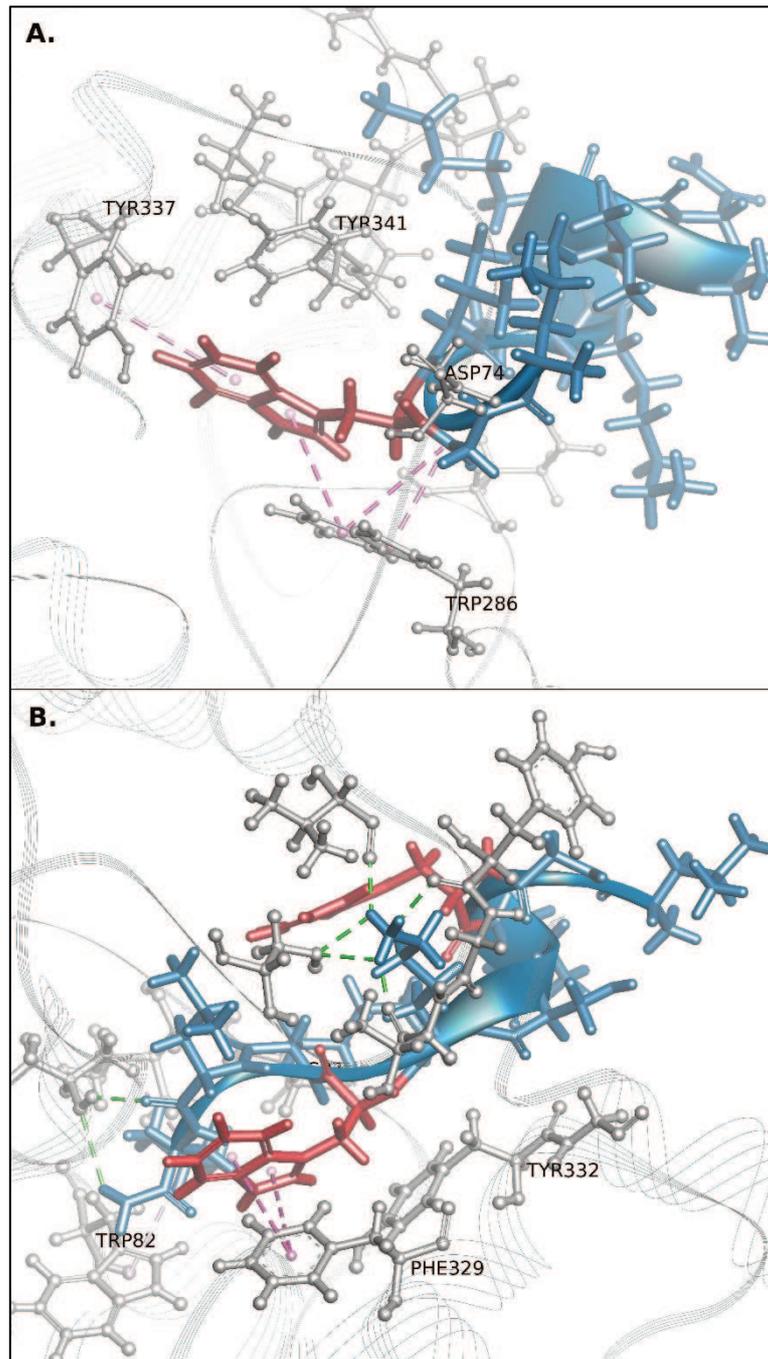


Figura 41: Vista de primer plano de la posición de unión predicha para **(A)** el péptido W3 con hAChE y **(B)** el péptido W3W7 con hBChE. Las enzimas se muestran en gris, los ligandos en azul y los residuos mutados en rojo. Procesado con el programa DS Visualizer (BIOVIA).

4.4.3.3. Análisis del complejo W3-hAChE

Según se puede observar en Figuras 41 A, la mutación Pro 3 Trp (sustitución de Pro3 de LL por Trp) permitió la formación de interacciones aromática-aromática entre la cadena lateral indol del residuo Trp incorporado y

residuos del PAS, para la interacción de W3 con la hAChE. La conclusión es similar a la que se expuso en las secciones anteriores para el caso de la interacción de W3 con la AChE de organismos eléctricos.

El gran bolsillo aromático de la región en la que se encuentra el PAS resultó idóneo para la inserción del Trp introducido en la secuencia, en comparación con la inserción del residuo de Pro original. En el núcleo de PAS, AChE_Trp286^(*) desempeña un papel fundamental en el acomodamiento del sustrato catiónico ACh en las primeras etapas de las interacciones sustrato-AChE (Johnson & Moore, 2006). Además, diversos estudios de mutación, en los que Trp286 se mutó por Ala, comprobaron la importancia de este residuo para inhibidores que actúan tanto en el sitio PAS, como es el caso del propidio, como para inhibidores que actúan simultáneamente en el PAS y el CAS, como el donepezilo (Barak et al., 1994; Saxena et al., 2003). En la Figura 41 A se puede observar que W3_Trp3 se coloca cerca de AChE_Trp286 formando una interacción de *stacking* π - π desplazada paralelamente que se mantuvo durante toda la simulación. Esto se puede observar en la Figura 10 - Material Anexo, que muestra la variación de la distancia entre el centro de los anillos indol de los dos residuos de Trp durante la simulación. Además, los resultados sugieren que una interacción aromática adicional en forma de T con AChE_Tyr337 del subsitio aniónico estabiliza la orientación final de W3_Trp3. El subsitio aniónico es un bolsillo de unión a colina que interactúa con el grupo amino cuaternario cargado de ACh y es el sitio de unión de importantes inhibidores de hAChE como la tacrina (Dileep et al., 2022; Karunakaran et al., 2022). Se puede considerar que estas interacciones fundamentan la actividad inhibidora aumentada del derivado W3 en comparación con la actividad de la molécula base LL.

Para analizar con más detalle estos complejos enzima-ligando, se recurrió nuevamente a cálculos de MM/GBSA, que proporcionan datos valiosos sobre las interacciones, ya que se realizan sobre un conjunto de 100 trayectorias de los últimos 10 ns de simulación. Las afinidades de unión enzima-ligando globales calculadas para los sistemas W3-hAChE y W3W7-hBChE fueron $-24,77 \pm 7,44$

(*) Se utiliza esta notación para indicar la molécula a la que corresponde el residuo que se menciona. De esta manera, AChE_Trp286 indica el residuo Trp286 de AChE, mientras, por ejemplo, W3_Trp3 indica el residuo Trp3 del péptido W3.

kcal/mol y $-24,31 \pm 3,77$ kcal/mol, respectivamente. Al descomponer esta energía global por residuo, para el caso de W3-hAChE, se observan perfiles energéticos consistentes con los resultados sobre el mecanismo de unión a la enzima. La descomposición por residuo de ligando muestra que W3_Trp3 aporta la mayor afinidad (menor ΔG libre de unión) para la estabilización del complejo (Figura 42 A). Además, la descomposición de ΔG por residuo del receptor muestra que los residuos AChE_Asp74, AChE_Trp286 y AChE_Tyr341 se unen con la mayor afinidad al péptido (Figura 42 B), lo que confirma que el PAS es la principal región de unión.

4.4.3.4. Análisis del complejo W3W7-hBChE

El análisis de la conformación predicha del complejo W3W7-hBChE (Figura 41 B) también revela el importante rol de los residuos de Trp incorporados para la afinidad enzima-ligando. En este caso, el reemplazo del residuo de Gly en posición 7 por Trp parece ser crítico ya que el grupo indol de W3W7_Trp7 está bien acomodado en el PAS y cerca del sitio aniónico a través de interacciones aromáticas en forma de T entre este fragmento y BChE_Tyr332 del PAS y BChE_Phe329 del sitio aniónico. Esta conformación podría explicar la actividad inhibitoria de hBChE del derivado W3W7, ya que se observaron interacciones con BChE_Phe329 y BChE_Tyr332 en otros inhibidores de hBChE (Vicente-Zurdo et al., 2022; Nadeem et al., 2022). Ambos residuos arilo (Phe329 y Tyr332) son fundamentales para la actividad de hBChE, ya que se ha demostrado su implicancia en el proceso de unión del sustrato en un estudio de competencia de sitio empleando variantes salvajes y mutantes de hBChE con diferentes sustratos (Rosenberry et al., 2012; Macdonald, 2012).

Otra interacción que puede contribuir a la actividad inhibitoria de W3W7 se observa entre W3W7_Leu10 y BChE_Trp82, residuo que pertenece a la región del bolsillo enzimático de unión a colina de la BChE. Estas predicciones fueron confirmadas por la descomposición de energía libre por residuo, que estimó energías libres de unión de $-6,76$ kcal/mol y $-6,11$ kcal/mol para los residuos del ligando W3W7_Trp7 y W3W7_Leu10, respectivamente, y de $-2,00$ kcal/mol, $-2,22$ kcal/mol y $-4,52$ kcal/mol para los residuos de la enzima

W3W7_Asp70, W3W7_Trp82 y W3W7_Tyr332, respectivamente (Figura 42 C, D). Además, los resultados de estos cálculos sugieren que la sustitución de Pro 3 por Trp también fue importante para la unión de W3W7 con BChE (ΔG , -6,16 kcal/mol).

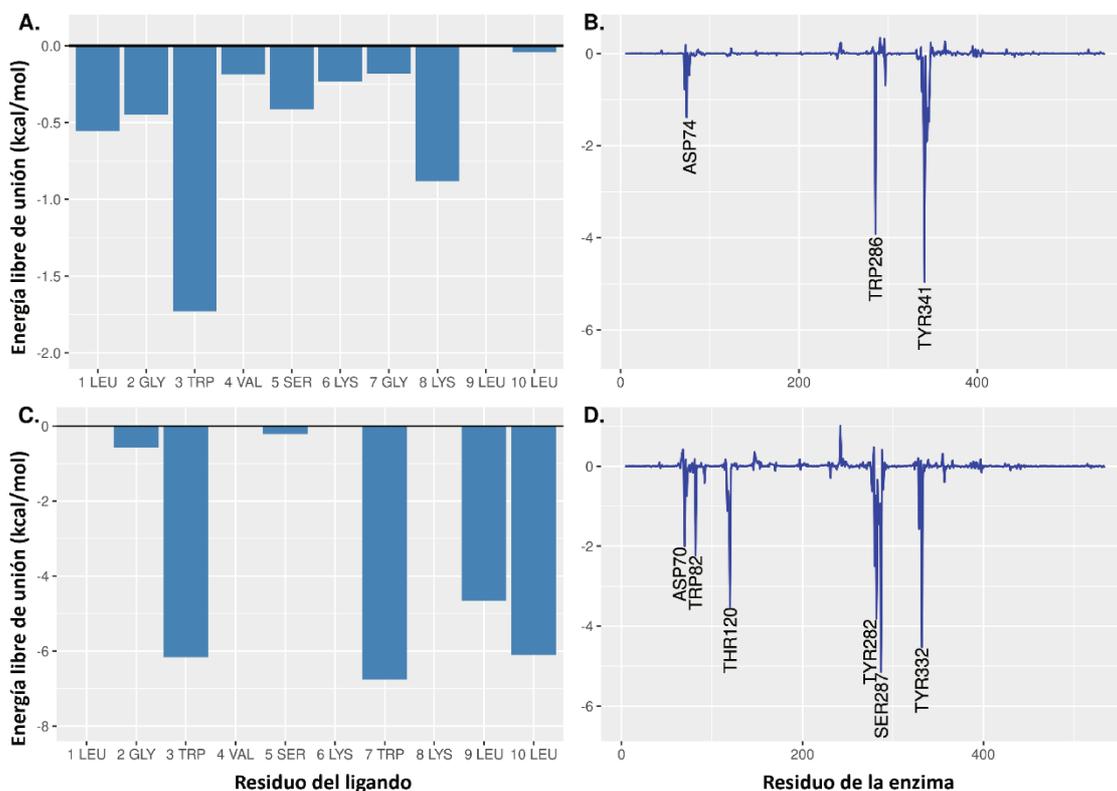


Figura 42: Energías de interacción ligando-residuo de la descomposición de la energía de unión libre de MM/GBSA para (A) W3-hAChE por residuo de ligando (B) W3-hAChE por residuo de receptor (C) W3W7-hBChE por residuo de ligando (D) W3W7-hBChE por el residuo del receptor.

El hecho de que la adición de un grupo indol aumente la actividad inhibitoria frente a BChE era esperable. Diversos investigadores han empleado este grupo químico en búsqueda de nuevos inhibidores de la colinesterasa ya sea como ligandos únicos o multifuncionales. Meden et al. (2019) diseñaron y sintetizaron con éxito una serie de inhibidores de BChE derivados de Trp activos *in vivo*. La estructura cristalina de su mejor compuesto con hBChE reveló el papel crítico del anillo de indol del inhibidor dentro del bolsillo de unión a acilo de hBChE. Zhan et al. (2010), por su parte, descubrieron que el fragmento de indol era importante para la retención de la bioactividad al estudiar una serie de inhibidores basados en alcaloides. Recientemente, con un enfoque similar al

empleado en este trabajo de tesis, Nadeem et al. (2022) emplearon el grupo indol para potenciar las interacciones con los residuos hidrofóbicos blanco de las colinesterasas (tanto AChE como BChE) en una serie de derivados mono- y bi-indol. De este modo, obtuvieron inhibidores activos a concentraciones nanomolares que mostraron contactos estabilizadores entre los anillos de indol de los ligandos y los residuos Trp286 y Tyr341 para AChE y Tyr332 para BChE. Otros autores también reportaron procedimientos similares para obtener potentes inhibidores de las colinesterasas (Ismail et al., 2012; Fadaeinasab et al., 2011; Zhan et al., 2020; Padrtová et al., 2020; Wichur et al., 2021).

4.5. Otras propiedades de interés y toxicidad

En la introducción de esta Tesis se explicó como la EA tiene una etiología compleja y los compuestos capaces de modular múltiples objetivos de relevancia para esta enfermedad son muy deseados (de Freitas Silva et al., 2018). El último fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de esta patología se enfoca en la reducción de la formación de las placas seniles de péptido A β . Además, se encuentran en fases avanzadas de desarrollo drogas que tienen actividad antioxidante y quelante de iones de metales (Cummings et al., 2022), debido al importante rol del estrés oxidativo en la toxicidad neuronal (Chen & Zhong 2014). Los compuestos que poseen alguna de estas bioactividades se destacan también por poder ser considerados para otras enfermedades neurodegenerativas, ya que estos procesos no son específicos de la EA (Morén et al., 2022). Por estas razones, se realizaron una serie de ensayos *in vitro* para evaluar el potencial de las moléculas estudiadas en este trabajo como potenciales agentes *multitarget*.

A tal fin, se probó el potencial de los derivados sintetizados para neutralizar al radical DPPH (actividad antioxidante), actuar como quelante de iones Fe²⁺ y, finalmente, se evaluó la actividad antiagregante del péptido A β del derivado más destacado por su actividad inhibitoria, el péptido W3.

4.5.1. Propiedades de interés

4.5.1.1. Actividad antioxidante

Las propiedades antioxidantes se evaluaron con la reacción del DPPH. La actividad neutralizadora de radicales DPPH en función de la concentración se muestra en la Figura 43, en tanto que los valores estimados de EC₅₀ se muestran en la Tabla 11, para las secuencias con las cuales dicho valor se pudo determinar.

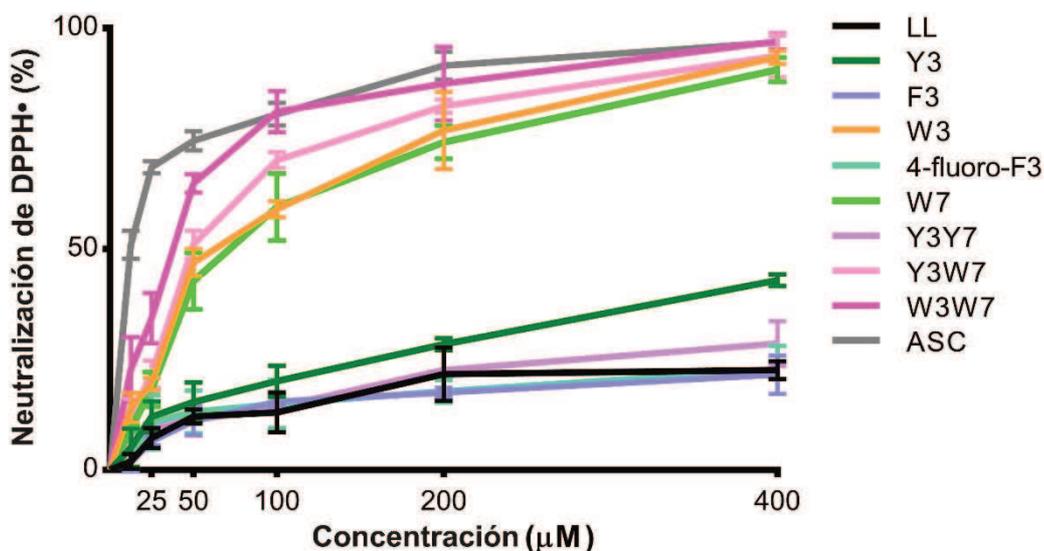


Figura 43: Porcentaje de actividad secuestrante de DPPH de LL y sus derivados. Datos expresados como media \pm DE ($n = 3$). ASC: ácido ascórbico.

Tabla 11. Actividad secuestrante de radicales (ensayo del DPPH) del péptido LL y sus derivados

Péptido	DPPH EC ₅₀ (µM)
LL	-
Y3	-
F3	-
W3	78.31 \pm 18.18
W7	66.94 \pm 14.34
Y3Y7	-
Y3W7	43.94 \pm 8.12
W3W7	27.58 \pm 8.74
F3 (4-F)	-

Los datos expresan el promedio \pm DE ($n = 3$)

Los valores de EC₅₀ se calcularon para los péptidos que alcanzaron al menos el 50% de actividad a las concentraciones ensayadas

En Figura 43, se puede observar que la actividad antioxidante de los análogos que contienen Trp es notablemente más alta que la de los otros análogos. Este es un resultado alentador ya que el inhibidor más activo, el compuesto W3, contiene Trp y, de hecho, fue uno de los más antioxidantes, disminuyendo a la mitad la absorbancia producida por las de las moléculas DPPH a 50 µM (47,00 % \pm 3,11) y el 93,47 % \pm 1,53 a 400 µM.

Sin embargo, el péptido con mejor actividad secuestrante de radicales fue W3W7 con dos residuos de Trp, lo que sugiere que la inserción de este aa en un péptido resulta ser una estrategia interesante para mejorar su actividad antioxidante. Si bien ya existen reportes de las propiedades antioxidantes de Trp y los péptidos que contienen Trp (Nayak & Buttar 2016; Matsui et al., 2017; Li et al., 2019), no había hasta ahora reportes sobre el efecto antioxidante de Trp al ser introducido en una secuencia con bajo o nulo poder antioxidante. Un resultado similar fue informado para el caso de inserción de histidina por Mirzaei et al. (2019), quienes encontraron que el reemplazo de Pro con His en un decapeptido aumentó la actividad inhibitoria de radicales 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), pero, en ese caso, la actividad inhibidora de DPPH no se modificó.

La actividad de neutralización de radicales mostrada por el péptido W3W7 fue similar a la del ácido ascórbico que se empleó como control positivo. El valor de EC_{50} estimado para W3W7 ($27,58 \mu\text{M} \pm 8,74$) y, en general, el de los análogos que contienen Trp fue más alto que el de numerosas secuencias informadas previamente (Tanzadehpanah et al., 2018; Ko et al., 2012; Zhu et al., 2016; Agrawal et al., 2019). Además, estos resultados se suman a algunos reportes de péptidos antioxidantes derivados de secuencias originalmente aisladas de ranas, lo que sugiere que los anfibios podrían ser una fuente importante de secuencias base para el diseño de péptidos antioxidantes.

4.5.1.2. Actividad quelante

Nuestra evaluación del potencial efecto neuroprotector de estas secuencias se complementó con el estudio de su capacidad quelante sobre los iones Fe(II). El entorno altamente tóxico generado por las placas de A β en pacientes con EA provoca una desregulación de los niveles de metales esenciales (Lakey-Beitia et al., 2021). Entre éstos, los más críticos e implicados en la EA son los iones de hierro, cobre y zinc (Chen et al., 2023).

En la Figura 44 se muestran los resultados del ensayo colorimétrico basado en ferrozina. Notablemente, los análogos W3 y W3W7 mostraron los valores más elevados de actividad quelante de hierro a $400 \mu\text{M}$, cercanos al 75

%. Aunque 400 μM está lejos de su IC_{50} frente a hAChE, estos resultados remarcan que los compuestos estudiados pueden considerarse como base de agentes anti-Alzheimer multifuncionales. Además, este es el primer reporte de secuencias peptídicas derivadas de piel de rana que muestran propiedades quelantes de metales.

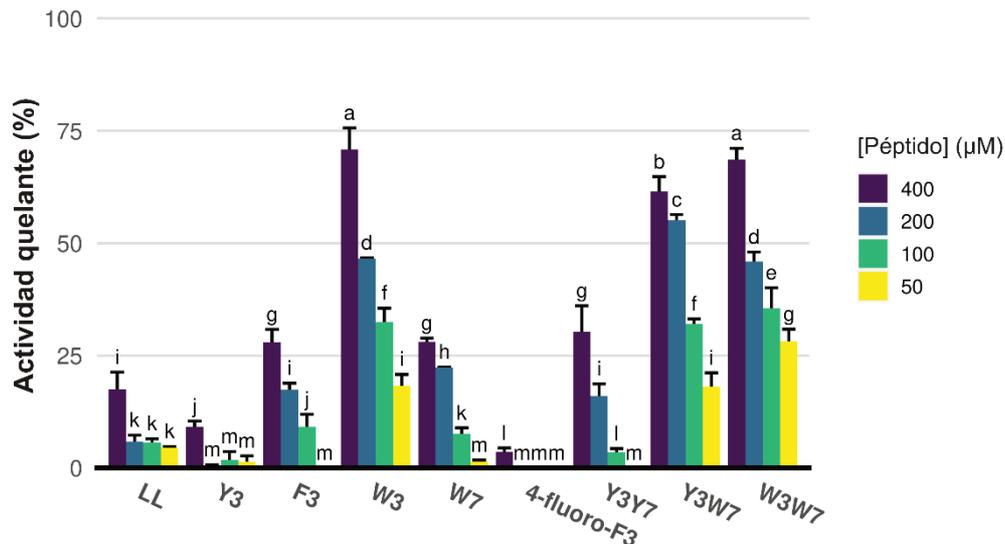


Figura 44: Actividad quelante de Fe^{2+} de LL y sus derivados. Datos expresados como media \pm DE ($n = 3$). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa.

4.5.1.3. Actividad antiagregante de $\text{A}\beta$

Los inhibidores de AChE que se unen selectivamente al PAS, como el yoduro de propidio (PI), pueden interferir con el proceso de agregación de $\text{A}\beta$ catalizado por AChE (Bartolini et al., 2003; Alarcón-Enos et al., 2022). Este fenómeno puede ser fundamentado gracias a la amplia evidencia que muestra que el PAS se puede unir a $\text{A}\beta$, promoviendo la formación de fibrillas de $\text{A}\beta$ y, por ende, de placas amiloides (Sang et al., 2022).

Para evaluar la capacidad antiagregante del derivado más activo (W3), se realizó un ensayo *in vitro* de agregación fluorimétrico basado en la tioflavina T, siguiendo el método reportado por Chen et al. (2014). Esta técnica consiste, en síntesis, en el monitoreo de los cambios en la intensidad de fluorescencia de ThT, la cual depende de la presencia de agregados de $\text{A}\beta$, en presencia de AChE

y presencia o ausencia de 10 μM de W3 a diferentes tiempos. Se utilizó PI como control positivo de compuesto antiagregante y como péptido A β se empleó la isoforma más abundante, A β_{40} , sintetizada mediante Fmoc-SPPS. Si bien la agregación de A β_{40} es un proceso de larga duración, la reacción *in vitro* empleando AChE (EeAChE en este caso), que favorece el proceso a través de su sitio PAS y una adecuada presencia de iones en el medio, permiten acelerar la agregación y evaluar la inhibición luego de 8 horas de incubación (Chen et al., 2014).

Los resultados de este estudio revelaron que W3, a la concentración ensayada de 10 μM , presenta una gran capacidad para inhibir la agregación de A β inducida por AChE, como puede verse en la Figura 45, en donde se representa el porcentaje de inhibición de la agregación. La fluorescencia se midió después de 3, 5 y 8 horas de agregación. Después de 8 horas, el porcentaje de inhibición mostrado por W3 fue de 94,2 % \pm 1,2.

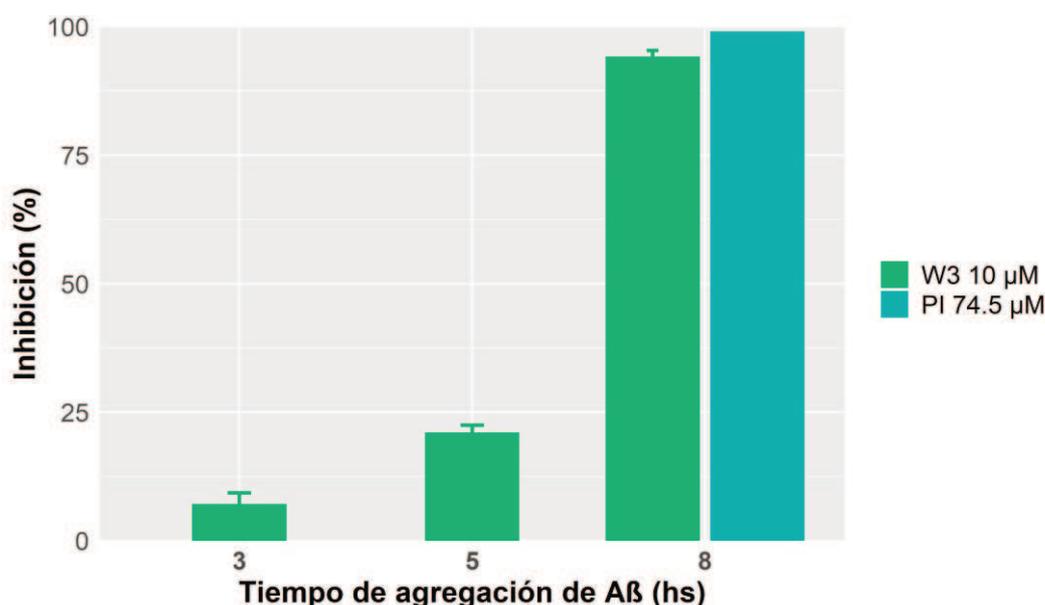


Figura 45: Inhibición de la agregación de A β inducida por AChE por el derivado W3 después de 3, 5 y 8 horas de reacción. Las barras expresan la media \pm DE ($n = 3$).

La actividad inhibitoria observada frente a la agregación del péptido A β puede explicarse por la interacción predicha de W3 con residuos clave de la región del PAS como el residuo Trp al centro sitio, a través del residuo de Trp (Trp3) introducido en la secuencia, que se discutió en las secciones anteriores. Muchos compuestos con actividad antiagregante reportados mostraron

interacciones con este residuo (Chen et al., 2014; Viayna et al., 2013; Malafaia et al., 2021). A pesar de esto, no podemos excluir que exista una interacción directa W3-A β , que contribuir a la inhibición, como se reportó para otros péptidos o miniproteínas. Por ejemplo, Murray et al. (2022) diseñaron una miniproteína que inhibió la agregación de A β a través de interacciones proteína-proteína. Del mismo modo, Preetham et al. (2022), desarrollaron un péptido de 12 residuos conteniente β -aminopirrolidina que muestra una potente actividad antiagregante. Además, no se encontraron en la literatura reportes de péptidos que inhiban selectivamente la agregación de A β inducida por AChE.

Si bien este ensayo se realizó en condiciones que aceleran la agregación, se comprobó también la capacidad del péptido A β ₄₀ sintetizado de formar estructuras fibrilares mediante su espontánea agregación en agua pura durante 24 horas. Para ello se llevó a cabo un análisis de microscopía SEM sobre una solución acuosa de A β ₄₀ a una concentración de 50 μ M. Dado que la fluorescencia de ThT se ve aumentada también frente a estructuras pre-fibrilares, para confirmar la formación de fibrillas se debe recurrir a estudios de imagen como SEM o TEM (Arad et al., 2021). Las imágenes obtenidas a través de este estudio permitieron observar que el proceso de agregación del péptido sintetizado conduce a la formación de fibrillas características. La Figura 46 corresponde a la captura de una fibrilla bien formada visualizada mediante SEM y capturas adicionales se muestran en la Figura 11 del Material Anexo.

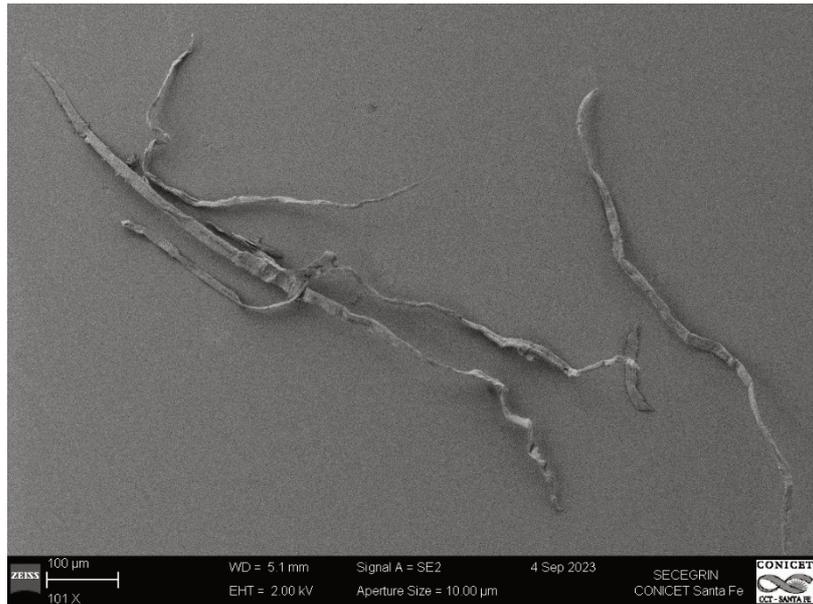


Figura 46: Micrografía SEM de una fibrilla de Aβ₄₀ a 50 μM luego de 24 h de agregación en agua pura.

4.5.2. Toxicidad

4.5.2.1. Actividad hemolítica

Los péptidos con potencial terapéutico deberían mostrar una baja toxicidad contra los eritrocitos. El estudio de hemólisis se ha convertido en un análisis de rutina en las primeras etapas de estudio de péptidos con fines terapéuticos. De hecho, la mayor parte de los modelos de predicción de toxicidad desarrollados para péptidos durante los últimos años apuntan a la estimación de su potencial hemolítico (Robles-Loaiza et al., 2022). Por estas razones, se evaluó el efecto hemolítico del péptido LL y sus análogos en GRh mediante la realización de un ensayo de hemólisis *in vitro*. Los resultados se muestran en la Figura 47.

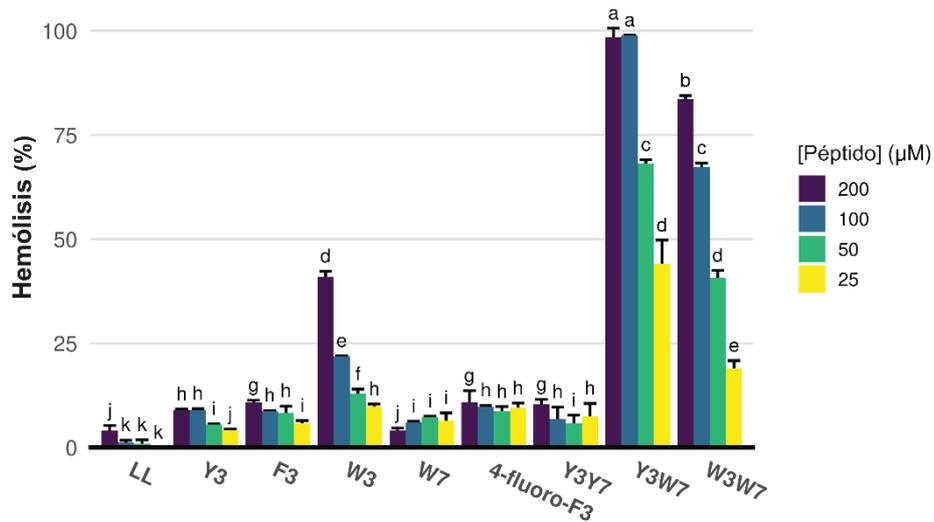


Figura 47: Actividad hemolítica de LL y sus análogos. Datos expresados como media \pm DE (n = 3). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa.

Ya se había reportado un valor de hemólisis bajo para el péptido Hp-1935, que se utilizó inicialmente para encontrar la secuencia de base LL (Siano et al., 2014). Esta última tampoco resultó hemolítica y, en comparación, los análogos mostraron actividades hemolíticas más altas, por lo que la inserción de grupos aromáticos aumentó esta actividad. El efecto hemolítico de los aa aromáticos se puede vincular a su hidrofobicidad, propiedad que, en general, favorece su capacidad para interactuar con las membranas biológicas. Por ejemplo, el trabajo de Kuhn-Nentwig et al. (2013) mostró que la sustitución de residuos aromáticos por residuos polares (Lys) disminuyó completamente la actividad hemolítica de péptidos obtenidos a partir de veneno de araña.

Sin embargo, la mayoría de los análogos sintetizados pueden considerarse no hemolíticos ya que su hemólisis estuvo por debajo del 10% a las concentraciones probadas. Los péptidos más hemolíticos fueron Y3W7 y W3W7 que contienen dos aa aromáticos. La actividad de lisis de eritrocitos de Y3W7 fue de $44,14 \% \pm 3,97$ a la concentración más baja ensayada ($25 \mu\text{M}$) y la de W3W7, una secuencia interesante por su actividad antioxidante e inhibitoria de hAChE y hBChE, fue de $19,01 \% \pm 1,31$. La hemólisis del derivado de LL más activo, W3, fue mucho menor ($9,85 \% \pm 0,41$ a $25 \mu\text{M}$). Este es un hallazgo

prometedor ya que 25 μM es un valor 25 veces mayor a la IC_{50} de este péptido frente a hAChE.

4.5.2.2. Toxicidad *in vivo* en *Artemia salina* (*A. salina*)

Para completar la evaluación del perfil tóxico inducido por los mejores inhibidores, W3 y W3W7, se evaluó su toxicidad en un ensayo *in vivo* empleando nauplios (larvas) de artemia (*A. salina*). Los resultados se muestran en la Figura 48.

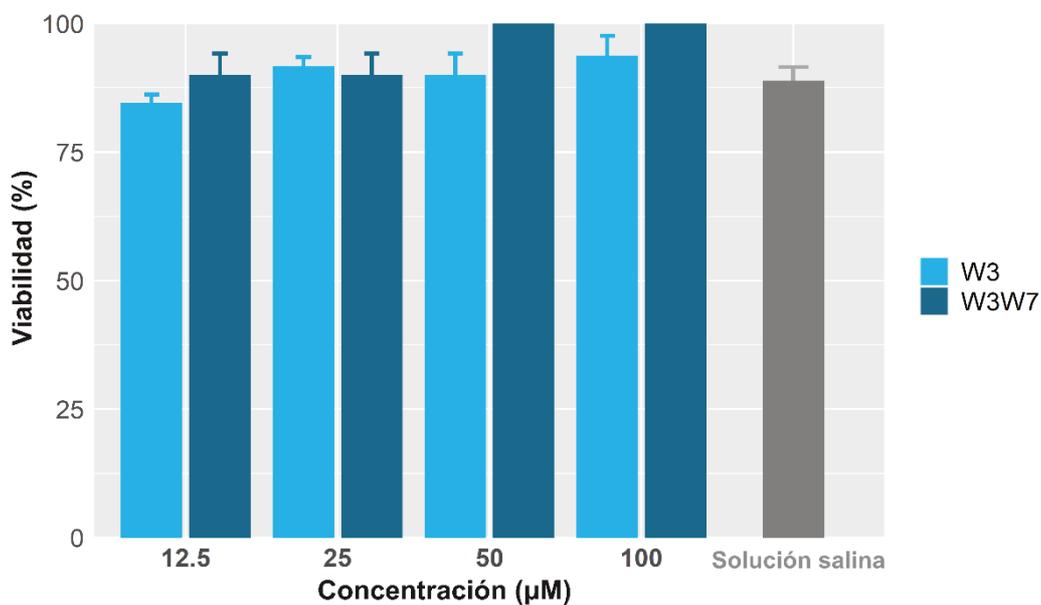


Figura 48 Efecto tóxico de los mejores inhibidores en nauplios de *A. salina*. Porcentaje de viabilidad de los nauplios en función de la concentración de péptido ensayada. Se utilizó solución salina como control positivo. Las barras expresan la media \pm DE ($n = 3$).

Este ensayo de letalidad basado en la supervivencia de los nauplios mostró una fuerte correlación con el ensayo MTT de toxicidad estándar y se ha propuesto como una buena alternativa para evaluar la toxicidad de compuestos pequeños (Rajabi et al., 2015). Los resultados no mostraron efectos tóxicos para los derivados W3 y W3W7 a las concentraciones estudiadas (12,5 – 100 μM), ya que no se observaron diferencias en comparación con el control negativo (solución salina).

Estos resultados concuerdan con los de actividad hemolítica, ya que tampoco indican una actividad tóxica elevada por parte de las secuencias. En particular, el péptido W3 fue hemolítico a concentraciones mucho mayores que

las necesarias para lograr una inhibición del 50 % de hAChE y, en este ensayo, su DL₅₀ (concentración que causa la muerte del 50 %) en larvas de *A. salina* fue mayor a 100 µM.

4.5.2.3. Toxicidad y estabilidad *in silico*

En los ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* realizados no se observó toxicidad por parte del péptido de mayor interés, el derivado W3, lo que destaca su potencial uso como fármaco. Por otra parte, los restantes derivados, al igual que el péptido base LL, no mostraron valores de hemólisis elevada. Para ampliar la evaluación de la posible toxicidad de estos péptidos, se aplicaron estudios teóricos de predicción de la toxicidad.

Para realizar la estimación, se empleó el método ToxinPred a partir de un servidor específico (Gupta et al., 2013). Se trata de un modelo predictivo generado con un enfoque de aprendizaje y entrenado sobre una base de datos principal conteniente 1805 secuencias de péptidos tóxicos (3593 negativos), con una longitud máxima de 35 residuos. Esta específica base de entrenamiento del modelo lo convierte en un buen método para predecir toxicidad de péptidos de corta longitud con fines terapéuticos (Adam, 2021; Harnkit et al., 2022; Li et al., 2022; Girija et al., 2023). No se realizó el cálculo para el derivado que contiene el residuo modificado 4-F-Phe ya que el modelo admite sólo residuos naturales.

La estimación indica que ninguno de los péptidos puede clasificarse como toxina (Puntaje SVM < 0). El puntaje SVM calculado para las secuencias, junto con otras propiedades estimadas por el programa ToxinPred (hidrofobicidad e hidrofiliidad relativas) se muestran en la Tabla 12. Los resultados de esta evaluación teórica concuerdan con los experimentales.

Tabla 12. Toxicidad *in silico* y otras propiedades de LL y sus derivados

Péptido	Secuencia	Puntaje SVM	Predicción	Hidrofobicidad	Hidrofilicidad
LL	LGPVSKGKLL	-0,81	No toxina	-0,01	-0,06
Y3	LGYVSKGKLL	-0,76	No toxina	0	-0,29
F3	LGFVSKGKLL	-0,96	No toxina	0,06	-0,31
W3	LGWVSKGKLL	-0,84	No toxina	0,04	-0,4
W3W7	LGWVSKWKLL	-0,82	No toxina	0,06	-0,74
Y3W7	LGYVSKWKLL	-0,78	No toxina	0,02	-0,63
Y3Y7	LGYVSKYKLL	-0,73	No toxina	-0,01	-0,52
W7	LGPVSKWKLL	-0,77	No toxina	0,01	-0,4

Finalmente, se utilizó una herramienta informática para estimar la estabilidad de los péptidos. Específicamente, se aplicó el método HLP (del inglés, *Half Life Prediction*) a través de un servidor específico (disponible en: <http://crdd.osdd.net/raghava/hlp/>). Esta técnica se basa en determinaciones experimentales de la hidrólisis de péptidos frente a proteasas intestinales, para comparar y predecir la estabilidad (vida media) de otros péptidos en un ambiente intestinal. Los resultados se clasifican como estabilidad Baja, Normal o Alta dependiendo del tiempo de vida media: los péptidos con un tiempo de vida media estimado menor a 0,1 s se consideran con una estabilidad Baja; aquellos con vida media entre 0,1 y 1,0 s se clasifican como péptidos con estabilidad Normal; y los que tengan una vida media mayor a 1 s se clasifican como péptidos de vida media Alta y estables. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Estabilidad en un ambiente intestinal estimada de LL y sus derivados

Péptido	Secuencia	Vida media (s)	Estabilidad HPL	Índice de inestabilidad
LL	LGPVSKGKLL	3,15	Alta	2,79 - Estable
Y3	LGYVSKGKLL	2,82	Alta	-16,47 - Estable
F3	LGFVSKGKLL	4,45	Alta	-24,96 - Estable
W3	LGWVSKGKLL	2,83	Alta	-12,62 - Estable
W3W7	LGWVSKWKLL	2,89	Alta	4.36 - Estable
Y3W7	LGYVSKWKLL	2,87	Alta	-7.98 - Estable
Y3Y7	LGYVSKYKLL	2,86	Alta	-7.98 - Estable
W7	LGPVSKWKLL	3,21	Alta	19.77 - Estable

Se incluye también, en Tabla 13, una columna con la determinación de la estabilidad según la herramienta ExPASy ProtParam, ya empleada para la determinación de otras propiedades fisicoquímicas (Tablas 3 y 6). Si bien no es un método específico para péptidos, admite secuencias desde los 5 aa, por lo que se lo incluyó para ampliar la evaluación sobre la estabilidad de LL y sus derivados. Este método se basa en el cálculo de un Índice de inestabilidad que depende de la presencia de determinados dipéptidos en la secuencia a evaluar (Guruprasad et al., 1990), de manera similar al enfoque que la herramienta HLP utiliza para péptidos de hasta 10 residuos de longitud. La secuencia se clasifica como Inestable cuando su Índice de inestabilidad estimado es menor a 40.

Los resultados clasifican a todos los péptidos como secuencias estables. El método HLP estimó vida media mayor a 2,8 s para todos los péptidos y, por lo tanto, los considera como secuencias de estabilidad Alta.

El Índice de inestabilidad computado por ProtParam arrojó resultados concordantes con los estimados por el método HLP, clasificando a todos los péptidos como estables (Índice de inestabilidad < 40).

CONCLUSIONES

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis doctoral se aplicaron técnicas de diseño molecular y de síntesis química en conjunto con ensayos de caracterización de propiedades biológicas, aprovechando de esta manera tanto herramientas de la química húmeda como de la química computacional, con el objetivo de desarrollar nuevos péptidos con elevada actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas, principales blancos de la EA.

Las estrategias de diseño empleadas fueron eficaces para lograr los objetivos previstos. La primera, una estrategia de diseño de desplazamiento de secuencia, permitió encontrar una buena secuencia base para el diseño de análogos de sustitución: se obtuvo una secuencia más corta (10 aa) que conservó un buen porcentaje de la actividad inhibitoria de la original. Si bien se trata de un enfoque de diseño simplificado, se demostró su utilidad para la detección de regiones activas dentro de una secuencia mayor. La segunda estrategia se basó en la introducción de grupos químicos aromáticos (típicamente presentes en los inhibidores de las colinesterasas) en la secuencia de base, a través de sustituciones aminoacídicas. Los residuos blancos de sustitución se seleccionaron luego de realizar el modelado molecular de la interacción entre el péptido base y la enzima y la estimación del perfil energético de esa interacción. Mediante este diseño racional de análogos de sustitución se logró obtener nuevas secuencias con una actividad inhibitoria notablemente más elevada respecto a la secuencia original, cumpliéndose con el objetivo principal propuesto.

Los resultados destacaron que el residuo que tuvo el mejor impacto para el aumento de la actividad fue el triptófano, en comparación con tirosina y fenilalanina. La secuencia de mayor actividad obtenida, el péptido W3 con una mutación de Pro 3 por Trp, mostró una actividad casi 100 veces más alta que la de la secuencia de base frente a la hAChE, con un valor de IC_{50} 0,99 μ M (\pm 0,02). Las técnicas de evaluación computacional de la interacción empleadas fueron útiles para comprender los resultados experimentales observados, al predecir

interacciones de π -stacking entre el grupo aromático de W3 y residuos clave de la región PAS de la hAChE y determinar una energía de interacción mayor para el Trp introducido respecto al residuo sustituido en la secuencia de base. En base a su demostrada actividad, esta molécula se destaca como el péptido más activo que se haya reportado contra las colinesterasas y demuestra el potencial de esta clase de compuestos como inhibidores enzimáticos.

Los compuestos desarrollados fueron evaluados también en lo que respecta a su actividad biológica frente a otros blancos de la EA:

Al igual que para la hAChE, frente a la hBChE se destacó el péptido W3 con un IC_{50} de $15,44 \pm 0,91 \mu M$, aunque la actividad más alta la aportó una secuencia con dos residuos de Trp, denominada W3W7. Este péptido mejoró 20 veces la actividad en comparación con la secuencia base LL, además de haber demostrado una elevada actividad también frente a la hAChE (IC_{50} , $1,70 \mu M \pm 0,05$).

Algunos de los análogos, en particular los que contienen Trp, mostraron un destacable potencial antioxidante y quelante. Este hallazgo enfatiza el interés sobre las secuencias que resultaron más activas al demostrar su potencial como agentes que intervienen simultáneamente en las diferentes vías fisiopatológicas que desencadenan los síntomas de la EA.

Entre las vías principales, se encuentra la formación de depósitos de péptido A β formando las placas seniles. Por este motivo, se estudió el compuesto W3 como agente antiagregante. Se encontró que, además de las propiedades ya mencionadas, este péptido es altamente activo *in vitro* contra el proceso de fibrilación de A β inducido por AChE, logrando inhibir el $94,2 \% \pm 1,2$ de su agregación luego de 8 horas. Esta actividad pudo ser explicada gracias a los estudios cinéticos y computacionales realizados que indican que el sitio de unión de este péptido es el PAS, a través del cual la AChE interviene justamente en el proceso de agregación de A β , favoreciéndolo. Las últimas drogas que se aprobaron para el tratamiento de la EA se dirigen hacia los depósitos de A β , lo que demuestra el gran interés por desarrollar moléculas que tengan esta propiedad, como es el derivado W3.

Finalmente, se evaluó mediante técnicas *in vitro*, *in vivo* e *in silico* la toxicidad de las secuencias. Los resultados demostraron que los péptidos más potentes, en particular W3, no presentaban toxicidad a las concentraciones activas, lo que aumenta significativamente el interés en su posible aplicación como fármacos.

La EA es una patología que se encuentra en acelerado crecimiento y posee una compleja etiología que requiere de modernos métodos de tratamiento. Estos avances podrían allanar el camino hacia el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para su abordaje.

Como perspectivas futuras, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, sería importante evaluar la actividad de los derivados W3 y W3W7 directamente frente a modelos *in vivo* específicos de la EA. No obstante, es importante remarcar que todos los objetivos propuestos fueron logrados exitosamente, dado que se obtuvieron secuencias que justifican ampliamente el progreso hacia una nueva etapa de investigación.

MATERIAL ANEXO

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

6. MATERIAL ANEXO

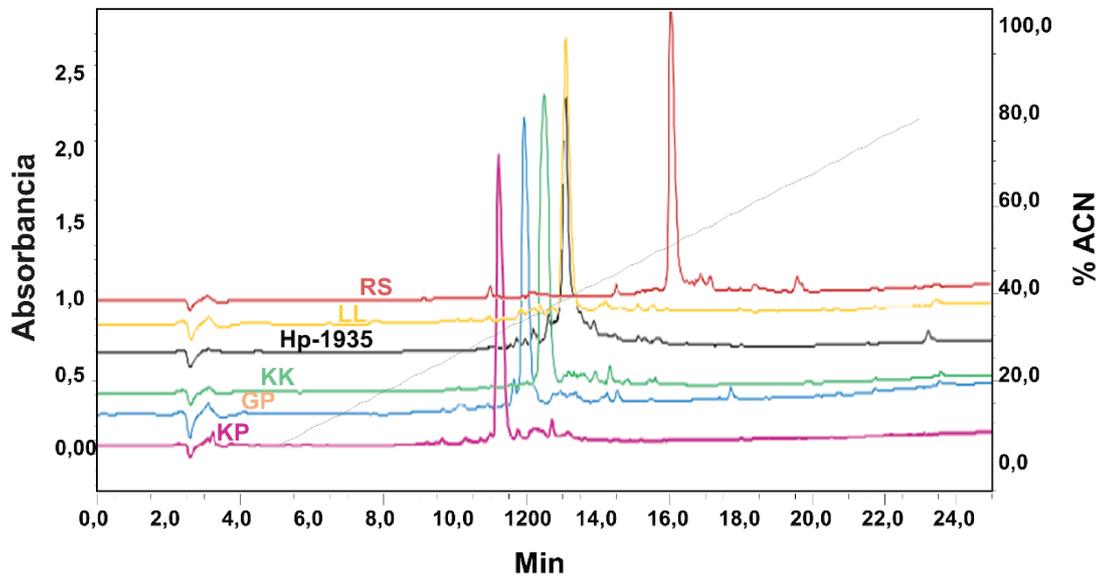


Figura 1: Perfiles cromatográficos del péptido Hp-1935 y sus derivados sintetizados. Los valores de absorbancia de los picos de los análogos son indicativos, ya que las curvas fueron desplazadas verticalmente para incluirlas en un mismo gráfico.

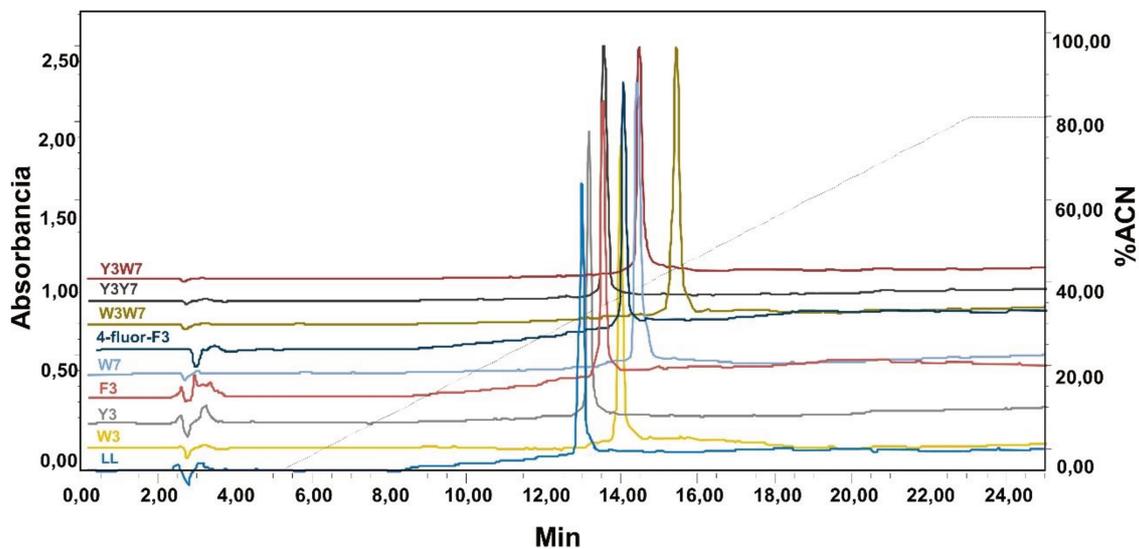


Figura 2: Perfiles cromatográficos del péptido LL y sus derivados sintetizados. Los valores de absorbancia de los picos de los análogos son indicativos, ya que las curvas fueron desplazadas verticalmente para incluirlas en un mismo gráfico.

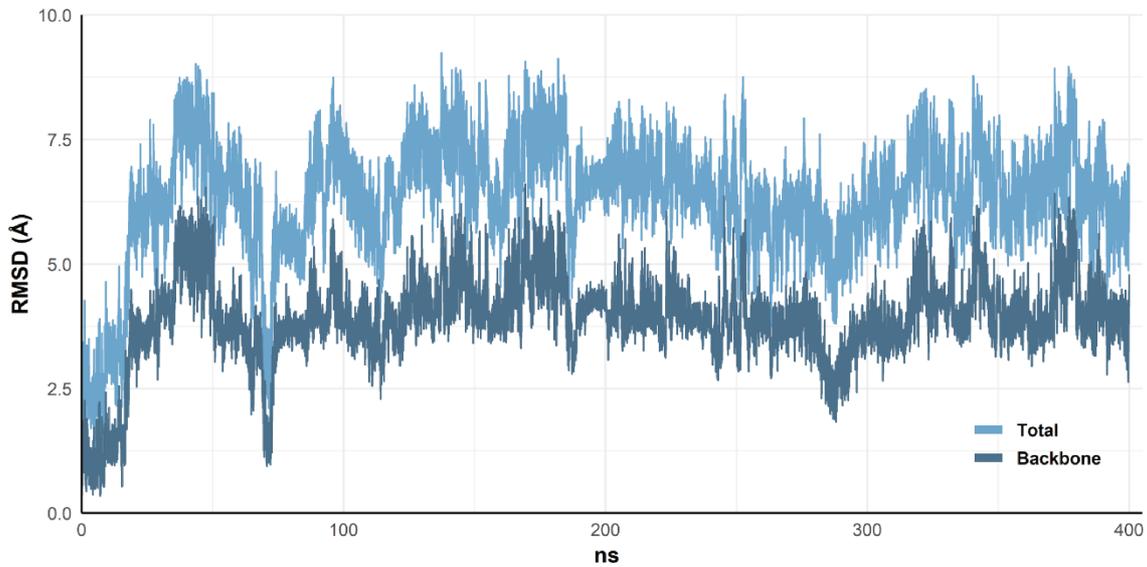


Figura 3: Perfil de desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos del *backbone* (C, O, N, C α) y de todos los átomos del péptido LL durante el tiempo de simulación en solvente puro (agua TIP3P).

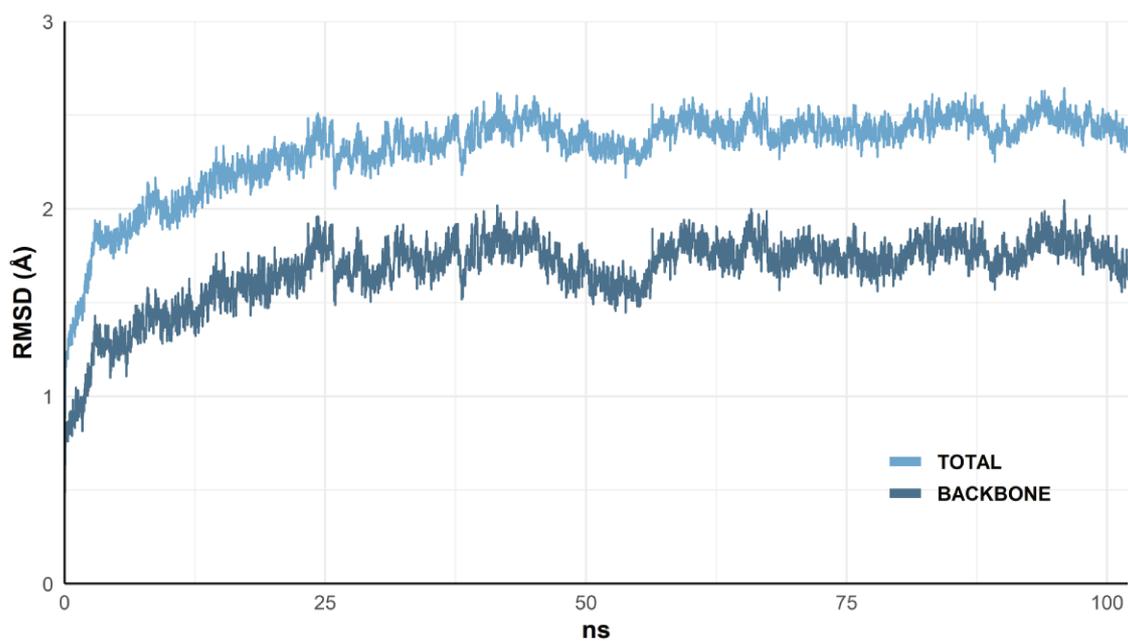


Figura 4: Perfil de desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos del *backbone* (C, O, N, C α) y de todos los átomos del complejo Hp-1935 - TcAcHE durante el tiempo de simulación en solvente puro (agua TIP3P).

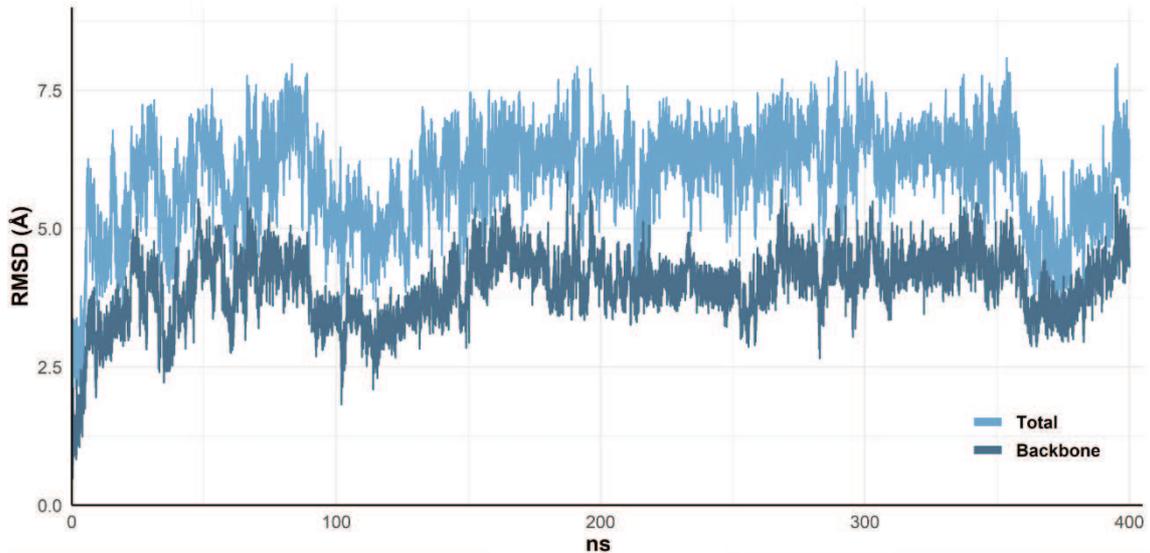


Figura 5: Perfil de desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos del *backbone* (C, O, N, C α) y de todos los átomos del péptido del péptido W3 durante el tiempo de simulación en solvente puro (agua TIP3P).

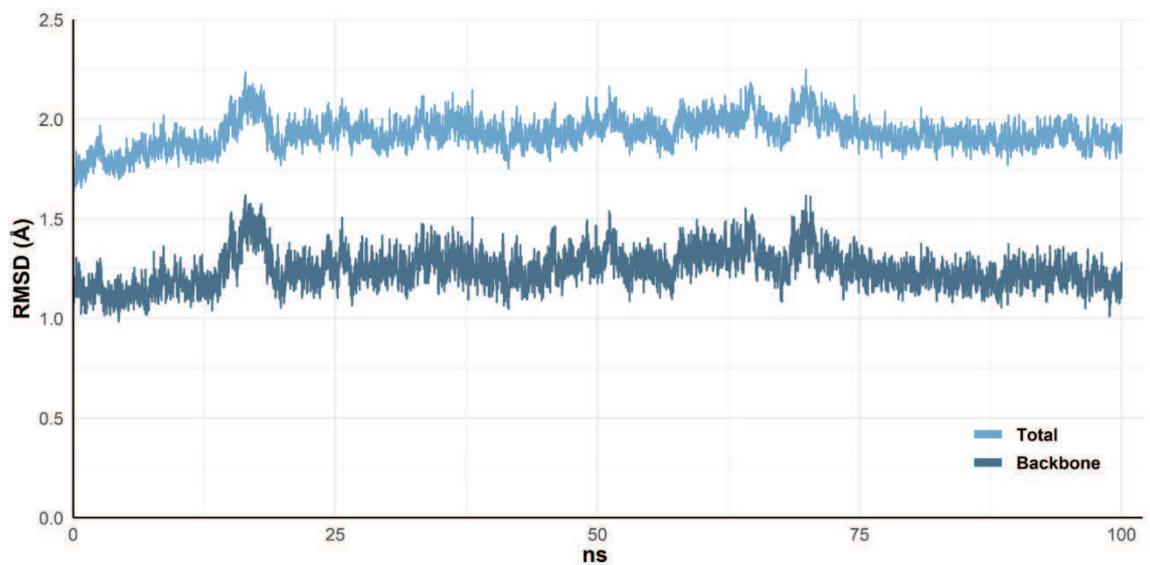


Figura 6: Perfil de desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos del *backbone* (C, O, N, C α) y de todos los átomos del péptido del complejo LL - TcAChE durante el tiempo de simulación.

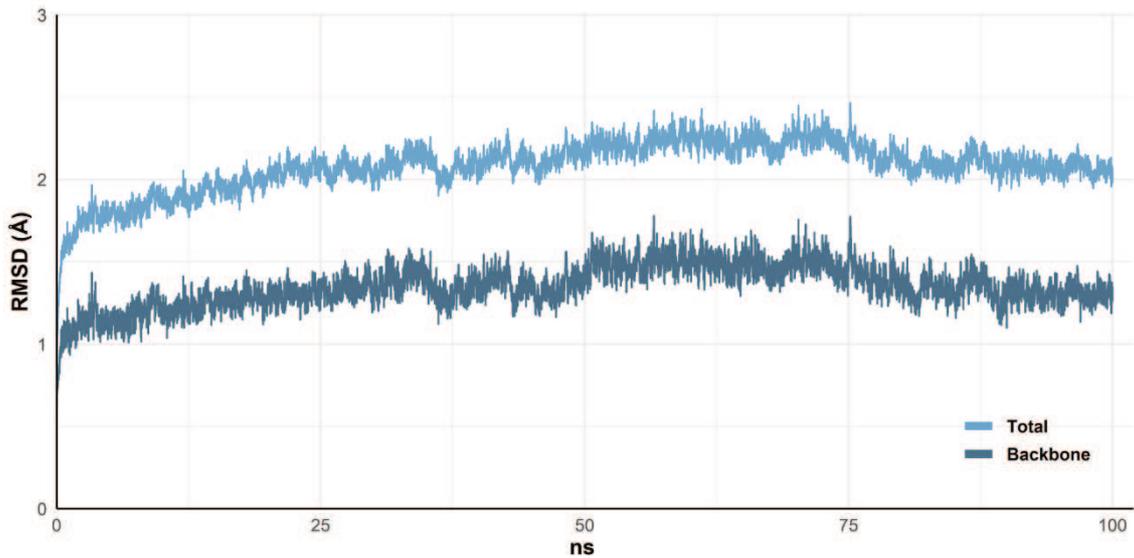


Figura 7: Perfil de desviación cuadrática media (RMSD de los átomos del *backbone* (C, O, N, C α) y de todos los átomos del péptido del complejo W3 - TcAChE durante el tiempo de simulación.

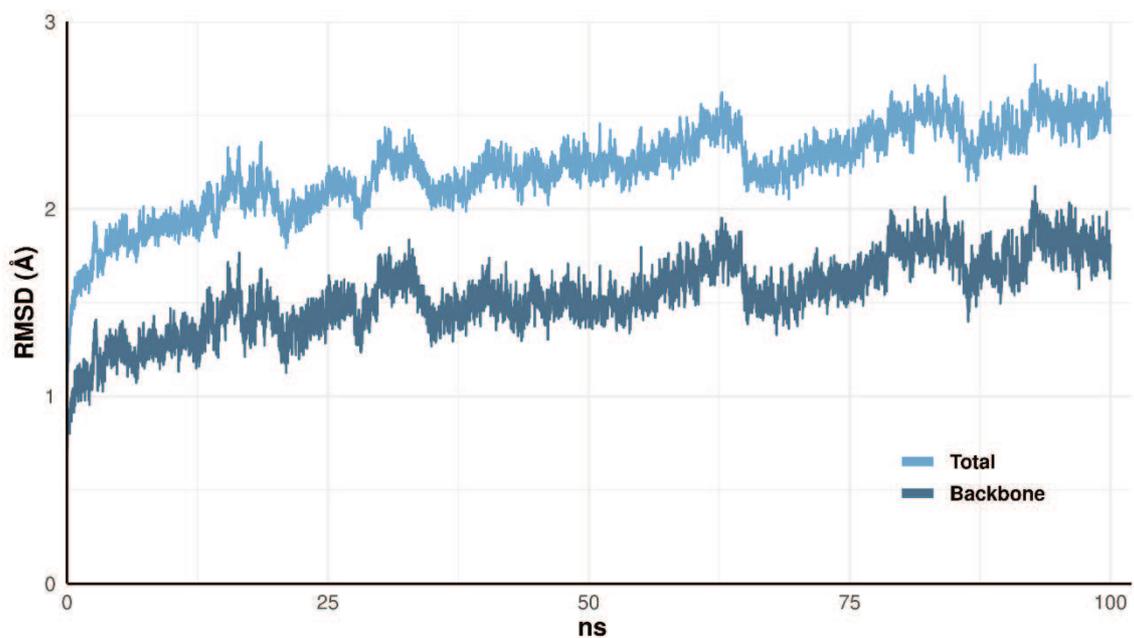


Figura 8: Perfil de desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos del *backbone* (C, O, N, C α) y de todos los átomos del péptido del complejo W3 - hAChE durante el tiempo de simulación.

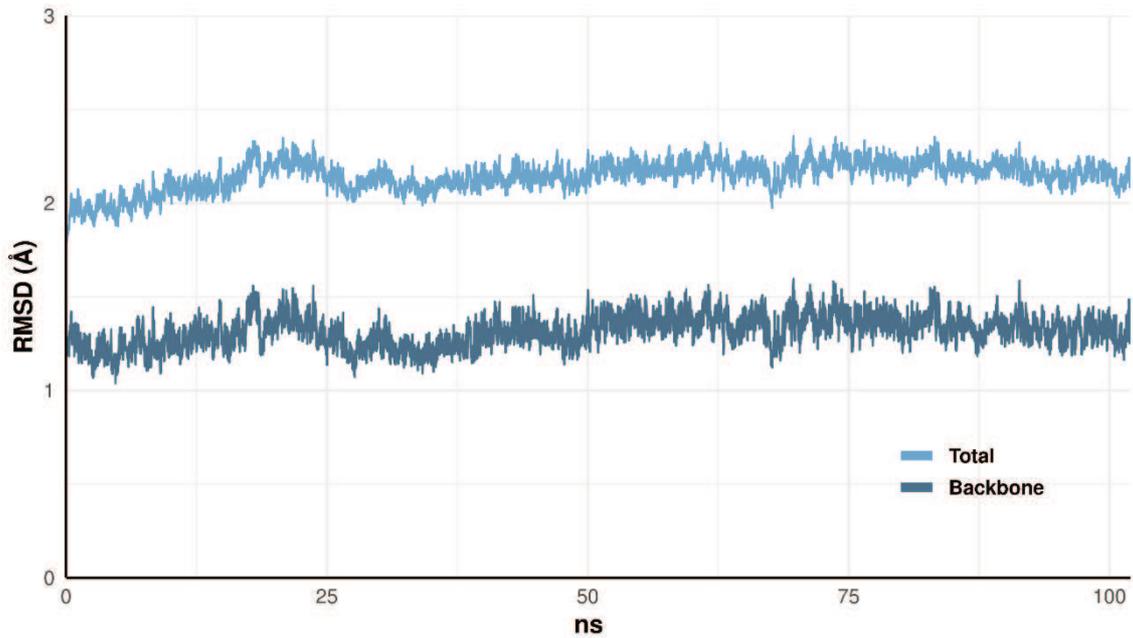


Figura 9: Perfil de desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos del *backbone* (C, O, N, Ca) y de todos los átomos del péptido del complejo W3W7 - hBChE durante el tiempo de simulación.

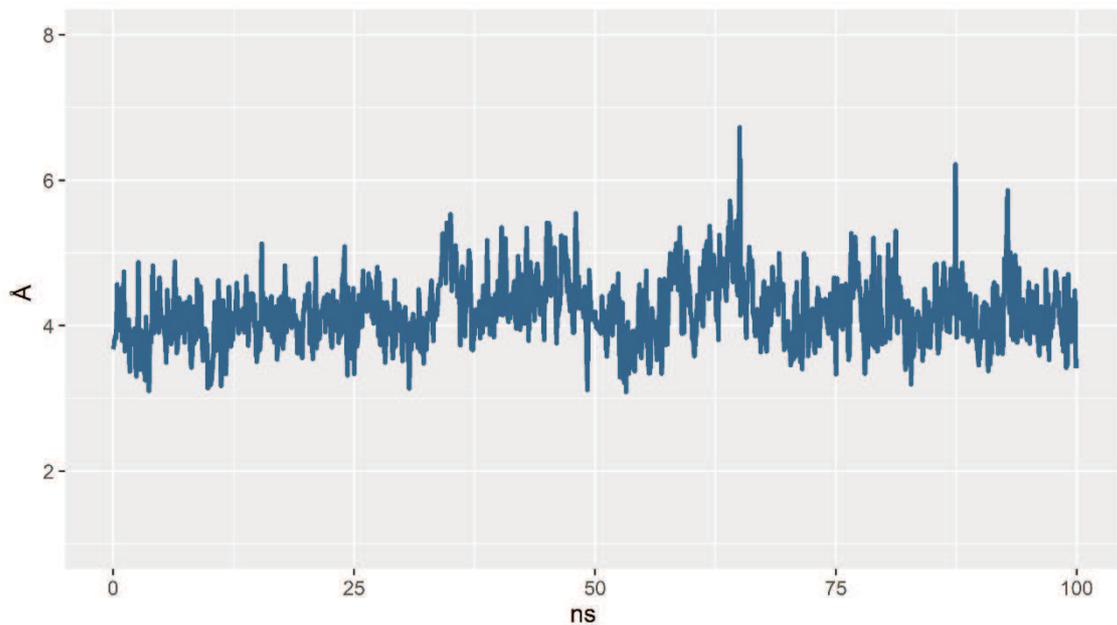


Figura 10: Variación de la distancia de interacción de *stacking* π - π con desplazamiento paralelo entre W3_Trp3 y hAChE_Trp286 durante el tiempo de simulación.

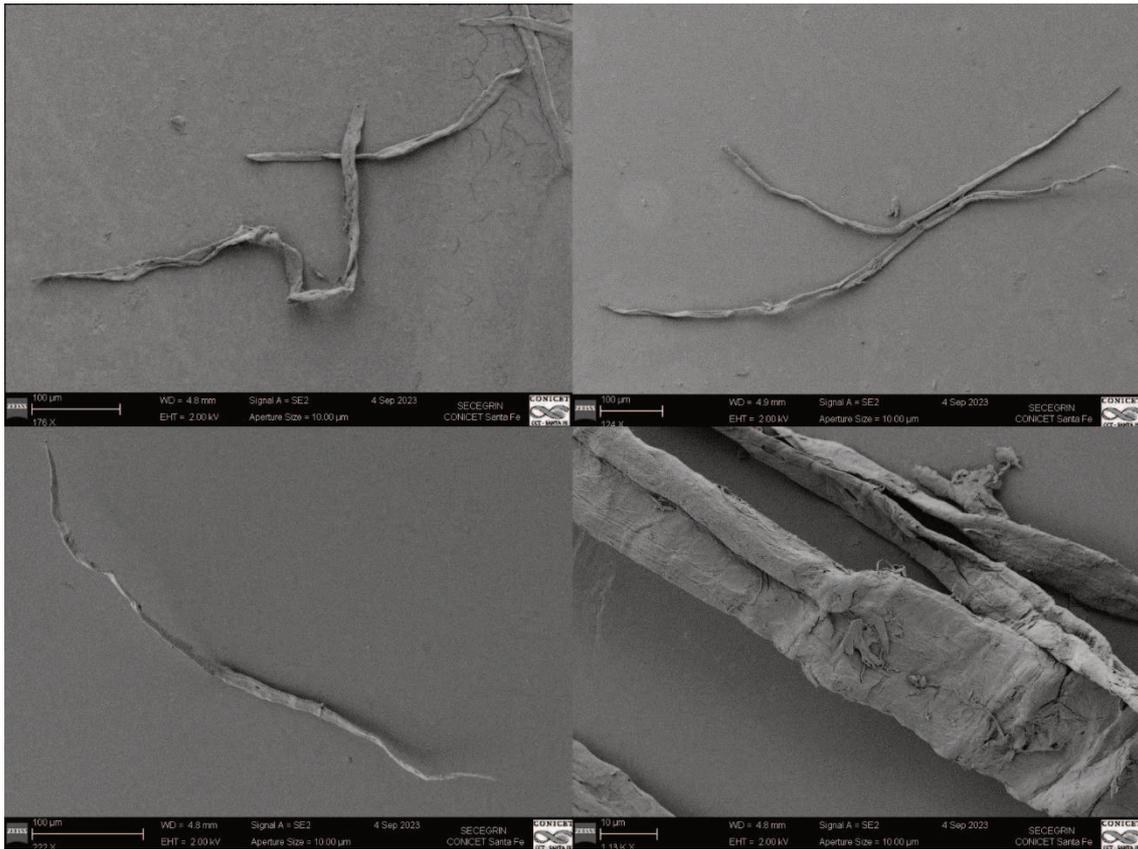


Figura 11: Micrografía SEM de fibrillas de Aβ₄₀ a 50 μm luego de 24 hs de agregación en agua pura.

BIBLIOGRAFÍA

Diseño, síntesis y
evaluación de péptidos
con capacidad inhibitoria
de enzimas involucradas
en la fisiopatología de
enfermedades
neurodegenerativas

Lic. Iván Sanchis

7. BIBLIOGRAFÍA

Abramyan, T.M., Snyder, J.A., Thyparambil, A.A., Stuart S.J. & Latour R.A. (2016). Cluster analysis of molecular simulation trajectories for systems where both conformation and orientation of the sampled states are important. *J Comput Chem*, 37(21), 1973-82. <https://doi.org/10.1002/jcc.24416>

Adam, K.M. (2021). Immunoinformatics approach for multi-epitope vaccine design against structural proteins and ORF1a polyprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Trop Dis Travel Med Vaccines*, 7(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40794-021-00147-1>

Agrawal, H., Joshi, R. & Gupta, M. (2019). Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate. *Food Res Int*, 120, 697-707. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.028>

Akar, Z., Küçük, M. & Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 640-647. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1284068>

Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., Uversky, V.N. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci*, 23(3), 1445. <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>

Al Musaimi, O., Lombardi, L., Williams, D.R. & Albericio, F. (2022). Strategies for Improving Peptide Stability and Delivery. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(10), 1283. <https://doi.org/10.3390/ph15101283>

Alam, M.N., Bristi, N.J. & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, 21(2), 143-52. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>

Alarcón-Enos, J., Muñoz-Núñez, E., Gutiérrez, M., Quiroz-Carreño, S., Pastene-Navarrete, E. & Céspedes Acuña, C. (2022). Dihydro- β -agarofurans natural and synthetic as acetylcholinesterase and COX inhibitors: interaction with the peripheral anionic site (AChE-PAS), and anti-inflammatory potentials. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 37(1), 1845-1856. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2091554>

Amblard, M., Fehrentz, J.A., Martinez J. & Subra G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol Biotechnol*, 33(3), 239-54. <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>

Anand, P. & Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*, 36(4), 375-99. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0036-3>

Andrusier, N., Mashiach, E., Nussinov, R. & Wolfson, H.J. (2008). Principles of flexible protein-protein docking. *Proteins*, 73(2), 271-89. <https://doi.org/10.1002/prot.22170>

Apostolopoulos, V., Bojarska, J., Chai, T.T., Elnagdy, S., Kaczmarek, K., Matsoukas, J., New, R., Parang, K., Lopez, O.P., Parhiz, H., Perera, C.O., Pickholz, M., Remko, M., Saviano, M., Skwarczynski, M., Tang, Y., Wolf, W.M., Yoshiya, T., Zabrocki, J., Zielenkiewicz, P., AlKhazindar, M., Barriga, V., Kelaidonis, K., Sarasia, E.M. & Toth, I. (2021). A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*, 26(2), 430. <https://doi.org/10.3390/molecules26020430>

Arad, E., Leshem, A.B., Rapaport, H. & Jelinek, R. (2021). β -Amyloid fibrils catalyze neurotransmitter degradation. *Chem Catalysis*, 1(4), 908-922. <https://doi.org/10.1016/j.checat.2021.07.005>

Arcanjo, D.D., Vasconcelos, A.G., Comerma-Steffensen, S.G., Jesus, J.R., Silva L.P., Pires Júnior, O.R., Costa-Neto, C.M., Oliveira, E.B., Migliolo, L., Franco, O.L., Restini, C.B., Paulo, M., Bendhack, L.M., Bemquerer, M.P., Oliveira, A.P., Simonsen, U. & Leite, J.R. (2015). A Novel Vasoactive Proline-Rich Oligopeptide

from the Skin Secretion of the Frog *Brachycephalus ephippium*. *PLoS One*. 10(12), e0145071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145071>

Barak, D., Kronman, C., Ordentlich, A., Ariel, N., Bromberg, A., Marcus, D., Lazar, A., Velan, B. & Shafferman, A. (1994). Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J Biol Chem*, 269(9), 6296-305

Barak, D., Ordentlich, A., Stein, D., Yu, Q.S., Greig, N.H. & Shafferman, A. (2009). Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. *Biochem J*, 417(1), 213-22. <https://doi.org/10.1042/BJ20081276>

Barbosa, E.A., Oliveira, A., Plácido, A., Socodato, R., Portugal, C.C., Mafud, A.C., Ombredane, A.S., Moreira, D.C., Vale, N., Bessa, L.J., Joanitti, G.A., Alves, C., Gomes, P., Delerue-Matos, C., Mascarenhas, Y.P., Marani, M.M., Relvas, J.B., Pintado, M. & Leite, J.R.S.A. (2018). Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. *Free Radic Biol Med*, 115, 68-79. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.001>

Barman, P., Joshi, S., Sharma, S., Preet, S., Sharma, S. & Saini, A. (2023). Strategic Approaches to Improvise Peptide Drugs as Next Generation Therapeutics. *Int J Pept Res Ther*, 29(4), 61. <https://doi.org/10.1007/s10989-023-10524-3>

Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V. & Andrisano, V. (2003). beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol*, 65(3), 407-16. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01514-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01514-9)

Behl, T., Kaur, D., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Zengin, G., Andronie-Cioara, F.L., Toma, M.M., Bungau, S. & Bumbu, A.G. (2021). Role of Monoamine Oxidase Activity in Alzheimer's Disease: An Insight into the Therapeutic Potential of Inhibitors. *Molecules*, 26(12), 3724. <https://doi.org/10.3390/molecules26123724>

Benek, O., Korabecny, J. & Soukup, O. (2020). A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol Sci*, 41(7), 434-445. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.04.008>

Berillo, D., Yeskendir, A., Zharkinbekov, Z., Raziyeva, K. & Saparov, A. (2021). Peptide-Based Drug Delivery Systems. *Medicina (Kaunas)*, 57(11), 1209. <https://doi.org/10.3390/medicina57111209>

Biancalana, M. & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*, 1804(7), 1405-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>

Bisswanger, H. (2017). Enzyme Inhibition and Related Mechanisms. In H. Bisswanger (Ed.), *Enzyme Kinetics: Principles and Methods, Third, enlarged and improved Edition* (pp. 87-119). Wiley-VCH.

Bolognesi, M.L., Andrisano, V., Bartolini, M., Banzi, R. & Melchiorre, C. (2005). Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid-beta aggregation. *J Med Chem*, 48(1), 24-7. <https://doi.org/10.1021/jm049156q>

Bordon, K.C.F., Cologna, C.T., Fornari-Baldo, E.C., Pinheiro-Júnior, E.L., Cerni, F.A., Amorim, F.G., Anjolette, F.A.P., Cordeiro, F.A., Wiesel, G.A., Cardoso, I.A., Ferreira, I.G., de Oliveira, I.S., Boldrini-França, J., Pucca, M.B., Baldo, M.A. & Arantes, E.C. (2020). From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Front Pharmacol*, 11, 1132. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01132>

Bosak, A., Gazić Smilović, I., Sinko, G., Vinković, V. & Kovarik, Z. (2012). Metaproterenol, isoproterenol, and their bisdimethylcarbamate derivatives as human cholinesterase inhibitors. *J Med Chem*, 55(15), 6716-23. <https://doi.org/10.1021/jm300289k>

Branduardi, D., Gervasio, F.L., Cavalli, A., Recanatini, M. & Parrinello, M. (2005). The role of the peripheral anionic site and cation-pi interactions in the ligand

penetration of the human AChE gorge. *J Am Chem Soc*, 127(25), 9147-55. <https://doi.org/10.1021/ja0512780>

Braun, E., Gilmer, J., Mayes, H.B., Mobley, D.L., Monroe, J.I., Prasad, S. & Zuckerman, D.M. (2019). Best Practices for Foundations in Molecular Simulations [Article v1.0]. *J Comput Mol Sci*. 1(1), 5957. <https://doi.org/10.33011/livecoms.1.1.5957>

Brazzolotto, X., Igert, A., Guillon, V., Santoni, G. & Nachon, F. (2017). Bacterial Expression of Human Butyrylcholinesterase as a Tool for Nerve Agent Bioscavengers Development. *Molecules*, 22(11), 1828. <https://doi.org/10.3390/molecules22111828>

Burdick, D.J. & Stults, J.T. (1997). Analysis of peptide synthesis products by electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol*, 289, 499-519. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(97\)89061-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)89061-1)

Burlingham, B.T. & Widlanski, T.S. (2003). An Intuitive Look at the Relationship of K_i and IC_{50} : A More General Use for the Dixon Plot. *J Chem Educ.*, 80(2), 214-218. <https://doi.org/10.1021/ed080p214>

Čadež, T., Kolić, D., Šinko, G. & Kovarik, Z. (2021). Assessment of four organophosphorus pesticides as inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Sci Rep*, 11(1), 21486. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00953-9>

Cahill, S. (2020). WHO's global action plan on the public health response to dementia: some challenges and opportunities. *Aging Ment Health*, 24(2), 197-199. <https://doi.org/10.1080/13607863.2018.1544213>

Carpino, L.A., Shroff, H., Triolo, S.A., Mansour, E.S.M.E., Wenschuh, H. & Albericio, F. (1993). The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Letters* 34(49), 7829-7832. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61487-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61487-9)

Carrillo-Mora, P., Luna, R. & Colín-Barenque, L. (2014). Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 795375. <https://doi.org/10.1155/2014/795375>

Carvajal, F.J. & Inestrosa, N.C. (2011). Interactions of AChE with A β Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front Mol Neurosci*, 4, 19. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00019>

Case, D.A., Cheatham, T.E. 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M. Jr, Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. & Woods, R.J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem*, 26(16):1668-88. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>

Cavalli, A., Bottegoni, G., Raco, C., De Vivo, M. & Recanatini, M. (2004). A computational study of the binding of propidium to the peripheral anionic site of human acetylcholinesterase. *J Med Chem*, 47(16), 3991-9. <https://doi.org/10.1021/jm040787u>

Chang, K.Y. & Yang, J.R. (2013). Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests. *PLoS One*, 8(8), e70166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070166>

Che Omar, M.T. (2020). Data analysis of molecular dynamics simulation trajectories of β -sitosterol, sonidegib and cholesterol in smoothed protein with the CHARMM36 force field. *Data Brief*, 33, 106350. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106350>

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol*, 14, 450-464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>

Chen, C., Hong, M., Guo, C., Wu, F., Tian, C., Wanga, Y. & Xu, Z. (2018). Facile synthesis of macrocyclic peptide toxins of GpTx-1 and its analogue. *Org Chem Front*, 5, 2143-2147. <https://doi.org/10.1039/C8QO00415C>

Chen, C.H. & Lu, T.K. (2020). Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics (Basel)*, *9*(1), 24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>

Chen, L.L., Fan, Y.G., Zhao, L.X., Zhang, Q. & Wang, Z.Y. (2023). The metal ion hypothesis of Alzheimer's disease and the anti-neuroinflammatory effect of metal chelators. *Bioorg Chem*, *131*, 106301. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106301>

Chen, T., Li, M. & Liu, J. (2018). π - π Stacking Interaction: A Nondestructive and Facile Means in Material Engineering for Bioapplications. *Crystal Growth & Design*, *18*(5), 2765–2783. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01503>

Chen, X., Liu, S., Fang, J., Zheng, S., Wang, Z., Jiao, Y., Xia, P., Wu, H., Ma, Z. & Hao, L. (2022). Peptides Isolated from Amphibian Skin Secretions with Emphasis on Antimicrobial Peptides. *Toxins (Basel)*, *14*(10), 722. <https://doi.org/10.3390/toxins14100722>

Chen, X., Wehle, S., Kuzmanovic, N., Merget, B., Holzgrabe, U., König, B., Sotriffer, C.A. & Decker, M. (2014). Acetylcholinesterase inhibitors with photoswitchable inhibition of β -amyloid aggregation. *ACS Chem Neurosci*, *5*(5), 377-89. <https://doi.org/10.1021/cn500016p>

Chen, Z.R., Huang, J.B., Yang, S.L. & Hong, F.F. (2022). Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules*, *27*(6), 1816. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>

Cheung, J., Rudolph, M.J., Burshteyn, F., Cassidy, M.S., Gary, E.N., Love, J., Franklin, M.C. & Height, J.J. (2012). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem*, *55*(22), 10282-6. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>

Chin, K.S., Yassi, N., Churilov, L., Masters, C.L. & Watson, R. (2020). Prevalence and clinical associations of tau in Lewy body dementias: A systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord*, *80*, 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.09.030>

Cid-Jofré, V., Moreno, M., Reyes-Parada, M. & Renard, G.M. (2021). Role of Oxytocin and Vasopressin in Neuropsychiatric Disorders: Therapeutic Potential of Agonists and Antagonists. *Int J Mol Sci*, 22(21), 12077. <https://doi.org/10.3390/ijms222112077>

Conlon, J.M., Mechkarska, M., Lukic, M.L. & Flatt, P.R. (2014). Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides*, 57, 67-77. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.04.019>

Copeland R. A. (2005). Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods of biochemical analysis*, 46, 1–265.

Crampon, K., Giorkallos, A., Deldossi, M., Baud, S., & Steffanel, L. A. (2022). Machine-learning methods for ligand-protein molecular docking. *Drug discovery today*, 27(1), 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.007>

Cummings, J., Lee, G., Nahed, P., Kamar, M. E. Z. N., Zhong, K., Fonseca, J. & Taghva, K. (2022). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 8(1), e12295. <https://doi.org/10.1002/trc2.12295>

Daneshmand, F., Zare-Zardini, H. & Ebrahimi, L. (2013). Investigation of the antimicrobial activities of Snakin-Z, a new cationic peptide derived from Zizyphus jujuba fruits. *Natural product research*, 27(24), 2292–2296. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.827192>

De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J., & Sorin, E. J. (2021). A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules*, 11(4), 580. <https://doi.org/10.3390/biom11040580>

de Freitas Silva, M., Dias, K. S. T., Gontijo, V. S., Ortiz, C. J. C. & Viegas, C., Jr (2018). Multi-Target Directed Drugs as a Modern Approach for Drug Design Towards Alzheimer's Disease: An Update. *Current medicinal chemistry*, 25(29), 3491–3525. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180111101843>

De Paris, R., Quevedo, C. V., Ruiz, D. D., Norberto de Souza, O. & Barros, R. C. (2015). Clustering molecular dynamics trajectories for optimizing docking experiments. *Computational intelligence and neuroscience*, 2015, 916240. <https://doi.org/10.1155/2015/916240>

De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G. & Cavalli, A. (2016). Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 59(9), 4035–4061. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>

Delaune, K. P. & Alsayouri, K. (2022). Physiology, Noncompetitive Inhibitor. In StatPearls. *StatPearls Publishing*.

Dileep, K. V., Ihara, K., Mishima-Tsumagari, C., Kukimoto-Niino, M., Yonemochi, M., Hanada, K., Shirouzu, M. & Zhang, K. Y. J. (2022). Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with tacrine: Implications for drug discovery. *International journal of biological macromolecules*, 210, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.009>

Diniz, L. C. L., Miranda, A. & da Silva, P. I., Jr (2018). Human Antimicrobial Peptide Isolated From *Triatoma infestans* Haemolymph, *Trypanosoma cruzi*-Transmitting Vector. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 354. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00354>

Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731–1737. <https://doi.org/10.1021/ja026939x>

dos Santos, H.D., de Oliveira, F.F., de Oliveira, R.A. (2017). Influence of Solubility of Ethanol Extracts in *Artemia salina* Tests. *Rev Virtual Quim*, 9(4), 1535-1545

Doyle, J., Llewellyn, L. E., Brinkworth, C. S., Bowie, J. H., Wegener, K. L., Rozek, T., Wabnitz, P. A., Wallace, J. C. & Tyler, M. J. (2002). Amphibian peptides that inhibit neuronal nitric oxide synthase. Isolation of Iesuerin from the skin secretion of the Australian Stony Creek frog *Litoria lesueuri*. *European journal of*

biochemistry, 269(1), 100–109. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02630.x>

Du, Z. & Li, Y. (2022). Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and future opportunities. *Journal of Agriculture and Food Research*, 9, 100353. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100353>

Duffuler, P., Bhullar, K. S., de Campos Zani, S. C. & Wu, J. (2022). Bioactive Peptides: From Basic Research to Clinical Trials and Commercialization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 70(12), 3585–3595. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06289>

Duval, N., Massoulié, J. & Bon, S. (1992). H and T subunits of acetylcholinesterase from Torpedo, expressed in COS cells, generate all types of globular forms. *The Journal of cell biology*, 118(3), 641–653. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.641>

Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F. & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of chemical information and modeling*, 61(8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>

Elber, R., Ruymgaart, A. P. & Hess, B. (2011). SHAKE parallelization. *The European physical journal. Special topics*, 200(1), 211–223. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2011-01525-9>

Ellman G. L. (1958). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of biochemistry and biophysics*, 74(2), 443–450. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90014-6)

Ellman, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., Jr & FEATHER-STONE, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., & Reiner, E. (2003). Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent:

reassessment. *Analytical biochemistry*, 312(2), 224–227. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00506-7](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00506-7)

Fadaeinasab, M., Basiri, A., Kia, Y., Karimian, H., Ali, H. M. & Murugaiyah, V. (2015). New Indole Alkaloids from the Bark of *Rauvolfia Reflexa* and their Cholinesterase Inhibitory Activity. *Cell Physiol Biochem*, 37(5), 1997-2011. <https://doi.org/10.1159/000438560>

Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R. & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*, 14(1), 101-115. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>

Flores-Holguín, N., Frau, J. & Glossman-Mitnik, D. (2022). Computational peptidology approach to the study of the chemical reactivity and bioactivity properties of Aspergillipeptide D, a cyclopentapeptide of marine origin. *Sci Rep*, 12(1), 506. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04513-z>

Florová, P., Sklenovský, P., Banáš, P. & Otyepka, M. (2010). Explicit Water Models Affect the Specific Solvation and Dynamics of Unfolded Peptides While the Conformational Behavior and Flexibility of Folded Peptides Remain Intact. *J Chem Theory Comput*, 6(11), 3569-3579. <https://doi.org/10.1021/ct1003687>

Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J Agric Food Chem*, 52(3), 385-406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>

Friedrichs, M. S., Eastman, P., Vaidyanathan, V., Houston, M., Legrand, S., Beberg, A. L., Ensign, D. L., Bruns, C. M. & Pande, V. S. (2009). Accelerating molecular dynamic simulation on graphics processing units. *J Comput Chem*, 30, 864-872. <https://doi.org/10.1002/jcc.21209>

Funk, K. E. & Kuret, J. (2012). Lysosomal fusion dysfunction as a unifying hypothesis for Alzheimer's disease pathology. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 752894. <https://doi.org/10.1155/2012/752894>

Fuxreiter, M. & Warshel, A. (1998). Origin of the Catalytic Power of Acetylcholinesterase: Computer Simulation Studies. *J Am Chem Soc*, 120(1), 183-194. <https://doi.org/10.1021/ja972326m>

Gallo, M. T., Grant, B. J., Teodoro, M. L., Melton, J., Cieplak, P., Phillips, G. N. Jr & Stec, B. (2009). Novel procedure for thermal equilibration in molecular dynamics simulation. *Mol Simul*, 35(5), 349-357. <https://doi.org/10.1080/08927020802647272>

Ganesan, K., Raza, S. K. & Vijayaraghavan, R. (2010). Chemical warfare agents. *J Pharm Bioallied Sci*, 2(3), 166-178. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.68498>

Ganeshpurkar, A., Singh, R., Shivhare, S., Divya, Kumar, D., Gutti, G., Singh, R., Kumar, A. & Singh, S. K. (2022). Improved machine learning scoring functions for identification of Electrophorus electricus's acetylcholinesterase inhibitors. *Mol Divers*, 26(3), 1455-1479. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10280-w>

GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health*, 7(2), e105-e125. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8)

Ge, Q., Jia, D., Cen, D., Qi, Y., Shi, C., Li, J., Sang, L., Yang, L. J., He, J., Lin, A., Chen, S. & Wang, L. (2021). Micropeptide ASAP encoded by LINC00467 promotes colorectal cancer progression by directly modulating ATP synthase activity. *J Clin Invest*, 131(22), e152911. <https://doi.org/10.1172/JCI152911>

Gendreau, K. L. & Hall, G. F. (2013). Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol*, 4, 160. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00160>

Genheden, S. & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov*, 10(5), 449-461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>

Girija, A. S. S., Gunasekaran, S., Habib, S., Aljeldah, M., Al Shammari, B. R., Alshehri, A. A., Alwashmi, A. S. S., Turkistani, S. A., Alawfi, A., Alshengeti, A.,

Garout, M., Alwarthan, S., Alsubki, R. A. & Moustafa, N. M. (2023). Prediction of Putative Epitope Peptides against BaeR Associated with TCS Adaptation in *Acinetobacter baumannii* Using an In Silico Approach. *Medicina (Kaunas)*, *59*(2), 343. <https://doi.org/10.3390/medicina59020343>

Gokhale, A. S. & Satyanarayanajois, S. (2014). Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy*, *6*(6), 755-774. <https://doi.org/10.2217/imt.14.37>

Gomes, A., Giri, B., Saha, A., Mishra, R., Dasgupta, S. C., Debnath, A. & Gomes, A. (2007). Bioactive molecules from amphibian skin: their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian J Exp Biol*, *45*(7), 579-593.

González-Bello, C. (2016). Designing Irreversible Inhibitors--Worth the Effort? *ChemMedChem*, *11*(1), 22-30. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500469>

Götz, A. W., Williamson, M. J., Xu, D., Poole, D., Le Grand, S. & Walker, R. C. (2012). *Chem Theory Comput*, *8*(5), 1542–1555. <https://doi.org/10.1021/ct200909j>

Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R. & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep*, *10*(1), 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>

Gregor, V. E., Emmerling, M. R., Lee, C. & Moore, C. J. (1992). The synthesis and in vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of tacrine (Cognex®) derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *2*(8), 861-864. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)80545-4](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)80545-4)

Gueorguieva, I., Willis, B. A., Chua, L., Chow, K., Ernest, C. S., Shcherbinin, S., Ardayfio, P., Mullins, G. R. & Sims, J. R. (2023). Donanemab Population Pharmacokinetics, Amyloid Plaque Reduction, and Safety in Participants with

Alzheimer's Disease. *Clin Pharmacol Ther*, 113(6), 1258-1267.
<https://doi.org/10.1002/cpt.2875>

Gupta, R. C. (2006). CHAPTER 2 - Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. In: Gupta R.C. (Ed.), *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* (pp. 5-24). Academic Press.

Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R; Open Source Drug Discovery Consortium; Raghava, G. P. (2013). In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS One*, 8(9), e73957.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>

Guruprasad, K., Reddy, B. V. B. & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng*, 4, 155-161.

Hempel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., Villemagne, V. L., Aisen, P., Vendruscolo, M., Iwatsubo, T., Masters, C. L., Cho, M., Lannfelt, L., Cummings, J. L. & Vergallo, A. (2021). The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*, 26(10), 5481-5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>

Hempel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Farlow, M. R., Snyder, P. J., Giacobini, E. & Khachaturian, Z. S. (2019). Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *J Prev Alzheimers Dis*, 6(1), 2-15.
<https://doi.org/10.14283/jpad.2018.43>

Hansen, P. R. & Oddo, A. (2015). Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. *Methods Mol Biol*, 1348, 33-50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_5

Harel, M., Kleywegt, G. J., Ravelli, R. B., Silman, I. & Sussman, J. L. (1995). Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure*, 3(12), 1355-1366. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00273-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00273-8)

- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P. H., Silman, I. & Sussman, J. L. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(19), 9031-9035. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9031>
- Harnkit, N., Khongsonthi, T., Masuwan, N., Prasartkul, P., Noikaew, T. & Chumnanpuen, P. (2022). Virtual Screening for SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitory Peptides from the Putative Hydrolyzed Peptidome of Rice Bran. *Antibiotics (Basel)*, *11*(10), 1318. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101318>
- Hassan, H. M., Degen, D., Jang, KH., Ebright, RH. & Fenical, W. (2015). Salinamide F, new depsipeptide antibiotic and inhibitor of bacterial RNA polymerase from a marine-derived *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo)*, *68*(3), 206-209. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.122>
- Hebda, M., Bajda, M., Więckowska, A., Szałaj, N., Pasięka, A., Panek, D., Godyń, J., Wichur, T., Knez, D., Gobec, S. & Malawska, B. (2016). Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Novel Heterodimeric, Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and Amyloid Beta. *Molecules*, *21*(4), 410. <https://doi.org/10.3390/molecules21040410>
- Henninot, A., Collins, J. C. & Nuss, J. M. (2018). The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J Med Chem*, *61*(4), 1382-1414. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00318>
- Holdgate, G. A., Meek, T. D. & Grimley, R. L. (2018). Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective. *Nat Rev Drug Discov*, *17*(2), 115-132. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.219>
- Hollingsworth, S. A. & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, *99*(6), 1129-1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- Hou, L. N., Xu, J. R., Zhao, Q. N., Gao, X. L., Cui, Y. Y., Xu, J., Wang, H. & Chen, H. Z. (2014). A new motif in the N-terminal of acetylcholinesterase triggers amyloid- β aggregation and deposition. *CNS Neurosci Ther*, *20*(1), 59-66. <https://doi.org/10.1111/cns.12161>

- Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods. II. The accuracy of ranking poses generated from docking. *Journal of computational chemistry*, 32(5), 866–877. <https://doi.org/10.1002/jcc.21666>
- Hou, W., Zhang, X. & Liu, C. F. (2017). Progress in Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Trans Tianjin Univ*, 23, 401–419. <https://doi.org/10.1007/s12209-017-0068-8>
- Huang, F., Teng, K., Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Ma, C., Zhang, J. & Zhong, J. (2021). Bacteriocins: Potential for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 5518825. <https://doi.org/10.1155/2021/5518825>
- Huang, S. Y. & Zou, X. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int J Mol Sci*, 11(8), 3016-34. <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B. & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*, 162(6), 1239-49. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14(1), 33-8, 27-8. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Irwin, K., Sexton, C., Daniel, T., Lawlor, B. & Naci, L. (2018). Healthy Aging and Dementia: Two Roads Diverging in Midlife? *Front Aging Neurosci*, 10, 275. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00275>
- Ismail, M. M., Kamel, M. M., Mohamed, L. W. & Faggal, S. I. (2012). Synthesis of new indole derivatives structurally related to donepezil and their biological evaluation as acetylcholinesterase inhibitors. *Molecules*, 17(5), 4811-23. <https://doi.org/10.3390/molecules17054811>
- Jagust, W. (2016). Is amyloid- β harmful to the brain? Insights from human imaging studies. *Brain*, 139(Pt 1), 23-30. <https://doi.org/10.1093/brain/awv326>

-
- Jain, A. N. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Curr Protein Pept Sci*, 7(5), 407-20. <https://doi.org/10.2174/138920306778559395>
- Jäkälä, P. & Vapaatalo, H. (2010). Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(1), 251-272. <https://doi.org/10.3390/ph3010251>
- Johnson, G. & Moore, S. W. (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions, and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des*, 12(2), 217-25. <https://doi.org/10.2174/138161206775193127>
- Kabir, A. & Muth, A. (2022). Polypharmacology: The science of multi-targeting molecules. *Pharmacol Res*, 176, 106055. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106055>
- Kametani, F. & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 12, 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Karplus, M. & Kuriyan, J. (2005). Molecular dynamics and protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(19), 6679-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408930102>
- Karunakaran, K. B., Thiyagaraj, A. & Santhakumar, K. (2022). Novel insights on acetylcholinesterase inhibition by *Convolvulus pluricaulis*, scopolamine, and their combination in zebrafish. *Nat Prod Bioprospect*, 12(6), 126. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00332-5>
- Karunarathne, P., Pocquet, N., Labbé, P., & Milesi, P. (2022). BioRssay: an R package for analyses of bioassays and probit graphs. *Parasites & vectors*, 15(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05146-x>
- Ke, Q., Gong, X., Liao, S., Duan, C. & Li, L. (2022). Effects of thermostats/barostats on physical properties of liquids by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 365, 120116. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120116>

Kenakin, T.P. (2017). Chapter 6: Enzymes as Drug Targets, In T.P. Kenakin (Ed.), *Pharmacology in Drug Discovery and Development (Second Edition)*, (pp. 131–156). Academic Press. Elsevier.

Ko, S. C., Kim, D. & Jeon, Y. J. (2012). Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, *50*, 2294-2302. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.022>

Koeberle, A. & Werz, O. (2014). Multi-target approach for natural products in inflammation. *Drug Discov Today*, *19*(12), 1871-1882. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.08.006>

Krátký, M., Štěpánková, Š., Vorčáková, K., Švarcová, M. & Vinšová, J. (2016). Novel Cholinesterase Inhibitors Based on O-Aromatic N,N-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Molecules*, *21*(2), 191. <https://doi.org/10.3390/molecules21020191>

Kronman, C., Velan, B., Gozes, Y., Leitner, M., Flashner, Y., Lazar, A., Marcus, D., Sery, T., Papier, Y., Grosfeld, H., et al. (1992). Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene*, *121*(2), 295-304. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90134-b](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90134-b)

Kryger, G., Silman, I. & Sussman, J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, *7*(3), 297-307. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80040-9)

Kua, J., Zhang, Y., Eslami, A. C., Butler, J. R. & McCammon, J. A. (2003). Studying the roles of W86, E202, and Y337 in binding of acetylcholine to acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *Protein Sci*, *12*(12), 2675-2684. <https://doi.org/10.1110/ps.03318603>

Kuhn-Nentwig, L., Sheynis, T., Kolusheva, S., Nentwig, W. & Jelinek, R. (2013). N-terminal aromatic residues closely impact the cytolytic activity of cupiennin 1a,

a major spider venom peptide. *Toxicon*, 75, 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.003>

Kumar, S., Seth, D. & Deshpande, P. A. (2021). Molecular dynamics simulations identify the regions of compromised thermostability in SazCA. *Proteins*, 89(4), 375-388. <https://doi.org/10.1002/prot.26022>

Lai, R., Zheng, Y. T., Shen, J. H., Liu, G. J., Liu, H., Lee, W. H., Tang, S. Z. & Zhang, Y. (2002). Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima*. *Peptides*, 23(3), 427-435. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(01\)00641-6](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(01)00641-6)

Lakey-Beitia, J., Burillo, A. M., La Penna, G., Hegde, M. L. & Rao, K. S. (2021). Polyphenols as Potential Metal Chelation Compounds Against Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 82(s1), S335-S357. <https://doi.org/10.3233/JAD-200185>

Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P. & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res*, 44(W1), W449-W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>

Layer, P. & Stanghellini, V. (2014). Review article: Linaclotide for the management of irritable bowel syndrome with constipation. *Aliment Pharmacol Ther*, 39(4), 371-384. <https://doi.org/10.1111/apt.12604>

Lear, S. & Cobb, S. L. (2016). Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *J Comput Aided Mol Des*, 30(3), 271-277. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9902-7>

Lee, T. S., Cerutti, D. S., Mermelstein, D., Lin, C., LeGrand, S., Giese, T. J., Roitberg, A., Case, D. A., Walker, R. C. & York, D. M. (2018). GPU-Accelerated Molecular Dynamics and Free Energy Methods in Amber18: Performance Enhancements and New Features. *J Chem Inf Model*, 58(10), 2043-2050. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00462>

Lehmann, J., Retz, M., Sidhu, S. S., Suttman, H., Sell, M., Paulsen, F., Harder, J., Unteregger, G. & Stöckle, M. (2006). Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur Urol*, *50*(1), 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.12.043>

Levitt, M. & Sharon, R. (1988). Accurate simulation of protein dynamics in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(20), 7557-7561. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.20.7557>

Lewis, R. J. & Garcia, M. L. (2003). Therapeutic potential of venom peptides. *Nat Rev Drug Discov*, *2*(10), 790-802. <https://doi.org/10.1038/nrd1197>

Li, Q., Shi, C., Wang, M., Zhou, M., Liang, M., Zhang, T., Yuan, E., Wang, Z., Yao, M. & Ren, J. (2019). Tryptophan residue enhances in vitro walnut protein-derived peptides exerting xanthine oxidase inhibition and antioxidant activities. *J Funct Foods*, *53*, 276-285. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.024>

Li, S., Ip, D. T., Lin, H. Q., Liu, J. M., Miao, Y. G., Ke, L. J. & Wan, D. C. (2010). High-level expression of functional recombinant human butyrylcholinesterase in silkworm larvae by Bac-to-Bac system. *Chem Biol Interact*, *187*(1-3), 101-105. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.055>

Li, X. L., Hu, N., Tan, M. S., Yu, J. T. & Tan, L. (2014). Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, *2014*, 927804. <https://doi.org/10.1155/2014/927804>

Li, S., Du, G., Shi, J., Zhang, L., Yue, T. & Yuan, Y. (2022). Preparation of antihypertensive peptides from quinoa via fermentation with *Lactobacillus paracasei*. *eFood*, *3*, e20. <https://doi.org/10.1002/efd2.20>

Lim, E. W., Aarsland, D., Ffytche, D., Taddei, R. N., van Wamelen, D. J., Wan, Y. M., Tan, E. K., Ray Chaudhuri, K.; Kings Parcog group MDS Nonmotor study group. (2019). Amyloid- β and Parkinson's disease. *J Neurol*, *266*(11), 2605-2619. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9100-8>

Lindsey, K., Casson, S. & Chilley, P. (2002). Peptides: new signalling molecules in plants. *Trends Plant Sci*, 7(2), 78-83. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)02194-x](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)02194-x)

Liu, S., Fan, M., Xu, J. X., Yang, L. J., Qi, C. C., Xia, Q. R. & Ge, J. F. (2022). Exosomes derived from bone-marrow mesenchymal stem cells alleviate cognitive decline in AD-like mice by improving BDNF-related neuropathology. *J Neuroinflammation*, 19(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02393-2>

Liu, W., Liu, Z., Liu, H., Westerhoff, L. M. & Zheng, Z. (2022). Free Energy Calculations Using the Movable Type Method with Molecular Dynamics Driven Protein-Ligand Sampling. *J Chem Inf Model*, 62(22), 5645-5665. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00278>

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118-26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Lu, J., Xu, H., Xia, J., Ma, J., Xu, J., Li, Y. & Feng, J. (2020). D- and Unnatural Amino Acid Substituted Antimicrobial Peptides With Improved Proteolytic Resistance and Their Proteolytic Degradation Characteristics. *Front Microbiol*, 11, 563030. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.563030>

Luna, O. F., Gomez, J., Cárdenas, C., Albericio, F., Marshall, S. H. & Guzmán, F. (2016). Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules*, 21(11), 1542. <https://doi.org/10.3390/molecules21111542>

Luque, F. J. (2018). Frontiers in Computational Chemistry for Drug Discovery. *Molecules*, 23(11), 2872. <https://doi.org/10.3390/molecules23112872>

Ma, X., Tan, J., Wei, D., Zhu, P. & Sun, M. (2006). High-level secretion and purification of recombinant acetylcholinesterase from human cerebral tissue in *P. pastoris* and identification by chromogenic reaction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(2), 316-322. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0260-y>

- Mackay, D. H. J., Cross, A. J. & Hagler, A. T. (1989). The Role of Energy Minimization in Simulation Strategies of Biomolecular Systems. In G.D. Fasman (Ed.), *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (pp. 317–358). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1571-1_7
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E. & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*, *11*(8), 3696-3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Malafaia, D., Oliveira, A., Fernandes, P. A., Ramos, M. J., Albuquerque, H. M. T. & Silva, A. M. S. (2021). Chromeno[3,4-b]xanthenes as First-in-Class AChE and A β Aggregation Dual-Inhibitors. *Int J Mol Sci*, *22*(8), 4145. <https://doi.org/10.3390/ijms22084145>
- Mant, C. T., Cepeniene, D. & Hodges, R. S. (2010). Reversed-phase HPLC of peptides: Assessing column and solvent selectivity on standard, polar-embedded and polar endcapped columns. *J Sep Sci*, *33*(19), 3005-3021. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000518>
- Mant, C. T., Chen, Y., Yan, Z., Popa, T. V., Kovacs, J. M., Mills, J. B., Tripet, B. P. & Hodges, R. S. (2007). HPLC analysis and purification of peptides. *Methods Mol Biol*, *386*, 3-55. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-430-8_1
- Marani, M. M., Oliveira, E., Côte, S., Camperi, S. A., Albericio, F. & Cascone, O. (2007). Identification of protein-binding peptides by direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptide beads selected from the screening of one bead-one peptide combinatorial libraries. *Anal Biochem*, *370*(2), 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.032>
- Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P. & de Vries, A. H. (2007). The MARTINI force field: coarse-grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B*, *111*(27), 7812-7824. <https://doi.org/10.1021/jp071097f>

Martin, V., Egelund, P. H. G., Johansson, H., Thordal Le Qument, S., Wojcik, F. & Sejer Pedersen, D. (2020). Greening the synthesis of peptide therapeutics: an industrial perspective. *RSC Adv*, 10(69), 42457-42492. <https://doi.org/10.1039/d0ra07204d>

Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F. & Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 291-325. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.291>

Matějovský, L. & Pitschmann, V. (2018). New Carrier Made from Glass Nanofibres for the Colorimetric Biosensor of Cholinesterase Inhibitors. *Biosensors (Basel)*, 8(2), 51. <https://doi.org/10.3390/bios8020051>

Matejtschuk, P. (2007). Lyophilization of proteins. *Methods Mol Biol*, 368, 59-72. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_4

Matsui, R., Honda, R., Kanome, M., Hagiwara, A., Matsuda, Y., Togitani, T., Ikemoto, N. & Terashima, M. (2018). Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. *Food Chem*, 245, 750-755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.119>

McCammon, J. A., Gelin, B. R. & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), 585-590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>

Meden, A., Knez, D., Jukič, M., Brazzolotto, X., Gršič, M., Pišlar, A., Zahirović, A., Kos, J., Nachon, F., Svete, J., Gobec, S. & Grošelj, U. (2019). Tryptophan-derived butyrylcholinesterase inhibitors as promising leads against Alzheimer's disease. *Chem Commun (Camb)*, 55(26), 3765-3768. <https://doi.org/10.1039/c9cc01330j>

Melchiorri, D., Merlo, S., Micallef, B., Borg, J. J. & Dráfi, F. (2023). Alzheimer's disease and neuroinflammation: will new drugs in clinical trials pave the way to a multi-target therapy? *Front Pharmacol*, 14, 1196413. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1196413>

-
- Memarpoor-Yazdi, M., Mahaki, H. & Zare-Zardini, H. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.004>
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M. & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*, 7(2), 146-157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Merrifield, R. B. (1969). Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 32, 221-96. <https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch6>
- Michael, A. S., Thompson, C. G. & Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, 123(3194), 464. <https://doi.org/10.1126/science.123.3194.464>
- Mikalauskaite, K., Ziaunys, M., Sneideris, T. & Smirnovas, V. (2020). Effect of Ionic Strength on Thioflavin-T Affinity to Amyloid Fibrils and Its Fluorescence Intensity. *Int J Mol Sci*, 21(23), 8916. <https://doi.org/10.3390/ijms21238916>
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Safavi, M., Zare, D., Hadizadeh, M. & Asadi, M. M. (2019). Synthesis, in vitro and cellular antioxidant activity evaluation of novel peptides derived from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate: structure–function relationship. *Amino Acids*, 51, 1167-1175. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02752-z>
- Mohamed Abd El-Aziz, T., Garcia Soares, A. & Stockand, J. D. (2019). Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins (Basel)*, 11(10), 564. <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>
- Mohandas, N. & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Mondal, P., Gupta, V., Das, G., Pradhan, K., Khan, J., Gharai, P. K. & Ghosh, S. (2018). Peptide-Based Acetylcholinesterase Inhibitor Crosses the Blood-Brain Barrier and Promotes Neuroprotection. *ACS Chem Neurosci*, 9(11), 2838-2848. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00253>

Monge-Fuentes, V., Arenas, C., Galante, P., Gonçalves, J. C., Mortari, M. R. & Schwartz, E. F. (2018). Arthropod toxins and their antinociceptive properties: From venoms to painkillers. *Pharmacol Ther*, *188*, 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.007>

Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. (2005). Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *ChemInform*, *61*(46), 10827-10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>

Morén, C., de Souza, R. M., Giraldo, D. M. & Uff, C. (2022). Antioxidant Therapeutic Strategies in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, *23*(16), 9328. <https://doi.org/10.3390/ijms23169328>

Moreta, M. P., Burgos-Alonso, N., Torrecilla, M., Marco-Contelles, J. & Bruzos-Cidón, C. (2021). Efficacy of Acetylcholinesterase Inhibitors on Cognitive Function in Alzheimer's Disease. *Review of Reviews. Biomedicines*, *9*(11), 1689. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111689>

Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassallo, A., Vogel, H., Sgambato, A. & Falabella, P. (2021). Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Front Cell Infect Microbiol*, *11*, 668632. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>

Mukherjee, S. & Gupta, R. D. (2020). Organophosphorus Nerve Agents: Types, Toxicity, and Treatments. *J Toxicol*, *2020*, 3007984. <https://doi.org/10.1155/2020/3007984>

Muñoz, F. J., Aldunate, R. & Inestrosa, N. C. (1999). Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase. *Neuroreport*, *10*(17), 3621-3625. <https://doi.org/10.1097/00001756-199911260-00029>

Murray, K. A., Hu, C. J., Griner, S. L., Pan, H., Bowler, J. T., Abskharon, R., Rosenberg, G. M., Cheng, X., Seidler, P. M. & Eisenberg, D. S. (2022). De novo designed protein inhibitors of amyloid aggregation and seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *119*(34), e2206240119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2206240119>

Muttenthaler, M., King, G. F., Adams, D. J. & Alewood, P. F. (2021). Trends in peptide drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 20(4), 309-325. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00135-8>

Nabil, Z. I., Hussein, A. A., Zalat, S. M. & Rakha, M. Kh. (1998). Mechanism of action of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom on different types of muscles. *Hum Exp Toxicol*, 17(3), 185-190. <https://doi.org/10.1177/096032719801700311>

Nachon, F., Nicolet, Y., Viguié, N., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C. & Lockridge, O. (2002). Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization. *Eur J Biochem*, 269(2), 630-637. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02692.x>

Nadeem, M. S., Azam Khan, J., Kazmi, I. & Rashid, U. (2022). Design, Synthesis, and Bioevaluation of Indole Core Containing 2-Arylidine Derivatives of Thiazolopyrimidine as Multitarget Inhibitors of Cholinesterases and Monoamine Oxidase A/B for the Treatment of Alzheimer Disease. *ACS Omega*, 7(11), 9369-9379. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06344>

Nascimento, A. C., Zanotta, L. C., Kyaw, C. M., Schwartz, E. N., Schwartz, C. A., Sebben, A., Sousa, M. V., Fontes, W. & Castro, M. S. (2004). Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *Protein J*, 23(8), 501-508. <https://doi.org/10.1007/s10930-004-7877-z>

Nayak, B. N. & Buttar, H. S. (2016). Evaluation of the antioxidant properties of tryptophan and its metabolites in in vitro assay. *J Complement Integr Med*, 13(2), 129-136. <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0051>

Nayeem, A., Vila, J. & Scheraga, H. A. (1991). A comparative study of the simulated-annealing and Monte Carlo-with-minimization approaches to the minimum-energy structures of polypeptides: [Met]-enkephalin. *J Comput Chem*, 12, 594-605. <https://doi.org/10.1002/jcc.540120509>

- Nešuta, O., Hexnerová, R., Buděšínský, M., Slaninová, J., Bednárová, L., Hadravová, R., Straka, J., Veverka, V. & Čeřovský, V. (2016). Antimicrobial Peptide from the Wild Bee *Hylaeus signatus* Venom and Its Analogues: Structure-Activity Study and Synergistic Effect with Antibiotics. *J Nat Prod*, 79(4), 1073-1083. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01129>
- Ngamelue, M. N. & Hsu, J.-L. (2022). Bioactive Peptides: An Understanding from Current Screening Methodology. *Processes*, 10(6), 1114. <https://doi.org/10.3390/pr10061114>
- O'Brien, R. J. & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*, 34, 185-204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
- Oset-Gasque, M. J. & Marco-Contelles, J. (2018). Alzheimer's Disease, the "One-Molecule, One-Target" Paradigm, and the Multitarget Directed Ligand Approach. *ACS Chem Neurosci*, 9(3), 401-403. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00069>
- Padrtová, T., Marvanová, P., Kubínová, R., Csöllei, J., Farsa, O., Goněk, T., Odehnalová, K., Opatřilová, R., Pazourek, J., Sychrová, A., Šmejkal, K. & Mokřý, P. (2020). Indol-2-Carboxylic Acid Esters Containing N-Phenylpiperazine Moiety - Preparation and Cholinesterase-inhibiting Activity. *Curr Org Synth*, 17(7), 576-587. <https://doi.org/10.2174/1570179417666200619132218>
- Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S. & Kim, S. C. (2000). Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15), 8245-8250. <https://doi.org/10.1073/pnas.150518097>
- Park, H., Yeom, M. S. & Lee, S. (2004). Loop flexibility and solvent dynamics as determinants for the selective inhibition of cyclin-dependent kinase 4: comparative molecular dynamics simulation studies of CDK2 and CDK4. *Chembiochem*, 5(12), 1662-1672. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400214>

- Park, Y. W. & Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 35(6), 831-840. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>
- Patocka, J., Nepovimova, E., Klimova, B., Wu, Q. & Kuca, K. (2019). Antimicrobial Peptides: Amphibian Host Defense Peptides. *Curr Med Chem*, 26(32), 5924-5946. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180713125314>
- Peighambardoust, S. H., Karami, Z., Pateiro, M. & Lorenzo, J. M. (2021). A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. *Biomolecules*, 11(5), 631. <https://doi.org/10.3390/biom11050631>
- Perlikowska, R., Silva, J., Alves, C., Susano, P. & Pedrosa, R. (2022). The Therapeutic Potential of Naturally Occurring Peptides in Counteracting SH-SY5Y Cells Injury. *Int J Mol Sci*, 23(19), 11778. <https://doi.org/10.3390/ijms231911778>
- Petrova, O. E. & Sauer, K. (2017). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular c-di-GMP. *Methods Mol Biol*, 1657, 33-43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_4
- Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P. & do Nascimento, C. J. (2014). Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int J Pept Res Ther*, 20, 53-69. <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9366-8>
- Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 155(3), 219-229. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.036>
- Polsinelli, G. A., Singh, S. K., Mishra, R. K., Suranyi, R., Ragsdale, D. W., Pang, Y. P. & Brimijoin, S. (2010). Insect-specific irreversible inhibitors of acetylcholinesterase in pests including the bed bug, the eastern yellowjacket, German and American cockroaches, and the confused flour beetle. *Chem Biol Interact*, 187(1-3), 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.036>

Pontiroli, A. E. (1998). Peptide hormones: Review of current and emerging uses by nasal delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 29(1-2), 81-87. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(97\)00062-8](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(97)00062-8)

Pope, C. N. & Brimijoin, S. (2018). Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem Pharmacol*, 153, 205-216. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.044>

Poulson, B. G., Szczepski, K., Lachowicz, J. I., Jaremko, L., Emwas, A. H. & Jaremko, M. (2019). Aggregation of biologically important peptides and proteins: inhibition or acceleration depending on protein and metal ion concentrations. *RSC Adv*, 10(1), 215-227. <https://doi.org/10.1039/c9ra09350h>

Pourshojaei, Y., Abiri, A., Eskandari, K., Haghighijoo, Z., Edraki, N. & Asadipour, A. (2019). Phenoxyethyl Piperidine/Morpholine Derivatives as PAS and CAS Inhibitors of Cholinesterases: Insights for Future Drug Design. *Sci Rep*, 9(1), 19855. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56463-2>

Prasasty, V., Radifar, M. & Istyastono, E. (2018). Natural Peptides in Drug Discovery Targeting Acetylcholinesterase. *Molecules*, 23(9), 2344. <https://doi.org/10.3390/molecules23092344>

Preetham, H. D., Muddegowda, U., Sharath Kumar, K. S., Rangappa, S. & Rangappa, K. S. (2022). Identification of β -aminopyrrolidine containing peptides as β -amyloid aggregation inhibitors for Alzheimer's disease. *J Pept Sci*, 28(6), e3386. <https://doi.org/10.1002/psc.3386>

Prefectura Naval Argentina. (1998). REGIMEN PARA LA PROTECCION DEL MEDIO AMBIENTE. In: *Ordenanza N° 8-98 (DPMA), Vol 6*. Prefectura Naval Argentina, Buenos Aires, Argentina.

Radić, Z., Reiner, E. & Taylor, P. (1991). Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol*, 39(1), 98-104.

Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M. & Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *Daru*, 23(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>

Rajput, A., Gupta, A. K. & Kumar, M. (2015). Prediction and analysis of quorum sensing peptides based on sequence features. *PLoS One*, 10(3), e0120066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120066>

Ramos, M. C., Quoika, P. K., Horta, V. A. C., Dias, D. M., Costa, E. G., do Amaral, J. L. M., Ribeiro, L. M., Liedl, K. R. & Horta, B. A. C. (2021). pyPolyBuilder: Automated Preparation of Molecular Topologies and Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations of Arbitrary Supramolecules. *J Chem Inf Model*, 61(4), 1539-1544. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01438>

Rastelli, G., Del Rio, A., Degliesposti, G. & Sgobba, M. (2010). Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA. *J Comput Chem*, 31(4), 797-810. <https://doi.org/10.1002/jcc.21372>

Raves, M. L., Harel, M., Pang, Y. P., Silman, I., Kozikowski, A. P. & Sussman, J. L. (1997). Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat Struct Biol*, 4(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nsb0197-57>

Reardon, S. (2023). FDA approves Alzheimer's drug lecanemab amid safety concerns. *Nature*, 613(7943), 227-228. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-00030-3>

Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M. & Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*, 29(6), 613-627. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>

Riazimontazer, E., Sadeghpour, H., Nadri, H., Sakhteman, A., Tüylü Küçükılınç, T., Miri, R. & Edraki, N. (2019). Design, synthesis and biological activity of novel tacrine-isatin Schiff base hybrid derivatives. *Bioorg Chem*, 89, 103006. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103006>

Riddles, P. W., Blakeley, R. L. & Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol*, 91, 49-60. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(83\)91010-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(83)91010-8)

Ring, B., Wrighton, S. A. & Mohutsky, M. (2014). Reversible mechanisms of enzyme inhibition and resulting clinical significance. *Methods Mol Biol*, 1113, 37-56. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-758-7_4

Rinne, J. O., Kaasinen, V., Järvenpää, T., Någren, K., Roivainen, A., Yu, M., Oikonen, V. & Kurki, T. (2003). Brain acetylcholinesterase activity in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74(1), 113-115. <https://doi.org/10.1136/jnnp.74.1.113>

Rizzuti, B. (2022). Molecular simulations of proteins: From simplified physical interactions to complex biological phenomena. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1870(3), 140757. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2022.140757>

Robles-Loaiza, A. A., Pinos-Tamayo, E. A., Mendes, B., Ortega-Pila, J. A., Proaño-Bolaños, C., Plisson, F., Teixeira, C., Gomes, P. & Almeida, J. R. (2022). Traditional and Computational Screening of Non-Toxic Peptides and Approaches to Improving Selectivity. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(3), 323. <https://doi.org/10.3390/ph15030323>

Rodríguez-lthurralde, D., Silveira, R., Barbeito, L. & Dajas, F. (1983). Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Neurochem Int*, 5(3), 267-274. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(83\)90028-1](https://doi.org/10.1016/0197-0186(83)90028-1)

Roe, D. R. & Cheatham, T. E. 3rd. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*, 9(7), 3084-3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>

Rosenberry, T. L., Brazzolotto, X., Macdonald, I. R., Wandhammer, M., Trovaslet-Leroy, M., Darvesh, S. & Nachon, F. (2017). Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. *Molecules*, 22(12), 2098. <https://doi.org/10.3390/molecules22122098>

- Sæbø, I. P., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E. & Booth, J. A. (2023). Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*, 24(3), 2914. <https://doi.org/10.3390/ijms24032914>
- Sakano, T., Mahamood, M. I., Yamashita, T. & Fujitani, H. (2016). Molecular dynamics analysis to evaluate docking pose prediction. *Biophys Physicobiol*, 13, 181-194. https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_181
- Salomon-Ferrer, R., Case, D. A. & Walker, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput Mol Sci*, 3, 198-210. <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>
- Sánchez, A. & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1, 29-46. doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006
- Sánchez Riera, A., Daud, A., Gallo, A., Genta, S., Aybar, M. & Sánchez, S. (2003). Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. *Biocell*, 27(1), 37-46. PMID: 12847913
- Sánchez-Chávez, G. & Salceda, R. (2008). Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Rev Educ Bioquímica*, 27 (2).
- Sanchis, I., Spinelli, R., Aschemacher, N., Humpola, MV. & Siano, A. (2020). Acetylcholinesterase inhibitory activity of a naturally occurring peptide isolated from *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) and its analogs. *Amino Acids*, 52(3), 387-396. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02815-1>
- Sanchis, I., Spinelli, R., Aschemacher, N. & Siano, A. (2022). Rational design and synthesis of modified natural peptides from *Boana pulchella* (anura) as acetylcholinesterase inhibitors and antioxidants. *Amino Acids*, 54(2), 181-192. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03096-3>
- Sanchis, I., Spinelli, R., Dias, J., Brazzolotto, X., Rietmann, Á., Aimaretti, F. & Siano, ÁS. (2023). Inhibition of Human Cholinesterases and in vitro β -Amyloid Aggregation by Rationally Designed Peptides. *ChemMedChem*, 18(12), e202200691. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200691>

Sanchis, I., Spinelli, R., & Siano, A. (2023). Acetylcholine hydrolytic activity of fibrillated β -amyloid (1-40) peptide. *Amino acids*, 10.1007/s00726-023-03349-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00726-023-03349-3>

Sanders, O. & Rajagopal, L. (2020). Phosphodiesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Clinical Trials and Epidemiology with a Mechanistic Rationale. *J Alzheimers Dis Rep*, 4(1), 185-215. <https://doi.org/10.3233/ADR-200191>

Sang, Z., Bai, P., Ban, Y., Wang, K., Wu, A., Mi, J., Hu, J., Xu, R., Zhu, G., Wang, J., Zhang, J., Wang, C., Tan, Z. & Tang, L. (2022). Novel donepezil-chalcone-rivastigmine hybrids as potential multifunctional anti-Alzheimer's agents: Design, synthesis, in vitro biological evaluation, in vivo and in silico studies. *Bioorg Chem*, 127, 106007. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106007>

Saponaro, A., Maione, V., Bonvin, A. M. J. J. & Cantini, F. (2020). Understanding Docking Complexes of Macromolecules Using HADDOCK: The Synergy between Experimental Data and Computations. *Bio Protoc*, 10(20), e3793. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3793>

Sarkar, R., Hazra, B. & Mandal, N. (2012). Reducing power and iron chelating property of Terminalia chebula (Retz.) alleviates iron induced liver toxicity in mice. *BMC Complement Altern Med*, 12, 144. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-144>

Saxena, A., Fedorko, J. M., Vinayaka, C. R., Medhekar, R., Radić, Z., Taylor, P., Lockridge, O. & Doctor, B. P. (2003). Aromatic amino-acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept) to cholinesterases. *Eur J Biochem*, 270(22), 4447-4458. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03837.x>

Schultz, A. W., Oh, D. C., Carney, J. R., Williamson, R. T., Udvary, D. W., Jensen, P. R., Gould, S. J., Fenical, W. & Moore, B. S. (2008). Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin. *J Am Chem Soc*, 130(13), 4507-4516. <https://doi.org/10.1021/ja711188x>

Scussat, S. (2011). *Structural impact of pre-heating treatments on whey proteins: Biophysical studies from macroscopic to molecular scale. In Thesis for: Master of Science (M.Sc.) Advisor: Camille Loupiac, Philippe Cayot. Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Udine.* <https://doi.org/10.13140/2.1.4018.4965>

Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat*, 10(2), 128-134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>

Sharma, A., Singla, D., Rashid, M., Raghava, G. P. S. (2014). Designing of peptides with desired half-life in intestine-like environment. *BMC Bioinformatics*, 15, 282. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-282>

Shin, J. H. (2022). Dementia Epidemiology Fact Sheet 2022. *Ann Rehabil Med*, 46(2), 53-59. <https://doi.org/10.5535/arm.22027>

Siano, A., Garibotto, F. F., Andujar, S. A., Baldoni, H. A., Tonarelli, G. G. & Enriz, R. D. (2017). Molecular design and synthesis of novel peptides from amphibians skin acting as inhibitors of cholinesterase enzymes. *J Pept Sci*, 23(3), 236-244. <https://doi.org/10.1002/psc.2974>

Siano, A., Humpola, M. V., de Oliveira, E., Albericio, F., Simonetta, A. C., Lajmanovich, R. & Tonarelli, G. G. (2018). Leptodactylus latrans Amphibian Skin Secretions as a Novel Source for the Isolation of Antibacterial Peptides. *Molecules*, 23(11), 2943. <https://doi.org/10.3390/molecules23112943>

Siano, A., Humpola, M. V., de Oliveira, E., Albericio, F., Simonetta, A. C., Lajmanovich, R. & Tonarelli, G. G. (2014). Antimicrobial peptides from skin secretions of *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *J Nat Prod*, 77(4), 831-841. <https://doi.org/10.1021/np4009317>

Siano, A., Tonarelli, G., Imaz, M. S., Perín, J. C., Ruggeri, N., López, M., Santi, M. N. & Zerbini, E. (2010). Bactericidal and hemolytic activities of synthetic peptides derived from granulysin. *Protein Pept Lett*, 17(4), 517-521. <https://doi.org/10.2174/092986610790963555>

- Silva, M. A., Kiametis, A. S. & Treptow, W. (2020). Donepezil Inhibits Acetylcholinesterase via Multiple Binding Modes at Room Temperature. *J Chem Inf Model*, 60(7), 3463-3471. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01073>
- Simons, A., Alhanout, K. & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Sinha, N. J., Kloxin, C. J., Saven, J. G., Jensen, G. V., Kelman, Z. & Pochan, D. J. (2021). Recombinant expression of computationally designed peptide-bundlers in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 330, 57-60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.03.004>
- Sinha, S., Tam, B. & Wang, S. M. (2022). Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. *Membranes (Basel)*, 12(9), 844. <https://doi.org/10.3390/membranes12090844>
- Sinyor, B., Mineo, J. & Ochner, C. (2020). Alzheimer's Disease, Inflammation, and the Role of Antioxidants. *J Alzheimers Dis Rep*, 4(1), 175-183. <https://doi.org/10.3233/ADR-200171>
- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J. & Lowe, E. W. Jr. (2013). Computational methods in drug discovery. *Pharmacol Rev*, 66(1), 334-95. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>
- Soeda, Y. & Takashima, A. (2020). New Insights Into Drug Discovery Targeting Tau Protein. *Front Mol Neurosci*, 13, 590896. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.590896>
- Song, C., Shi, J., Zhang, P., Zhang, Y., Xu, J., Zhao, L., Zhang, R., Wang, H. & Chen, H. (2022). Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond. *Transl Neurodegener*, 11(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00292-3>

Song, L. F., Lee, T. S., Zhu, C., York, D. M. & Merz, K. M. Jr. (2019). Using AMBER18 for Relative Free Energy Calculations. *J Chem Inf Model*, *59*(7), 3128-3135. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00105>

Spinelli, R., Humpola, M. V., Sanchis, I., Mendez, E. & Siano, A. S. (2023). Biological Characterization of Natural Peptide Bcl-1003 from *Boana cordobae* (anura): Role in Alzheimer's Disease and Microbial Infections. *Int J Pept Res Ther*, *29*(6). <https://doi.org/10.1007/s10989-022-10472-4>

Ste Marie, E. J. & Hondal, R. J. (2018). Reduction of cysteine-S-protecting groups by triisopropylsilane. *J Pept Sci*, *24*(11), e3130. <https://doi.org/10.1002/psc.3130>

Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P. W., Brooks, H. B., Radding, J. A., McGee, J. & Weidner, J. (2012). Mechanism of Action Assays for Enzymes. In S. Markossian (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Subirós-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A., Albericio, F. (2009). Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chemistry*, *15*(37), 9394-9403. <https://doi.org/10.1002/chem.200900614>

Subramanian, N., Watson, B., Li, C. Z., Moss, M., Liu, C. (2023). Patterning amyloid- β aggregation under the effect of acetylcholinesterase using a biological nanopore - an in vitro study. *Sensors and Actuators Reports*, *6*, 100170. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2023.100170>

Sun, X., Chen, W. D. & Wang, Y. D. (2015). β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol*, *6*, 221. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>

Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. & Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, *253*(5022), 872-9. <https://doi.org/10.1126/science.1678899>

Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Varon, L., Toker, L., Futerman, A. H. & Silman, I. (1988). Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Mol Biol*, 203(3), 821-3. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90213-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90213-6)

Talevi, A. (2015). Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective. *Front Pharmacol*, 6, 205. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00205>

Tan, C. C., Yu, J. T., Wang, H. F., Tan, M. S., Meng, X. F., Wang, C., Jiang, T., Zhu, X. C. & Tan, L. (2014). Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis*, 41(2), 615-31. <https://doi.org/10.3233/JAD-132690>

Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A., Saidijam, M., Chamani, J. & Mahaki, H. (2018). Improving efficiency of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide as multifunctional peptides. *J Biomol Struct Dyn*, 36, 3803-3818. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1401001>

Thévenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P. & Tufféry, P. (2012). PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res*, 40(Web Server issue), W288-93. <https://doi.org/10.1093/nar/gks419>

Tian, C., Kasavajhala, K., Belfon, K. A. A., Raguette, L., Huang, H., Miguez, A. N., Bickel, J., Wang, Y., Pincay, J., Wu, Q. & Simmerling, C. (2020). ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J Chem Theory Comput*, 16(1), 528-552. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>

Tripet, B., Cepeniene, D., Kovacs, J. M., Mant, C. T., Krokhin, O. V. & Hodges, R. S. (2007). Requirements for prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography: hydrophilicity/hydrophobicity of side-chains at the N- and C-termini of peptides are dramatically affected by the

end-groups and location. *J Chromatogr A*, 1141(2), 212-25.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.024>

Tumiatti, V., Minarini, A., Bolognesi, M. L., Milelli, A., Rosini, M. & Melchiorre, C. (2010). Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*, 17(17), 1825-38. <https://doi.org/10.2174/092986710791111206>

U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Converts Novel Alzheimer's Disease Treatment to Traditional Approval. Retrieved June 6, 2023, from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-converts-novel-alzheimers-disease-treatment-traditional-approval>

Vagner, J., Qu, H. & Hruby, V. J. (2008). Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 12(3), 292-6.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.009>

van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, LD. & Iwatsubo, T. (2023). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 388(1), 9-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>

van Zoggel, H., Carpentier, G., Dos Santos, C., Hamma-Kourbali, Y., Courty, J., Amiche, M. & Delbé, J. (2012). Antitumor and angiostatic activities of the antimicrobial peptide dermaseptin B2. *PLoS One*, 7(9), e44351.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044351>

van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Melquiond, A. S. J., van Dijk, M., de Vries, S. J. & Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol*, 428(4), 720-725.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>

Vecchio, I., Sorrentino, L., Paoletti, A., Marra, R. & Arbitrio, M. (2021). The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's

Disease. *J Cent Nerv Syst Dis*, 13, 11795735211029113. <https://doi.org/10.1177/11795735211029113>

Viayna, E., Sabate, R. & Muñoz-Torrero, D. (2013). Dual inhibitors of β -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates. *Curr Top Med Chem*, 13(15), 1820-42. <https://doi.org/10.2174/15680266113139990139>

Vicente-Zurdo, D., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Brunetti, L., Piemontese, L., Pereira-Santos, A. R., Cardoso, S. M., Madrid, Y., Chaves, S. & Santos, M. A. (2022). Novel Rivastigmine Derivatives as Promising Multi-Target Compounds for Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomedicines*, 10(7), 1510. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071510>

Wang, C., Lu, Y. & Cao, S. (2020). Antimicrobial compounds from marine actinomycetes. *Arch Pharm Res*, 43(7), 677-704. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01251-0>

Wang, G., Li, X. & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D1087-93. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>

Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R. & Fu, C. (2022). Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 48. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>

Wang, X., Ren, S., Guo, C., Zhang, W., Zhang, X., Zhang, B., Li, S., Ren, J., Hu, Y. & Wang, H. (2017). Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 49(6), 550-559. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx032>

Wassenaar, T. A. & Mark, A. E. (2006). The effect of box shape on the dynamic properties of proteins simulated under periodic boundary conditions. *J Comput Chem*, 27(3), 316-25. <https://doi.org/10.1002/jcc.20341>

Wenski, S. L., Thiengmag, S. & Helfrich, E. J. N. (2022). Complex peptide natural products: Biosynthetic principles, challenges and opportunities for pathway engineering. *Synth Syst Biotechnol*, 7(1), 631-647. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.01.007>

Wichur, T., Pasięka, A., Godyń, J., Panek, D., Góral, I., Latacz, G., Honkisz-Orzechowska, E., Bucki, A., Siwek, A., Głuch-Lutwin, M., Knez, D., Brazzolotto, X., Gobec, S., Kołaczkowski, M., Sabate, R., Malawska, B. & Więckowska, A. (2021). Discovery of 1-(phenylsulfonyl)-1H-indole-based multifunctional ligands targeting cholinesterases and 5-HT₆ receptor with anti-aggregation properties against amyloid-beta and tau. *Eur J Med Chem*, 225, 113783. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113783>

Wiesner, J., Kriz, Z., Kuca, K., Jun, D. & Koca, J. (2007). Acetylcholinesterases-the structural similarities and differences. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 22(4), 417-24. <https://doi.org/10.1080/14756360701421294>

World Health Organization (WHO). Fact sheets of dementia. Retrieved Jul 27, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

Wu, G., Gao, Y., Kang, D., Huang, B., Huo, Z., Liu, H., Poongavanam, V., Zhan, P. & Liu, X. (2017). Design, synthesis and biological evaluation of tacrine-1,2,3-triazole derivatives as potent cholinesterase inhibitors. *Medchemcomm*, 9(1), 149-159. <https://doi.org/10.1039/c7md00457e>

Wynendaele, E., Debunne, N., Janssens, Y., De Spiegeleer, A., Verbeke, F., Tack, L., Van Welden, S., Goossens, E., Knappe, D., Hoffmann, R., Van De Wiele, C., Laukens, D., Van Eenoo, P., Vereecke, L., Van Immerseel, F. & De Spiegeleer, B. (2022). The quorum sensing peptide EntF* promotes colorectal cancer metastasis in mice: A new factor in the host-microbiome interaction. *BMC Biol*, 20(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01317-z>

Xu, Y., Cheng, S., Sussman, J. L., Silman, I. & Jiang, H. (2017). Computational Studies on Acetylcholinesterases. *Molecules*, 22(8), 1324. <https://doi.org/10.3390/molecules22081324>

- Xue, C., Lin, TY., Chang, D. & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci*, 4(1), 160696. <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Yan, R. & Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol*, 13(3), 319-29. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X)
- Yaneva, S., Stoykova, I., Ilieva, L., Vezenkov, L., Marinkova, D., Yotova, L., Raykova, D. & Danalev, D. (2017). Acetylcholinesterase inhibition activity of peptide analogs of galanthamine with potential application for treatment of Alzheimer's disease. *Bulg Chem Commun*, 49, 90–94.
- Yang, T., Wu, JC., Yan, C., Wang, Y., Luo, R., Gonzales, MB., Dalby, KN. & Ren, P. (2011). Virtual screening using molecular simulations. *Proteins*, 79(6), 1940-51. <https://doi.org/10.1002/prot.23018>
- Yang, X., Lin, H., Lu, W. & Wang, D. (2013). Compatibility study of Merrifield linker in Fmoc strategy peptide synthesis. *Protein Pept Lett*, 20(2), 140-5. <https://doi.org/10.2174/092986613804725343>
- Yu, Z., Wu, S., Zhao, W., Ding, L., Fan, Y., Shiuan, D., Liu, J. & Chen, F. (2018). Anti-Alzheimers activity and molecular mechanism of albumin-derived peptides against AChE and BChE. *Food Funct*, 9(2), 1173-1178. <https://doi.org/10.1039/c7fo01462g>
- Zaky, AA., Simal-Gandara, J., Eun, JB., Shim, JH. & Abd El-Aty, AM. (2022). Bioactivities, Applications, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From Food and By-Products: A Review. *Front Nutr*, 8, 815640. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5449-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5449>

- Zenezini Chiozzi, R., Capriotti, AL., Cavaliere, C., La Barbera, G., Piovedana, S., Samperi, R., Laganà, A. (2016). Purification and identification of endogenous antioxidant and ACE-inhibitory peptides from donkey milk by multidimensional liquid chromatography and nanoHPLC-high resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 408(20), 5657-66. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9672-z>
- Zhan, G., Miao, R., Zhang, F., Chang, G., Zhang, L., Zhang, X., Zhang, H. & Guo, Z. (2020). Monoterpene indole alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from the leaves of *Rauvolfia vomitoria*. *Bioorg Chem*, 102, 104136. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104136>
- Zhan, T., Rindtorff, N. & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461-1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
- Zhan, ZJ., Yu, Q., Wang, ZL. & Shan, WG. (2010). Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 20(21), 6185-7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.123>
- Zhang, W., Yang, T., Zhou, S., Cheng, J., Yuan, S., Lo, GV., Dou, Y. (2019). Molecular Dynamics Simulation of Transmembrane Transport of Chloride Ions in Mutants of Channel rhodopsin. *Biomolecules*, 9(12), 852. <https://doi.org/10.3390/biom9120852>
- Zhang, X., Gao, F., Wang, D., Li, C., Fu, Y., He, W., Zhang, J. (2018). Tau Pathology in Parkinson's Disease. *Front Neurol*, 9, 809. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00809>
- Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y. & Wang, C. (2020). Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*, 13, 137. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00137>
- Zhao, Y., Jin, Y., Wang, JH., Wang, RR., Yang, LM., Lee, WH., Zheng YT. & Zhang, Y. (2005). A novel heme-containing protein with anti-HIV-1 activity from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Toxicon*, 46(6), 619-24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.022>

Zhirnov, OP., Klenk, HD., Wright, PF. (2011). Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral Res*, 92(1), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.014>

Zhou, S. & Huang, G. (2022). The biological activities of butyrylcholinesterase inhibitors. *Biomed Pharmacother*, 146, 112556. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112556>

Zhou, Y., Wang, S. & Zhang, Y. (2010). Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B*, 114(26), 8817-25. <https://doi.org/10.1021/jp104258d>

Zhu, CZ., Zhang, WG., Zhou, GH. & Xu, XL. (2016). Identification of antioxidant peptides of Jinhua ham generated in the products and through the simulated gastrointestinal digestion system. *J Sci Food Agric*. 96, 99-108. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7065>

Zoete, V., Irving, MB. & Michielin, O. (2010). MM-GBSA binding free energy decomposition and T cell receptor engineering. *J Mol Recognit*, 23(2), 142-52. <https://doi.org/10.1002/jmr.100>