



# Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results

**Title in Spanish:** *Metodologías de modelado molecular en el diseño, síntesis y explicación racional de resultados*

José María Sánchez Montero<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Biotransformaciones, Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España.

**ABSTRACT:** Computational Chemistry integrates basic concepts of chemistry to solve problems through graphical representations that attempt to explain the events studied. Molecular modeling is a useful tool because it allows rationally interpret for example the process of interaction between a molecule and its target, and provides reliable data that can predict system behavior. Moreover, the boom experienced by Structural Biology and Nuclear Magnetic Resonance has allowed in recent years to increase the number of 3D structures for use in modeling. Undoubtedly, the great advances in the field of bioinformatics, associated with the use of increasingly sophisticated computational means, portend the ability to draw sound conclusions from chemical processes, so this research area has experienced considerable recognized increase in 2013 by the Royal Swedish Academy of Sciences awarding the Nobel Prize in Chemistry. In this paper we review some of the achievements in the field of molecular modeling by our group in the past, mainly applied to Biocatalysis, and the results obtained in the present in the field of controlled drug release and posit models prediction that can be used in the near future in the field of great interest in medicine.

**RESUMEN:** La Química computacional integra los conceptos básicos especializados de la Química, para la solución de problemas por medio de representaciones gráficas que tratan de explicar los sucesos estudiados. El Modelado Molecular es una herramienta de gran utilidad, pues permite interpretar de manera racional por ejemplo el proceso de interacción entre una molécula y su diana, y proporciona datos fiables que permiten predecir el comportamiento del sistema. Por otra parte el auge experimentado por la Biología estructural así como la Resonancia Magnética Nuclear ha permitido incrementar en los últimos años el número de estructuras en 3D para su utilización en modelado. Sin duda, los grandes avances en el campo de la Bioinformática, asociados al empleo de medios computacionales cada vez más sofisticados, auguran la capacidad de extraer conclusiones racionales de los procesos químicos, por lo que esta área de investigación ha experimentado un considerable aumento reconocido en el año 2013 por la Real Academia Sueca de las Ciencias con la concesión del Premio Nobel de Química. En el presente trabajo revisamos algunos de los logros obtenidos en el campo de la modelización molecular realizados por nuestro grupo en el pasado, aplicados fundamentalmente a la Biocatálisis, así como los resultados obtenidos en el presente en el campo de liberación controlada de fármacos y postulamos modelos de predicción que pueden utilizarse en un futuro próximo en este campo de gran interés en Medicina.

\*Corresponding Author: [jmsm@ucm.es](mailto:jmsm@ucm.es)

Received: October 7, 2015 Accepted: June 20, 2016

Premio Real Academia Nacional de Farmacia del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 2 (2016), pp. 168-184

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de la utilización del modelado molecular en Química fue reconocida en 2013 por la Real Academia Sueca de las Ciencias, con la concesión del Premio Nobel de Química por el desarrollo de modelos multiescala de sistemas químicos complejos a Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel. Estos modelos avanzados son unas herramientas sobre todo predictivas, que permiten acercarse a la realidad y pueden establecer si una reacción va a ocurrir o no, diseñar nuevos materiales o fármacos, conocer cómo responden determinadas proteínas

a contaminantes o a fármacos, determinar las interacciones fármaco-receptor e innumerables aplicaciones más. Actualmente, estos modelos tienen tal poder predictivo que se pueden hacer experimentos de química en ordenador en lugar de en el laboratorio convencional, lo que ahorra tiempo y dinero.

Respecto al gran auge del modelado molecular en Biocatálisis y en general en el diseño de fármacos realizados mediante estas técnicas tienen un común denominador y es el rápido avance producido en biología estructural, lo que ha puesto de manifiesto la estructura

tridimensional de muchos biocatalizadores. Su conocimiento es fundamental para ambas disciplinas. En muchas ocasiones la predicción de la actividad y selectividad de un biocatalizador ante un sustrato no natural puede ser compleja. En este sentido, el modelado molecular es la herramienta que conecta estas estructuras con las observaciones experimentales. El modelado molecular puede definirse como una descripción simplificada o idealizada de un sistema molecular o proceso entre moléculas, ideada para facilitar cálculos y predicciones. Desde el punto de vista de la utilización de estas enzimas o células para llevar a cabo reacciones fuera de su medio natural, es decir en los seres vivos, la Biocatálisis se enriquece cuando los fenómenos que generan y modulan la actividad catalítica de las enzimas se estudian con una visión multidisciplinar. Las tecnologías y herramientas moleculares han avanzado rápidamente en los últimos 50 años, de tal manera que es posible plantear hipótesis, diseñar experimentos e interpretar resultados utilizando información tanto experimental como teórica.

Las Biotransformaciones serían, aquellos procesos en los que se emplean biocatalizadores para la transformación de sustratos no naturales para dicho biocatalizador y se obtienen productos de alto valor añadido.

La Biocatálisis, al igual que la química orgánica, que ha evolucionado a partir de una descripción empírica a una disciplina basada en el mecanismo y una ciencia basada en la estructura, está también evolucionando a un diseño racional de la ciencia basada en la estructura. El comienzo de la biocatálisis estuvo marcado por aproximaciones empíricas como el cribado, (*screening*) o simples extrapolaciones de sustratos conocidos. El modelado molecular puede ayudarnos a responder a importantes preguntas que se plantean al llevar a cabo un proceso biocatalizado: i) Explicar a nivel molecular el comportamiento, en muchos casos conocido de una enzima. ii) Sugerir como cambia la selectividad de una reacción por modificación del sustrato, enzima o condiciones de reacción. iii) Predecir cuantitativamente el grado de estereoselectividad de una reacción catalizada por una enzima.

No obstante, una vez diseñada la molécula cabeza de serie diremos que el fármaco es un ligando de una diana terapéutica, es decir el receptor biológico. Cuando el fármaco está incorporado en el vehículo adecuado para su administración terapéutica y puede alcanzar el proceso bioquímico que debe modular, podemos hablar en términos de medicamento, del cual decimos que el fármaco es el principio activo.

El diseño de fármacos multidiana (“multi-target”) es decir, capaces de atacar varios objetivos simultáneamente, más eficientes y con menos efectos secundarios, constituye un punto de inflexión en la tendencia de la investigación farmacológica, ya que propone que la solución a una patología sea sistémica en lugar de específica. Así un medicamento puede constar de varios principios activos (1). Actualmente se está trabajando en la combinación de varios componentes activos en una única píldora, la

“*Polypill*”, en personas con diagnóstico de enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial o diabetes para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

En la Tabla 1A se presenta una primera clasificación general de los métodos computacionales en función de que sean métodos de cálculo directos o indirectos.

En la Tabla 1B podemos ver la evolución de las distintas técnicas computacionales en función del conocimiento que se tenga del sitio de unión o del receptor. Podemos decir de un modo general, que las dos estrategias seguidas habitualmente en modelado, son las denominadas directas e indirectas tal y como se muestra en la Tabla 1A. En la primera se tienen que conocer las características tridimensionales de un receptor generalmente a partir de datos cristalográficos y se interpreta la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor. Esto es lo que se conoce por el término de “*docking*”. Los programas de *docking*, anglicismo que puede traducirse por acoplamiento se han utilizado tradicionalmente para realizar una exploración exhaustiva ligando proteína. Su objetivo es la obtención de la estructura del complejo receptor-ligando de energía más baja (se debe cumplir que  $\Delta E < 0$ ), y el análisis de las principales interacciones implicadas en la unión fármaco-receptor.

En la Figura 1A, podemos ver la interacción que se produciría entre la acetil colinesterasa de *Torpedo californica* (receptor), el cloruro de donepezilo (ligando) y el THC (1). Por otra parte se comparan los valores de energía con análogos desarrollados en nuestro grupo de investigación y diseñados inicialmente en el ordenador mediante técnicas computacionales y posteriormente sintetizados en nuestro laboratorio Figura 1B, para el tratamiento de las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer. El fármaco bloquea el sitio catalítico de la enzima lo que impediría que se produjese la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina que es su sustrato natural. Este conocimiento permitiría diseñar nuevos análogos más potentes (2).

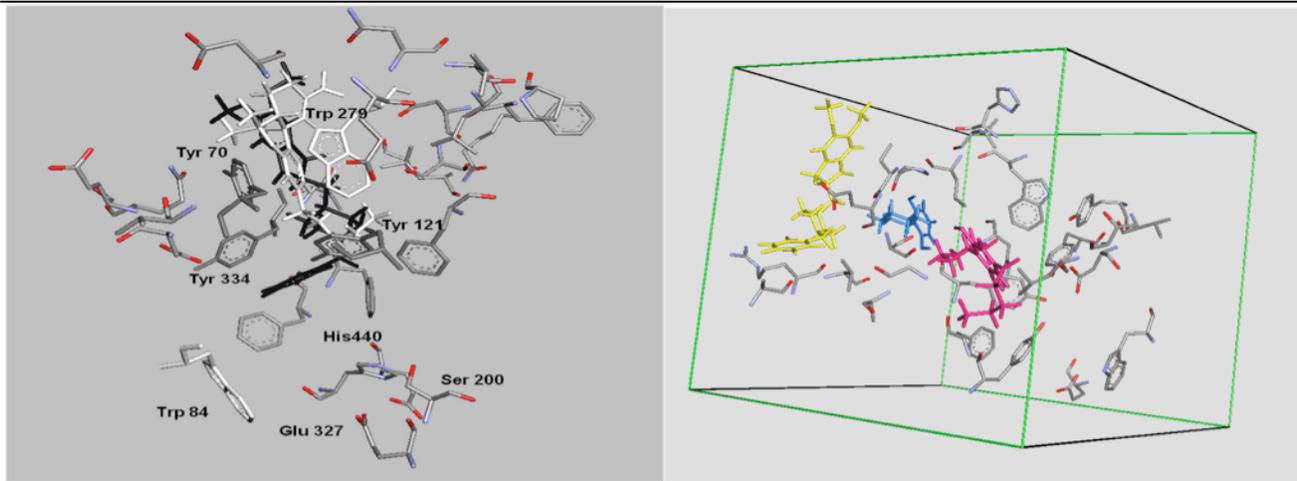
La segunda estrategia, (estructura tridimensional del receptor no conocida), se basa en el análisis comparativo de las características estructurales de sustancias conocidas activas o inactivas con el fin de definir un farmacóforo (parte de la molécula que produce los efectos fisiológicos específicos de un medicamento) apropiado para la actividad biológica estudiada siendo la aplicación más destacada las relaciones cuantitativas estructura actividad en tres dimensiones (QSAR 3D).

La predicción cuantitativa *in silico* de la actividad enzimática y la selectividad sigue siendo un objetivo de gran interés en Biocatálisis.

Los estudios de las dos últimas décadas han demostrado cómo las enzimas pueden utilizarse adecuadamente, tanto en disolución acuosa como en entornos no convencionales para éstas, como por ejemplo disolventes orgánicos, líquidos iónicos, etc., lo que permite poner en práctica nuevas metodologías, incluso en los ambientes más extremos.

Las simulaciones moleculares nos permiten la construcción de modelos virtuales de sistemas químicos. El principal interés del modelado molecular en Biocatálisis es el conocimiento a nivel molecular de las interacciones enzima-sustrato. En muchos casos persiguiendo como meta, la predicción de la actividad y selectividad, como comentamos anteriormente. Hay distintos algoritmos que

nos sirven para predecir el docking de un sustrato en el centro activo de una enzima, así como para el cálculo de su energía de interacción y para la simulación de su energía de solvatación. La aplicación de estos métodos a la biocatálisis está basada en el cálculo de la energía libre de la reacción que a su vez deriva de la simulación del estado de transición.

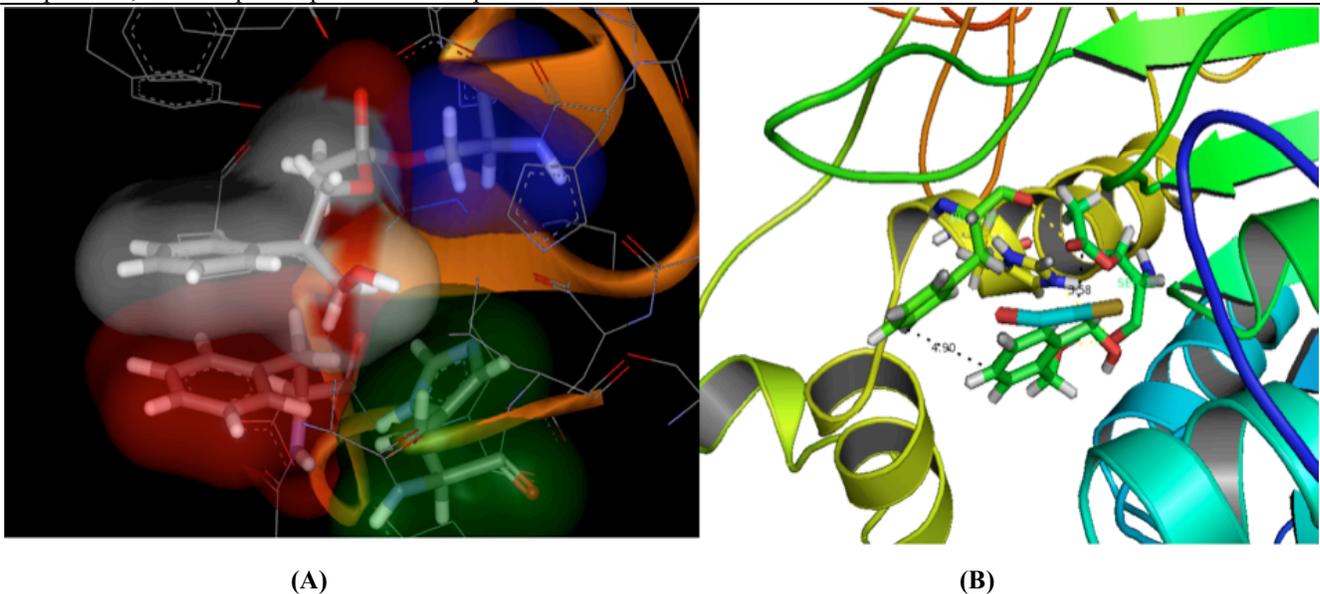


**Figura 1 (A).** Interacción de un fármaco (donepezilo, representado en negro) con su diana (acetilcolinesterasa humana, aminoácidos representados en gris), y tetrahidrocannabinol (representado en blanco). **(B)** Valores de energía de interacción mediante modificaciones estructurales de la molécula de THC. Se compara con el Donepezilo amarillo -6,68 Kcal/mol. Comp. fucsia -7,40 Kcal/mol. Comp. azul -8,20 Kcal/mol obtenidos por técnicas computacionales.

En el presente trabajo, haremos una revisión de las diferentes etapas de nuestra investigación mencionando algunos resultados obtenidos fundamentalmente en el campo de la Biocatálisis, hasta el momento actual en que utilizamos los modelos tridimensionales en la liberación controlada de fármacos. En la parte final del trabajo se presenta una tabla de fármacos agrupados en sus familias terapéuticas, en la que a partir de sus potenciales de

interacción y energía de docking se puede predecir cualitativamente el comportamiento cinético que tendrá el fármaco en la matriz.

Un ejemplo de lo anteriormente dicho se muestra en la investigación mostrada a continuación por nuestro grupo en dos etapas muy diferentes en el tiempo y que demuestra el poder predictivo de estas técnicas (3):



**Figura 2.** (A) docking manual para el 2-fenil-1,3-propanodiol. (B) docking automático para el 2-fenil-1,3-propanodiol.

En la acilación de diferentes (1,n)-alcanodiolos utilizados como intermedios en la preparación de una gran variedad de compuestos de interés como agentes antibacterianos entre otros, se utilizó la lipasa de páncreas porcino mediante la realización de un docking manual de los diferentes sustratos en la estructura descrita del centro activo, para el 2-fenil-1,3-propanodiol (Figura 2A ). Se postuló el posible papel del residuo Phe216 como importante para el correcto reconocimiento del sustrato, ajustando las dimensiones de los sustratos a un triángulo cuyas dimensiones coinciden con los residuos Ser153, His264 (correspondientes a la tríada catalítica) y la mencionada Phe 216. Un estudio más refinado de docking realizado por nuestro grupo años después ha confirmado dicha hipótesis, al verificarse las distancias previstas y las interacciones propuestas (Figura 2B).

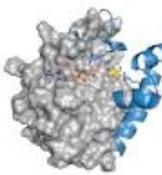
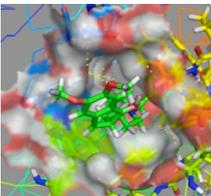
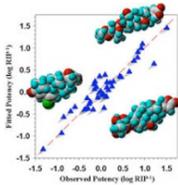
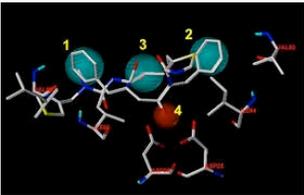
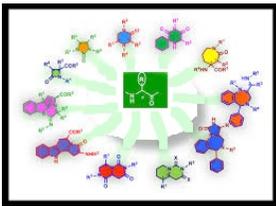
Cuando los fenómenos son demasiado complejos para ser simulados, se usan otros métodos de cálculo, tales como la quimiometría, que es la ciencia de las mediciones realizadas sobre un sistema o proceso químico sobre el estado del sistema por aplicación de métodos matemáticos o estadísticos. Consta de una serie de técnicas heterogéneas, entre las cuales el diseño estadístico de experimentos y análisis estadísticos multivariante son los más importantes para la aplicación en biocatálisis.

Un diseño estadístico experimental permite conocer los factores que tienen mayor impacto sobre los resultados. Usando este método, muchas variables pueden ser estudiadas al mismo tiempo, y utilizando esta información, las condiciones experimentales se pueden mejorar hasta llegar a las condiciones óptimas.

Todos los métodos estadísticos multivariable tienen la capacidad de extraer la información relevante contenida en un sistema complejo descrito por un amplio número de variables (hasta varios miles) y esta información se representa en un espacio de dimensionalidad reducida, haciendo así posible su interpretación. Los métodos estadísticos multivariable están basados en diferentes bases matemáticas. En particular los métodos QSAR usan las propiedades estructurales de las moléculas (generalmente adquiridas por métodos de simulación) como la base de partida para el análisis estadístico, que eventualmente encuentra correlaciones entre la estructura molecular y respuestas medibles experimentalmente.

Debido a su capacidad inherente de simplificar el análisis de sistemas complejos, la quimiometría encuentra una amplia aplicación para el estudio y optimización de procesos industriales.

**Tabla 1A.** Métodos computacionales en diseño de fármacos.

<b>Métodos computacionales en diseño de fármacos</b>			
<b>directos</b>	 <p><b>Modelización</b></p>	 <p><b>Docking</b></p>	$  \begin{array}{ccc}  L + R & \xrightarrow{\Delta G_{int}(L)} & LR \\  \Delta \Delta G_{int}^{\ddagger} \downarrow & & \downarrow \Delta \Delta G_{int}^{\ddagger} \\  L' + R & \xrightarrow{\Delta G_{int}(L')} & L'R  \end{array}  $ <p><b>Binding</b></p>
<b>indirectos</b>	 <p><b>QSAR</b></p>	 <p><b>Farmacóforo</b></p>	 <p><b>Diversidad Molecular</b></p>

**Tabla 1B.** Evolución de las técnicas computacionales en función del conocimiento de la estructura del ligando y el receptor.

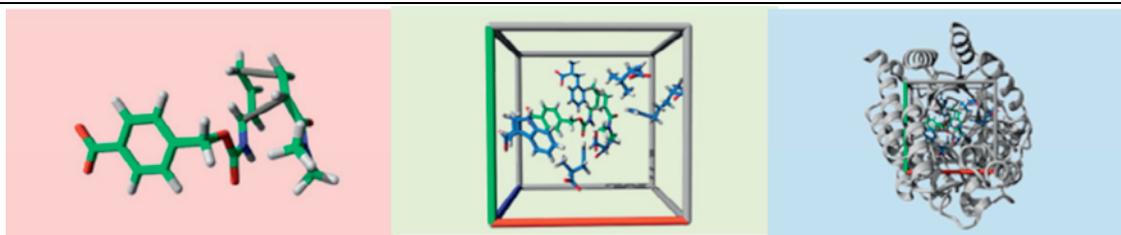
<i>ESTRUCTURA DEL LIGANDO</i>	<i>ESTRUCTURA DEL RECEPTOR</i>	
	<i>CONOCIDA</i>	<i>DESCONOCIDA</i>
<i>CONOCIDA</i>	<b>Interacciones ligando-receptor</b>	<b>Modelos de farmacóforos</b>
	<b>Dinámica Molecular y Técnicas de <i>docking</i></b>	<b>Búsquedas 3D basadas en el ligando/ farmacóforo</b>
<b>QSAR 2D y 3D</b>		
<i>DESCONOCIDA</i>	<b>Diseño <i>de novo</i></b>	<b>Generar estructuras en 3D</b>
	<b>Búsquedas 3D basadas en el diseño</b>	<b>Medidas de Similitud y Diversidad Molecular</b>
		<b>Química Combinatoria</b>

## 2. MODELADO MOLECULAR E INGENIERÍA RACIONAL DE ENZIMAS

Algunos de los logros más relevantes de las técnicas computacionales en Biocatálisis provienen de la ingeniería racional de enzimas. Esta aproximación a la evolución del biocatalizador es a veces vista en competencia con la evolución dirigida. La modelización molecular es muy adecuada para optimizar interacciones enzima-sustrato así como el mecanismo catalítico de la enzima. Sin embargo, el diseño computacional en general es mucho menos eficiente en la identificación de los efectos de las mutaciones que se encuentran alejadas del centro activo: estas mutaciones pueden todavía alterar la estructura de la proteína y modificar el comportamiento del catalizador o

la estabilidad de la enzima. En este contexto, la evolución dirigida puede ofrecer una solución al problema.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la utilización de los métodos de simulación molecular en la inducción de la promiscuidad catalítica de las enzimas, es decir reacciones para las que en principio un ligando no es el sustrato natural de esa enzima. En el ejemplo mostrado en la figura 3 se propone un estado de transición para la reacción deseada, posteriormente se propone un centro activo capaz de estabilizar el estado de transición por métodos de mecánica cuántica y posteriormente se acopla ese centro activo en un andamio adecuado utilizando algoritmos como Rosetta.

**Figura 3.** Modificación de un centro activo para la consecución de la actividad deseada.

## 3. RECONOCIMIENTO ENZIMA-SUSTRATO Y SELECTIVIDAD DE LA ENZIMA

Las técnicas de modelización molecular se han convertido en herramientas de rutina en la descripción de las interacciones enzima-sustrato. Más temas de interés tales como la mejora de la estabilidad de la enzima y la modelización de efecto del disolvente sobre las reacciones biocatalizadas han sido investigadas en una proporción

menor. En el primer caso, esto se debe a que la estabilización de la enzima se consigue más a menudo a través de diferentes rutas (por ejemplo, mediante evolución dirigida).

La mayoría de los estudios computacionales realizados en el campo de la Biocatálisis se concentran en la predicción de la selectividad de la enzima. Esto implica el cálculo de la constante de la selectividad ( $k_{cat}/K_M$ ), que

depende de la energía libre del estado transición de de la reacción. En este sentido, los denominados métodos *ab initio* de la Mecánica Cuántica (QM) son capaces de reproducir los datos experimentales sin emplear parámetros empíricos. Como es lógico al aumentar el número de núcleos y de electrones, es mayor el número de funciones de base precisas para construir los orbitales moleculares (OMs), con las consiguientes dificultades de cálculo que acarrea. En razón de la evaluación completa o no de todas las integrales electrónicas, se puede hablar de métodos *ab initio* y de métodos semiempíricos. El inconveniente principal de la utilización de los métodos *ab initio* es que la complejidad del cálculo restringe sus aplicaciones a dianas químicas a nivel de unas pocas decenas de átomos. Por tanto, la complejidad de un sistema biocatalítico limita drásticamente la posibilidad de aplicar métodos de QM, forzando a la Química Computacional hacia el uso de métodos de Mecánica Molecular Clásica (MM), basados en un conjunto de ecuaciones y parámetros denominados Campos de Fuerza).

La MM considera los átomos de una molécula como un conjunto de masas interaccionando vía fuerzas armónicas o elásticas. Esto permite la simulación de macromoléculas (como las proteínas), pero la naturaleza empírica de los campos de fuerza que deben ser correctamente parametrizados, hace que el tratamiento de cualquier efecto electrónico sea inviable. Se han ajustado empíricamente las ecuaciones y los parámetros para que coincida con los resultados experimentales. A un conjunto de ecuaciones y parámetros se denomina campo de fuerza y la mayoría de programas de modelado molecular pueden elegir entre varios campos de fuerza, como por ejemplo MM2 (o sus posteriores versiones MM3 y MM4) para moléculas pequeñas (4), Amber (5) para las proteínas (mejor opción, puesto que contempla las interacciones electrostáticas de una forma más adecuada) o CHARMM (6).

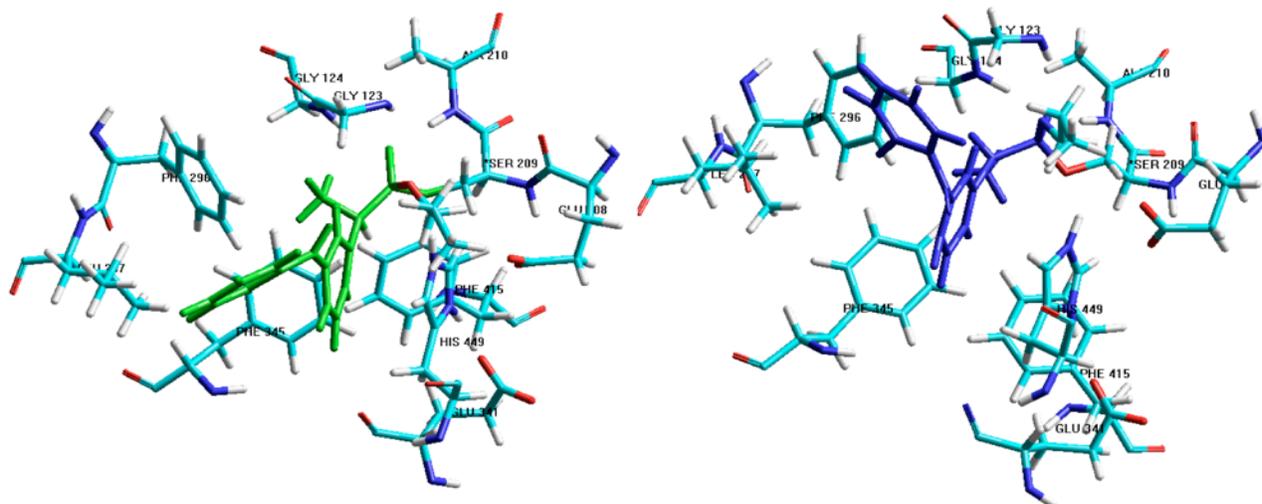
Los métodos mecacuánticos (QM) pueden superar estas limitaciones, ya que se basan en la solución de la ecuación de Schrödinger y aunque este enfoque sigue siendo computacionalmente demasiado caro para ser útil como herramienta de predicción de rutina, el continuo crecimiento del poder computacional se espera que haga más asequible los cálculos de QM.

Una solución intermedia se basaría en la utilización de métodos híbridos de QM-MM, los cuales tratan la parte reactiva relativamente pequeña de los sistemas biocatalíticos a nivel de QM y todo lo demás por MM, ofreciendo una buena alternativa de cálculo.

#### 4. SIMULACIÓN DE ANÁLOGOS DEL ESTADO DE TRANSICIÓN

La cinética de las reacciones biocatalizadas depende de la energía libre de sus estados de transición, en las que las especies químicas no son estables. Sin embargo, los métodos de MM solo pueden usarse cuando las estructuras son estables y además son incapaces de tratar la ruptura y formación de enlaces. La estrategia más común para modelar *in silico*, las interacciones entre las enzimas hidrolíticas y sus sustratos a nivel de la MM es la simulación del intermedio tetraédrico, que es una especie química estable unida covalentemente al residuo catalítico de la proteína y que imita el estado de transición de la reacción.

En la Figura 4 se representa el complejo acil enzima de la lipasa de *Candida rugosa*, y el *R*-y *S*-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa de *C. rugosa*, enantiómero preferentemente reconocido en la hidrólisis estereoselectiva a partir de la mezcla racémica (7). Para la obtención de estos complejos en primer lugar se obtuvieron los conformeros de mínima energía por Mecánica Molecular y posteriormente se realizó una dinámica Molecular.



**Figura 4.** Simulación del complejo tetraédrico acil enzima, entre el *R*-ketoprofeno y el *S*-ketoprofeno.

En el caso del *R*-ketoprofeno, el anillo de benceno mas externo queda hacia fuera del centro activo compuesto por

los aminoácidos Ser209, His449, Glu341, mientras que en el *S*-ketoprofeno el anillo queda mas hacia el interior del

centro activo, y en este caso hay interacciones  $\pi$ -stacking con la Phe-296 y 345, mientras que en el caso del *R*, solo con la Phe-245. Por tanto podemos concluir que la interacción con el *R* es menos favorable ya que los anillos están prácticamente dispuestos perpendicularmente el uno respecto del otro. De esta forma podríamos predecir la selectividad de esta enzima tanto en las reacciones de hidrólisis de sus ésteres como en la reacciones de síntesis de los ácidos correspondientes.

En otros experimentos llevados a cabo por otros grupos se ha visto que mediante la simulación de análogos del estado de transición para la hidrólisis de una serie de diésteres se pudo demostrar que la enantioselectividad es una función de la longitud de la cadena del ácido.

## 5. DESCRIPCIÓN GRID DE LA NATURALEZA DEL CENTRO ACTIVO

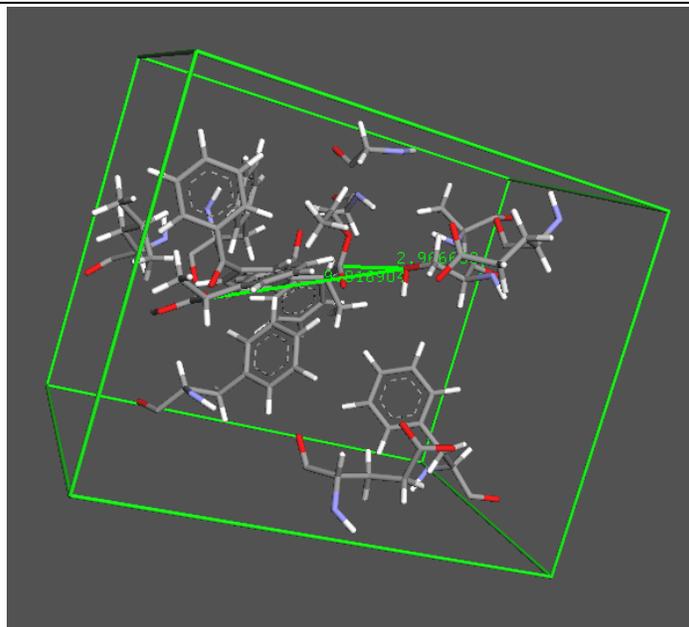
El enfoque GRID que complementa la simulación de análogos del estado de transición permite una descripción más precisa de la interacción enzima-sustrato (8) y fue aplicado en el estudio de la selectividad de la penicilina G amidasa (PGA) (9,10). Además de proporcionar directrices para el acoplamiento de los sustratos en el centro activo de la enzima, la visualización de los campos de interacción molecular (MIF) generados por diferentes sondas (hidrofóbicas, dadores de enlaces- H, aceptores de enlaces-H y grupos cargados) permitió una exploración fácil y rápida de la naturaleza química del centro activo, consiguiendo así un esquema completo de los requerimientos estructurales del sustrato para el reconocimiento óptimo del mismo. Además, el estudio

estableció las normas generales para la enantiodiscriminación ilustrando cómo los enantiómeros tienen diferentes interacciones con dos porciones químicamente distintas del centro activo. Las tasas de acilación determinados experimentalmente fueron utilizadas para validar el modelo, que proporciona sólo una predicción cualitativa. El docking con los ácidos *S* y *R* ketoprofeno confirmó los resultados predichos en el apartado anterior, ya que la energía de interacción fue mas favorable en el caso del *S* y la distancia respecto al residuo catalítico fue menor en el *S*-ketoprofeno que en el *R* (2,96 Å del *S* frente a 9 Å del *R*) como puede apreciarse en la Figura 5.

Aunque en los ejemplos expuestos hasta ahora se alcanzaron buenos resultados en la racionalización de las estrategias experimentales, todos fallan en hacer una predicción cuantitativa de la selectividad enzima, incluso cuando el análisis GRID se combina con aproximaciones al análogo al estado de transición.

Esta limitación se debe a que todos los enfoques descritos se basan en varias aproximaciones significativas (11).

El primer problema se puede achacar a la naturaleza simplificada de los cálculos del campo de fuerza empleado. Por otra parte, el segundo gran problema viene del hecho de que las pequeñas diferencias de energía originan grandes variaciones en la selectividad, que pueden ser enmascaradas por las grandes fluctuaciones causadas por el movimiento normal de las proteínas.

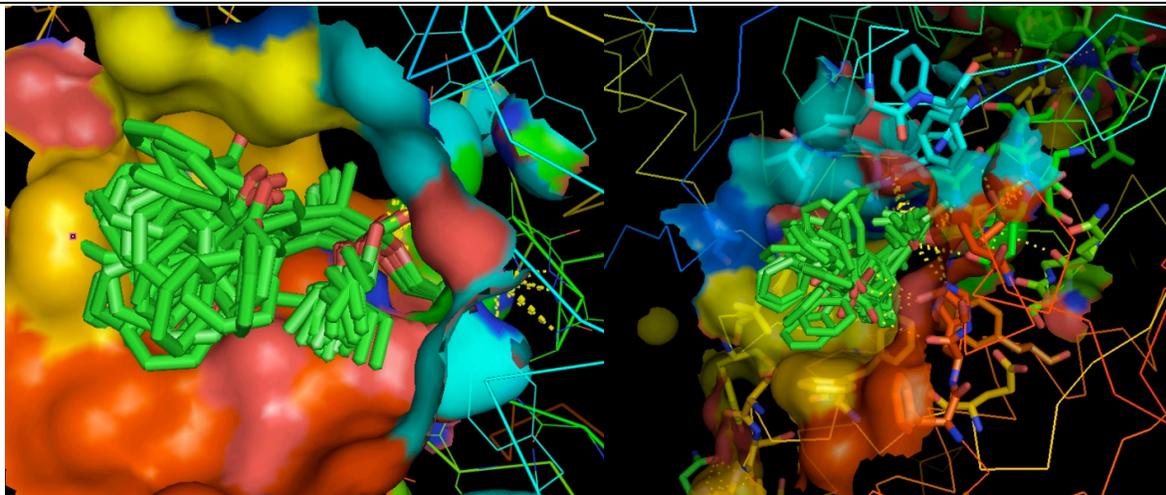


**Figura 5.** Docking automático entre *R*-ketoprofeno y el *S*-ketoprofeno y el centro activo de la lipasa de *Candida rugosa*.

## 6. PREDICCIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA ENZIMA POR MÉTODOS DE MECÁNICA CUÁNTICA Y/O MECÁNICA MOLECULAR

El primer y más clásico estudio sobre la predicción cuantitativa de la diferencia de energía libre entre los dos

intermedios tetraédricos de dos enantiómeros fue descrito por Colombo y cols. (12) en la resolución de una mezcla racémica de 1-feniletanol por acilación catalizada por subtilisina. El enfoque consistió en un modelo con todos los átomos con solvatación explícita completa, energía



**Figura 6.** Superposición de conformeros del *R*- y *S*-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa donde se pone de manifiesto las diferentes orientaciones del sustrato.(Figura original, no publicada).

Los resultados en ese estudio de 1999 probablemente representan la mejor predicción cuantitativa de la enantioselectividad descrita hasta ahora en la bibliografía, pero a pesar de todo, la tasa de error aún puede considerarse como elevada. Sin duda, la principal dificultad a la hora de llevar a cabo una predicción cuantitativa adecuada de la enantioselectividad deriva del hecho de que, aunque se pueda establecer de una forma muy precisa cual es la energía libre del estado de transición del enantiómero preferentemente reconocido dentro del centro activo, el otro enantiómero puede tener diferentes tipos de orientaciones, que implican interacciones con diferentes zonas del centro activo (13-14) como se puede visualizar en la figura adjunta en el estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Figura 6). Esta diferente orientación del *R* y *S*-ketoprofeno en el centro activo de la enzima conlleva una diferente estereoselectividad y que puede predecirse *in silico* cualitativamente y por tanto saber que enantiómero será reconocido preferentemente.

#### 6.1. Correlación entre la selectividad de la enzima y descriptores moleculares

Dado que el cálculo preciso de la energía libre de una reacción biocatalizada sigue siendo una tarea difícil, el desarrollo de las alternativas más simples y directas es un área activa de investigación.

Cabe señalar que para que una herramienta de predicción sea atractiva debe ser competitiva con el tiempo empleado en el laboratorio para realizar un experimento. En general, no hay motivos para esperar dos meses para la predicción de una medida que puede ser realizada experimentalmente en dos semanas (15).

En este sentido, los métodos de MD, FEP, y QM no son probablemente los más apropiados para el desarrollo de modelos de predicción, al menos a la luz de los instrumentos de cálculo comúnmente disponibles.

Como consecuencia, varias estrategias alternativas se han desarrollado, destinadas a simplificar cálculos y evitar el cálculo de la energía del estado de transición de la reacción.

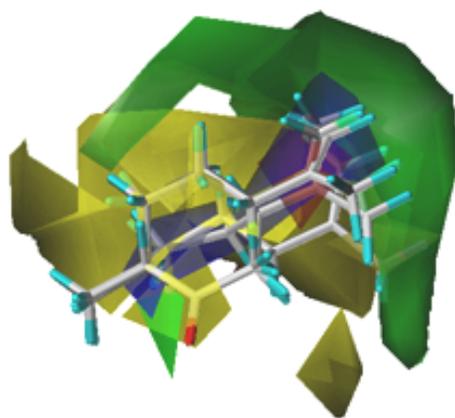
Estas ideas se han aplicado en el estudio de enantioconocimiento de alcoholes terciarios por carboxilesterasas (16). Demostraron cómo una predicción cuantitativa de la enantioselectividad se puede realizar evitando el cálculo de la energía libre del estado de transición.

El análisis geométrico de los intermedios tetraédricos, construido por docking manual y simulaciones de MD, puso de manifiesto la correlación cuantitativa entre la enantioselectividad y un descriptor geométrico único, definido como la distancia entre el nitrógeno de la histidina catalítica y uno de los átomos de oxígeno del sustrato. Aunque la validez de este tipo de descriptores no se puede asumir como general, la identificación de correlaciones similares en diferentes sistemas biocatalíticos representa una ruta original y sencilla para la predicción de la enantioselectividad en un plazo razonable de tiempo.

#### 7. QSAR 3D PARA LA PREDICCIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD

Los métodos QSAR 3D (relaciones cuantitativas estructura-actividad en tres dimensiones) utilizan los datos provenientes de simulaciones moleculares como entrada para el análisis estadístico multivariante y representan la fusión entre el Modelado Molecular y la Quimiometría. Aunque el uso de QSAR 3D está bien establecido en el diseño de fármacos, la aplicación de estos métodos en Biocatálisis se ha llevado a cabo no hace muchos años. Los trabajos pioneros de Tomić y cols (17-19) representan un ejemplo de cómo las predicciones cuantitativas de  $k_{cat} / K_M$  son viables a través de un enfoque QSAR 3D, que correlaciona los descriptores sistema químico con los datos

experimentalmente medibles. La predicción cuantitativa de la enantioselectividad de la lipasa de *Bulkholderia cepacia* se logró mediante el desarrollo de un método en el que la energía libre de unión se calcula de manera aproximada a través de una combinación lineal de la energía de interacción del complejo enzima-sustrato y la superficie polar y no polar accesible al disolvente. El peso de cada parámetro se calculó por análisis PLS, y el alto coeficiente de correlación de predicción ( $Q_2 = 0,84$ ) confirma la validez de la aproximación (18). Por otra parte, el QSAR 3D también puede emplearse en Biocatálisis en sistemas en los cuales no se conoce la estructura tridimensional del biocatalizador, mediante el empleo de estudios CoMFA (acrónimo de Comparative Molecular Field Analysis). Aplicando esta metodología, se pudo predecir la estructura del sustrato modelo en la biorreducción de diferentes cetonas empleando células enteras de *G. candidum* y *S. octosporus*, representados en la Figura 7. El código de colores es el que sigue: i) *Zonas de bajo impedimento estérico* (verde). Son zonas donde la presencia de restos químicos del sustrato favorece la interacción enzima-sustrato. ii) *Zonas de alto impedimento estérico* (amarillo). Son zonas donde la presencia de grupos en el sustrato disminuye la afinidad de la ADH por el sustrato. iii) *Zonas electrostáticas*: rojas, donde una elevada densidad electrónica favorece la interacción y azules donde una elevada densidad de carga negativa desfavorece la interacción. La principal ventaja de esta metodología para modelar el centro activo de una enzima desconocida es que permite predecir, sin siquiera haberla aislado (20).



**Figura 7.** Aplicación del método COMFA para la predicción de las zonas de reconocimiento de la enzima utilizando diferentes sustratos.

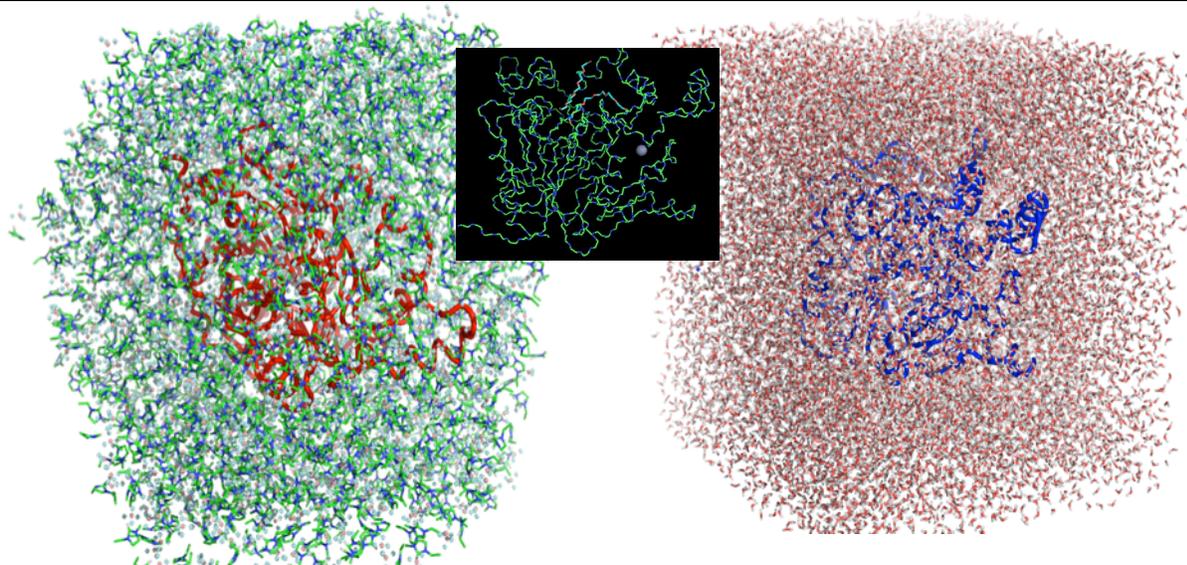
## 8. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISOLVENTES

El efecto de la solvatación debe ser estudiado ya que el Modelado Molecular debe intentar interpretar y predecir resultados experimentales y los procesos biocatalíticos se llevan a cabo en presencia de disolventes.

Inicialmente, la mayoría de los cálculos de modelado incluyen las moléculas de agua que se encuentran en la estructura de cristal, pero no las moléculas de agua adicionales del disolvente, cuyo efecto generalmente se

simula utilizando un parámetro dieléctrico dependiente para intentar imitar la solvatación. Ke y cols. (21) utilizaron un método mejorado para simular el agua disolvente, un modelo electrostático continuo, pero los resultados fueron similares a los obtenidos del modelo más simple. Este tratamiento incompleto de solvatación es claramente una aproximación. Está claro que el disolvente puede cambiar la selectividad de la enzima, aunque existe aún desacuerdo sobre por qué esto ocurre.

Una de las posibles explicaciones propuesta atribuye la capacidad de estereodiscriminación a la diferente solvatación de los complejos diastereoisoméricos enzima-sustrato. En este sentido, Ke y Klivanov (22) estudiaron la enantioselectividad de la  $\alpha$ -quimotripsina en la acilación de un diol proquiral, encontrando que el estado de transición que conducía hacia la acilación en el hidroxilo *pro-R* colocaba un resto de 3,5-dimetoxifenilo en un bolsillo de la enzima, mientras que el estado de transición conducente a la acilación en el hidroxilo *pro-S* dejaba este resto arilo expuesto hacia disolvente. La propuesta de estos autores correlacionaba la enantioselectividad observada con los coeficientes de actividad termodinámica de la zona aromática expuesta, no como una predicción cuantitativa, sino una correlación directa en el sentido de mejor solvatación de partes expuestas, mayor enantioselectividad. Sin embargo, este método no pudo ser extrapolado a otros sustratos. La capacidad de ciertas enzimas para trabajar de manera eficiente en medios no acuosos (disolventes orgánicos, líquidos iónicos o fluidos supercríticos) es ampliamente conocida. Las lipasas son enzimas especialmente interesantes, dado su excepcional actividad en disolventes orgánicos, por lo que el estudio mediante Modelado Molecular de su comportamiento en dichos medios constituye un campo de trabajo muy habitual. Una aplicación interesante la constituyen las enzimas termoresistentes. En este caso cuando se utilizan para trabajar en líquidos iónicos, debido a la naturaleza de estos disolventes pueden resistir temperaturas de hasta 393 K, muy por encima de su temperatura de estabilidad (23). Nuestro grupo ha demostrado recientemente al estudiar mediante dinámica molecular el comportamiento de estas enzimas, concretamente con lipasa de *Bacillus thermocateuolatus* en el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio, que la energía necesaria para romper un puente de hidrógeno es el doble en el caso del líquido iónico respecto del agua. (Figura 8). La estabilidad en disolvente iónico a alta temperatura se justifica parcialmente por la alta energía necesaria para la ruptura de los puentes de hidrógeno disolvente-proteína, aunque efectos hidrofóbicos podrían contribuir muy significativamente a la estabilidad. Para realizar este experimento ha sido necesaria la construcción de una caja de moléculas de líquido iónico para realizar la dinámica molecular tal y como se ve en la figura 8A, así como una caja de moléculas de agua, figura 8B. La temperatura de simulación fue de 363 K (24).



**Figura 8.** Caja de moléculas de disolvente en la lipasa de *Bacillus thermocatenuatus*. Líquido iónico (A), agua (B).

## 9. MODELADO MOLECULAR PARA LA EXPLICACIÓN RACIONAL DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

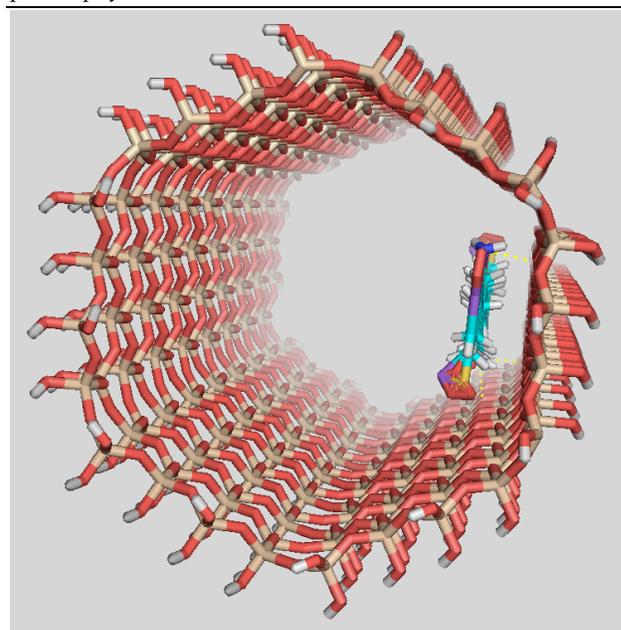
El conocimiento adquirido en estos años en Modelado Molecular nos ha servido para acometer esta nueva línea de investigación de la que a continuación exponemos algunos resultados. El diseño de vehículos eficaces para la liberación local controlada de fármacos activos contra las infecciones del hueso es un tema de gran interés.

Aplicado a los materiales mesoporosos ordenados basados en sílice y con el software apropiado, se puede construir la estructura de un material mesoporoso, como por ejemplo el MCM-48 y el SBA-15 (25,26), MCM-41 (25), entre otros, en una representación tridimensional y calcular la energía de la estructura a considerar, en base a cálculos mecanocuánticos de los potenciales electrostáticos, que describen la interacción entre los átomos en el material. En la Figura 9, se muestra un ejemplo del modelo SBA.15 construido por nuestro grupo. Este hecho facilita las cosas, porque no hay bastante información experimental para determinar la estructura de ese material que se quiere estudiar. Sin embargo, la potencia de cálculo informático de los modelos teóricos sí que proporcionan la información necesaria para comprender estos procesos y es por ello, por lo que deben de ser herramientas esenciales para el químico experimental en general, y para el estudio de los materiales mesoporosos ordenados en particular.

Pero eso no es todo, los modelos teóricos permiten determinar también las interacciones que se producen entre la matriz y la droga, dentro del poro o fuera de él, en especial las de las fuerzas electrostáticas.

Como ejemplo (Figura 10), la vancomicina es un antibiótico glicopeptídico para uso parenteral obtenido de la *Nocardia orientalis*. Es eficaz solo contra bacterias gram-positivas. La vancomicina se absorbe bastante mal por vía oral lo que hace de él un candidato idóneo para

retenerlo en este tipo de matrices (26) y tratar infecciones por *Staphylococcus aureus*.



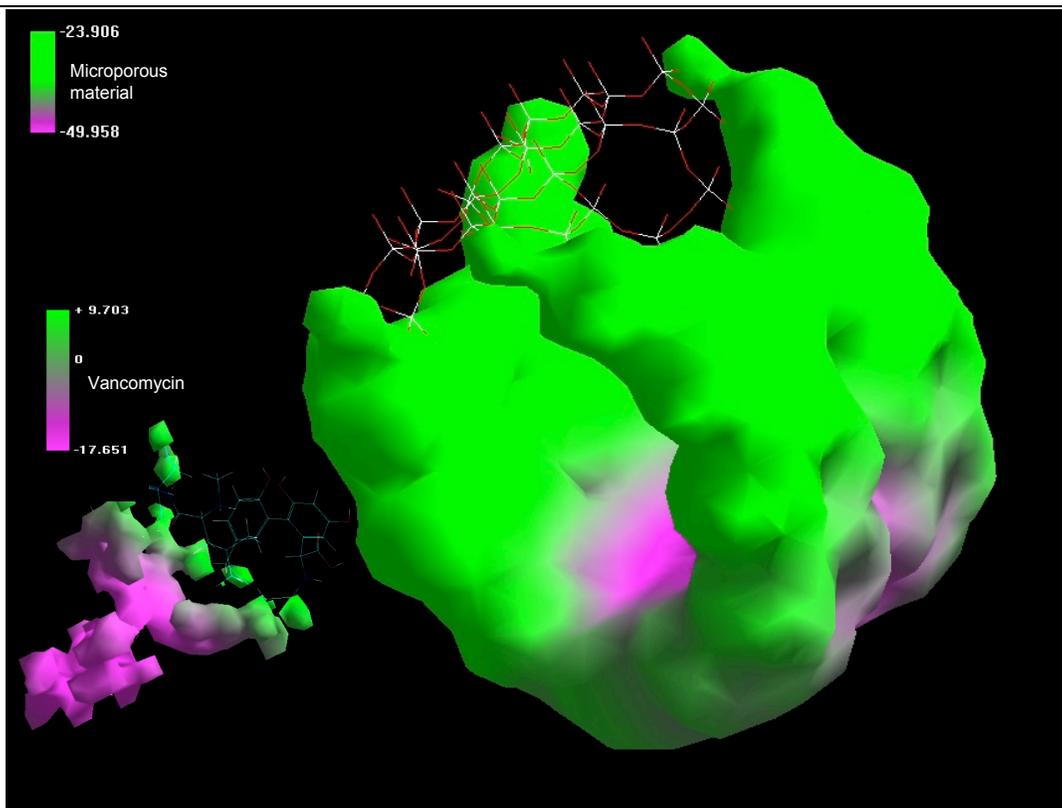
**Figura 9.** Representación del modelo tridimensional de SBA-15 con la molécula de Chicago SkyBlue acoplada en su interior.

Uno de los descriptores más útiles en modelización molecular es la energía de interacción de una molécula con un grupo químico determinado evaluada en puntos del espacio alrededor de la molécula estudiada lo que nos permite calcular valores de energía potencial de interacción.

Los potenciales de interacción molecular se pueden utilizar para predecir reacciones, sectores de la molécula que actúan como receptores de un medicamento, y la interacción enzima-sustrato, gracias a que los potenciales electrónicos de las dos especies moleculares de una reacción pueden “verse” uno a otro y posteriormente

“percibirse” por medio del acercamiento y anclaje de las especies químicas. Así, estas superficies son usadas ampliamente para interpretar y predecir el comportamiento reactivo de una variedad de sistemas químicos en reacciones nucleofílicas o electrofílicas. Los MEPS

también permiten el estudio de procesos biológicos y las interacciones de enlaces o puentes de hidrógeno; son consideradas como una herramienta muy útil en el estudio de la reactividad molecular.

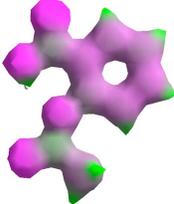
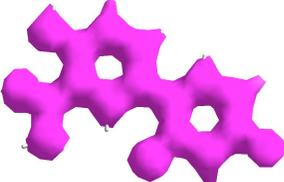
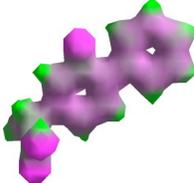
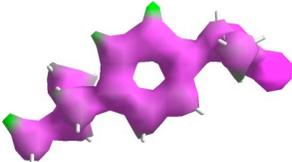
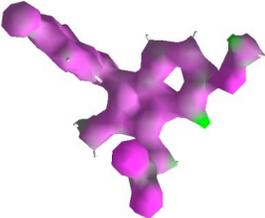
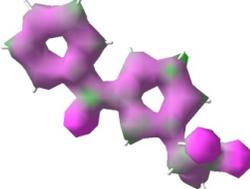


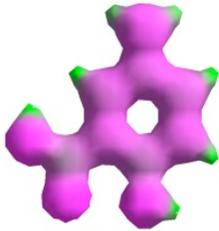
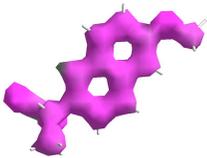
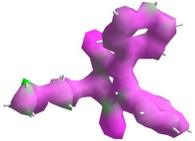
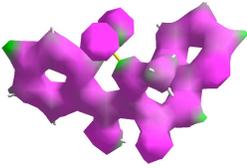
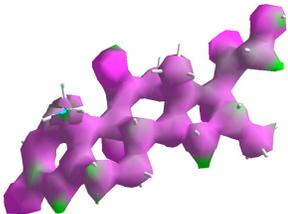
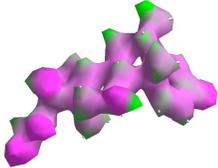
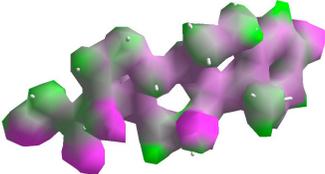
**Figura 10.** Potenciales electrostáticos de la vancomicina y el material mesoporoso SBA-15.

Los estudios cinéticos encontrados en la bibliografía mostraban una liberación del fármaco cuando se utilizaba como matriz el SBA-15. No obstante los estudios de potencial electrostático realizados sobre el material mesoporoso y la vancomicina mostraron la baja compatibilidad entre los potenciales electrostáticos del modelo de sílice puro y la molécula de vancomicina, ya que ambos son esencialmente negativos por lo que pudimos demostrar que la vancomicina no podía penetrar en el material mesoporoso (26). Basándonos en esta idea y en un trabajo previo (130), nuestro grupo de trabajo ha

realizado un estudio de los potenciales electrostáticos de interacción molecular de los fármacos más comúnmente utilizados en el tratamiento de las diferentes patologías, las matrices utilizadas en liberación controlada así como los potenciales electrostáticos determinados mediante aplicación de distintas técnicas computacionales (Tabla 2). De esta forma en función del fármaco utilizado podría predecirse *a priori* si éste entraría o no en la matriz mesoporosa. A modo de ejemplo presentamos algunos de los fármacos estudiados.

Tabla 2. Modelos de fármacos y matrices mesoporosas ordenadas en sílice (SMMs) como sistemas de liberación de fármacos, acción farmacológica y el diagrama en 3D del potencial electrostático molecular.

Categoría	Modelos Fármaco –SMM	Estructuras Moleculares	Referencia
<b>Anti-inflamatorios no-esteroidicos</b>	<b>Aspirina (Acido acetilsalicilico)</b> Fibrinolítico Antipiretico Inhibidor Ciclooxygenasa <b>Matrices:</b> MCM-41, MCM-41-AI, MCM-41-APTES, SBA-15		(30-33)
	<b>Diflunisal</b> Derivado acido Saliclico Analgesico <b>Matriz:</b> MCM-41-AI		(34)
	<b>Fluribuprofeno</b> Analgésico no-narcótico Inhibidor Ciclooxygenasa <b>Matriz:</b> FSM-16		(35)
	<b>Ibuprofeno</b> Analgésico no-narcótico Inhibidor Ciclooxygenasa <b>Matrices:</b> MCM-41, MCM-41-NH <sub>2</sub> , MCM-48, LP-Ia3d, FDU-5, SBA-15, TDU-1, MCM-41-HMDS, MCM-41-AEPTMS, MCM-41-APTES, MCM-41-DMS, MCM-41-TMS, Ti-SBA-15, SBA-15-GA		(27, 36-48)
	<b>Indometacina</b> Inhibidor Ciclooxygenasa Cardiovascular Tocolitico supresor gota <b>Matrices:</b> MCM-41, SBA-15, SBA-16		(28,29, 49-50)
	<b>Ketoprofeno</b> Analgésico Antipirético Inhibidor ciclooxygenasa <b>Matriz:</b> SBA-15-APTES		(51)

	<p><b>Mesalazina</b> Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal Tratamiento colitis Ulcerosa <b>Matrices:</b> MCM-41, MCM-41-NH<sub>2</sub>, MCM-41-COOH</p>		(52)
	<p><b>Naproxeno</b> Analgesico Antipiretico <b>Matriz:</b> MCM-41</p>		(53)
	<p><b>Fenilbutazona</b> Analgesico Antipiretico <b>Matriz:</b> SBA-15</p>		(28)
	<p><b>Piroxicam</b> Tipo de Oxicam para Tratamiento Artritis Inhibidor ciclooxigenasa <b>Matrices:</b> MCM-41, SBA-15</p>		(54, 55)
<b>Anti-inflamatorios esteroideos</b>	<p><b>Dexametasona</b> Glucocorticoide Antineoplasico Antiemetico <b>Matrices:</b> SBA-15, MCM-41</p>		(56)
	<p><b>Metilprednisolona</b> Glucocorticoide Antineoplasico <b>Matrices:</b> SBA-15, SBA-16, MCM-41, FDU-12</p>		57)
	<p><b>Prednisolona</b> Glucocorticoide Antineoplasico <b>Matrices:</b> SBA-15, SBA-3, FDU-12</p>		(58)

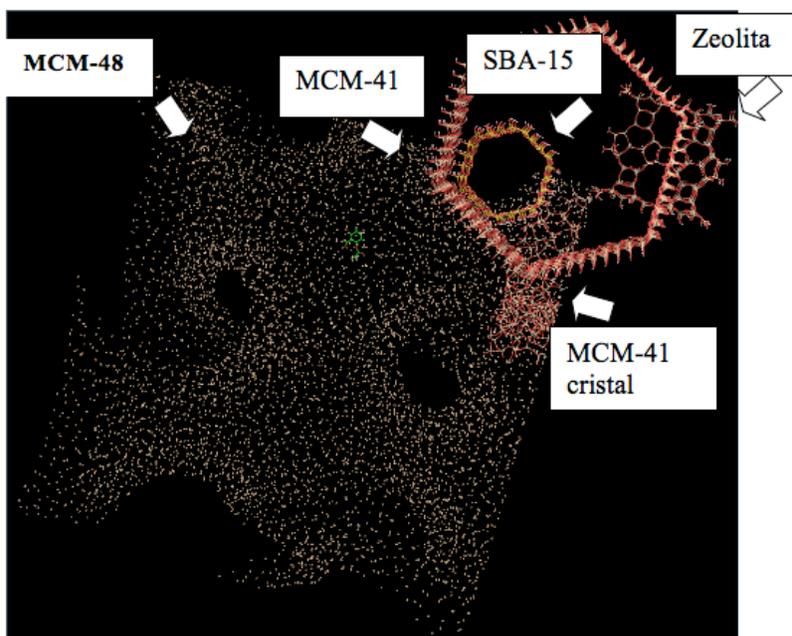
Un nuevo enfoque, aún no explorado, sería la utilización de la técnica de docking molecular para evaluar las interacciones existentes entre los distintos fármacos y la matrices mesoporosas. De esta manera, se podría predecir sin dificultad, antes de la fase experimental, si un fármaco será o no retenido por una determinada matriz. Esto, ahorra

tiempo y dinero.

En esta técnica se consideran las moléculas como ligandos flexibles y se describen como elementos de torsión y redes construidas sobre el sitio activo de la matriz. Experimentalmente, *in silico*, el grupo de átomos enlazados que no tienen enlaces rotacionales se ubican en

un punto del sitio seleccionado (diana), para el cual los valores de rotación son energéticamente más estables y diversos. De esta manera, estos valores de energía pueden ser obtenidos y clasificados al final del cálculo de acuerdo a la cantidad de energía. Y eso es lo que hemos hecho recientemente (59) y cuyos resultados –inéditos- y

preparados exclusivamente para este trabajo, se muestran en la Tabla 3. En esta tabla, se describen las energías de interacción entre las diferentes matrices mesoporosas (Figura 11) y los diferentes fármacos estudiados.



**Figura 11.** Modelos representativos de las estructuras MCM-41 con un fármaco acoplado (ibuprofeno), MCM-41 cristal, MCM 48, SBA 15 y zeolita, donde se pueden apreciar los tamaños relativos).

**Tabla 3. Energías de interacción obtenidas mediante docking molecular entre los fármacos y las diferentes matrices**

Compuesto	E(Kcal/mol) SBA-15	Zeolita	E(Kcal/mol) MCM41	E(Kcal/mol) ) MCM41cristal	E(Kcal/mol) ) MCM48
<b>aspirina</b>	-3.82	-4.08	-3.84	-4.15	-3.61
<b>dexametasona</b>	-4.58	-5.24	-4.66	-4.58	-4.18
<b>diflunisal</b>	-4.04	-4.37	-4.09	-4.15	-3.80
<b>flurbiprofeno</b>	-3.97	-4.39	-4.03	-3.93	-3.71
<b>ibuprofeno</b>	-3.86	-4.30	-3.9	-3.91	-3.59
<b>indometacina</b>	-4.08	-4.59	-4.15	-4.10	-3.77
<b>ketoprofeno</b>	-3.9	-4.31	-3.94	-4.00	-3.64
<b>mesalazina</b>	-4.03	-4.21	-4.05	-4.28	-3.85
<b>metilprednisolona</b>	-3.85	-4.39	-3.93	-3.93	-3.38
<b>naproxeno</b>	-4.0	-4.32	-4.06	-4.02	-3.73
<b>fenilbutazona</b>	-3.92	-4.43	-3.96	-3.89	-3.59
<b>piroxicam</b>	-4.22	-4.63	-4.25	-4.31	-3.92
<b>prednisolona</b>	-4.45	-5.15	-4.62	-4.59	-4.17

**10. REFERENCIAS**

1. Agis-Torres A, Söllhuber M, Fernández M, Sánchez-Montero JM. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology* 2014;12:2-36.
2. Muñoz Solano D, Sánchez-Montero JM. Diseño, síntesis y evaluación de la actividad biológica de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa. Tesina de licenciatura. Madrid: UCM, 2011.
3. Borreguero I, Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV, Rumbero A, Hermoso JA, Alcántara AR. Regioselective resolution of 1,n-diols catalysed by lipases: a rational explanation of the enzymatic selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001;11:1013-24.
4. Nevins N Allinger NL. Molecular mechanics (MM4) vibrational frequency calculations for alkenes and conjugated hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry* 1996;17:730-46.
5. Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* 2005;26:1668-88.
6. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM - A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* 1983;4:187-217.
7. Sanchez-Montero JM. Modelado molecular como herramienta en el diseño racional de fármacos. Mesa Redonda sobre innovación farmacéutica. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 2009.
8. Goodford, PJ. A computational-procedure for determining energetically favorable binding-sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* 1985;28:849-57.
9. Basso A, Braiuca P, Ebert C, Gardossi L, Linda P, Benedetti F. GRID/tetrahedral intermediate computational approach to the study of selectivity of penicillin G acylase in amide bond synthesis, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics* 2002;1601:85-92.
10. Basso A, Braiuca P, Clementi S, Ebert C, Gardossi L, Linda P. Computational analysis of the aminic subsite of PGA explains the influence of amine structure on enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2002;19-20:423-30.
11. Kazlauskas RJ. Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4:81-8.
12. Colombo G, Toba S, Merz KM. Rationalization of the enantioselectivity of subtilisin in DMF. *J Am Chem Soc* 1999;121:3486-93.
13. Kazlauskas R. Modeling: A tool for experimentalists, *Science* 2001;293:2277-9.
14. Park JH, Ha HJ, Lee WK, Génereux-Vincent T, Kazlauskas RJ. Molecular Basis for the Stereoselective Ammoniolysis of N-Alkyl Aziridine-2-Carboxylates Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Chembiochem* 2009;10:2213-22.
15. Braiuca P, Ebert C, Basso A, Linda P, Gardossi L. Computational methods to rationalize experimental strategies in biocatalysis. *Trends Biotechnol* 2006;24: 419-25.
16. Henke E, Bornscheuer UT, Schmid RD, Pleiss J. A molecular mechanism of enantiorecognition of tertiary alcohols by carboxylesterases. *Chembiochem* 2003;4: 485-93.
17. Tomic S, Dobovicnik V, Sunjic V, Kojic-Prodic B. Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase towards 2-methyl-3(or 4)-arylalkanols: An approach based on the stereoelectronic theory and molecular modeling. *Croat Chem Acta* 2001;74: 343-57.
18. Tomic S, Kojic-Prodic B. A quantitative model for predicting enzyme enantio selectivity: application to *Burkholderia cepacia* lipase and 3-(aryloxy)-1,2-propanediol derivatives. *J Mol Graph Model* 2002;21: 241-52.
19. Tomic S, Bertosa B, Kojic-Prodic B, Kolosvary I. Stereoselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase towards secondary alcohols: molecular modelling and 3D QSAR approach. *Tetrahedron-Asymmetr* 2004;15:1163-72.
20. Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV. Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. *An R Acad Nac Farm* 2007;73:1199-1236.
21. Ke T, Tidor B, Klibanov, AM. Molecular-modeling calculations of enzymatic enantioselectivity taking hydration into account. *Biotechnol Bioeng* 1998;57: 741-5.
22. Ke T, Klibanov AM. Insights into the solvent dependence of chymotryptic prochiral selectivity. *J Am Chem Soc* 1998;120:4259-63.
23. Ramos Martín J, Nus M, Sinisterra Gago JV, Sánchez-Montero JM. Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids at hightemperatures using a thermostable lipase of *Bacillus thermocatenolatus*: A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2008;52-53:162-7.
24. Sánchez-Montero JM, Alcántara AR. Aplicaciones del modelado molecular a la biocatálisis. Libro de Texto de la Universidad Nacional de Quilmes, Argentina 2011.
25. Doadrio AL, Sánchez-Montero JM, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M. A molecular model to explain the controlled release from SBA-15 functionalized with APTES. *Microporous and Mesoporous Materials* 2014;195:43-9.
26. Doadrio JC, Doadrio AL, Sánchez-Montero JM, Salinas AJ, Vallet-Regí M. A rational explanation of the vancomycin release from SBA-15 and its derivative by molecular modelling. *Microporous and*

- Mesoporous Materials 2010;132:559-66
27. Doadrio JC, Sousa, EMB, Izquierdo-Barba I, Doadrio AL, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M. Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern. *J Mater Chem* 2006;16:462-6.
  28. Van Speybroeck M, Barillaro V, Thi TD, et al. Ordered mesoporous silica material SBA-15: A broad-spectrum formulation platform for poorly soluble drugs. *J Pharm Sci* 2009;98:2648-58.
  29. Van Speybroeck M, Mellaerts R, Thao DT, et al. Preventing release in the acidic environment of the stomach via occlusion in ordered mesoporous silica enhances the absorption of poorly soluble weakly acidic drugs. *J Pharm Sci* 2011;100:4864-76.
  30. Zeng W, Qian XF, Zhang YB, Yin J, Zhu ZK. Organic modified mesoporous MCM-41 through solvothermal process as drug delivery system. *Mater Res Bull* 2005;40:766-72.
  31. Datt A, El-Maazawi I, Larsen SC. Aspirin loading and release from MCM-41 functionalized with aminopropyl groups via co-condensation or postsynthesis modification methods. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 2012;116:18358-66.
  32. Huang S, Li C, Cheng Z, et al. Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> mesoporous silica composites for drug delivery and bioadsorption. *J Colloid Interface Sci* 2012;376:312-21.
  33. Gao L, Sun J, Yuzhen L. Functionalized bimodal mesoporous silicas as carriers for controlled aspirin delivery. *J Solid State Chem* 2011;184:1909-14.
  34. Cavallaro G, Pierro P, Palumbo FS, Testa F, Pasqua L, Aiello R. Drug delivery devices based on mesoporous silicate. *Drug Deliv* 2004;11:41-6.
  35. Tozuka Y, Arpansiree W, Kyoko K, Kunikazu M, Shigeo Y, Keiji Y. Effect of pore size of FSM-16 on the entrapment of flurbiprofen in mesoporous structures. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2005;53:974-7.
  36. Vallet-Regí M, Ramila A, del Real RP, Pérez-Pariente J. A new property of MCM-41: drug delivery system. *Chem Mater* 2001;13:308-11.
  37. Heikkila T, Salonen J, Tuura J, et al. Mesoporous silica material TUD-1 as a drug delivery system. *Int J Pharm* 2007;331:133-8.
  38. Muñoz B, Ramila A, Pérez-Pariente J, Diaz I, Vallet-Regí M. MCM-41 organic modification as drug delivery rate regulator. *Chem Mater* 2003;15:500-3.
  39. Song SW, Hidajat K, Kawi, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. *Langmuir* 2005;21:9568-75.
  40. Tang QL, Xu Y, Wu D, Sun YH. Hydrophobicity-controlled drug delivery system from organic modified mesoporous silica. *Chem Lett* 2006;35:474-5.
  41. Tang QL, Xu Y, Wu D, et al. Studies on a new carrier of trimethylsilyl-modified mesoporous material for controlled drug delivery. *J Control Release* 2006;114:41-6.
  42. Gao L, Sun J, Zhang L, Wang J, Ren B. Influence of different structured channels of mesoporous silicate on the controlled ibuprofen delivery. *Mater Chem Phys* 2012;135:786-97.
  43. Wan, MM, Sun XD, Li S, Ma J, Zhu JH. Versatile drug releaser derived from the Ti-substituted mesoporous silica SBA-15. *Microporous Mesoporous Mater* 2014;199:40-9.
  44. Brás IR, Fonseca M, Dionisio M, Schönhals A, Affouard F, Correia NT. Influence of nanoscale confinement on the molecular mobility of ibuprofen. *J Phys Chem C* 2014;118:13857-68.
  45. Shena S, Nga W, Chiaa L, Hua J, Tan-Reginald BH. Physical state and dissolution of ibuprofen formulated by co-spray drying with mesoporous silica: Effect of pore and particle size. *J Phys Chem* 2011;115:23790-6.
  46. Szegedi A, Popova M, Goshev I, Klebert S, Mihaly J. Controlled drug release on amine functionalized spherical MCM-41. *J Solid State Chem* 2012;194:257-63.
  47. Vallet-Regí M. Bio-ceramics with clinical applications. India: Wiley 2014.
  48. Rehman F, Volpe P, Airoidi C. The applicability of ordered mesoporous SBA-15 and its hydrophobic glutaraldehyde-bridge derivative to improve ibuprofen-loading in realising system. *Colloids Surf B* 2014;119:82-9.
  49. Hu Y, Wang J, Zhi Z, Jiang T, Wang S. Facile synthesis of 3D cubic mesoporous silica microspheres with a controllable pore size and their application for improved delivery of a water-insoluble drug. *J Colloid Interface Sci* 2011;363:410-7.
  50. Murzin DY, Heikkila T. Modeling of drug dissolution kinetics with sigmoidal behavior from ordered mesoporous silica. *Chem Eng Commun* 2014;201:579-92.
  51. Moritz M, Laniecki M. SBA-15 mesoporous material modified with APTES as the carrier for 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid. *Appl Surf Sci* 2012;258:7523-9.
  52. Popova M, Szegedi A, Yoncheva K, et al. New method for preparation of delivery systems of poorly soluble drugs on the basis of functionalized mesoporous MCM-41 nanoparticles. *Microporous Mesoporous Mater* 2014;198:247-55.
  53. Carriazo D, del Arco M, Martín C, Ramos C, Rives V. Influence of the inorganic matrix nature on the sustained release of naproxen. *Microporous Mesoporous Mater* 2010;130:229-38.
  54. Ambrogi V, Perioli L, Marmottini F, Giovagnoli S, Esposito M, Rossi C. Improvement of dissolution rate of piroxicam by inclusion into MCM-41 mesoporous silicate. *Eur J Pharm Sci* 2007;32:216-22.

55. Fu T, Guo L, Le K, Wang T, Lu J. Template occluded SBA-15: an effective dissolution enhancer for poorly water-soluble drug. *Appl Surf Sci* 2010;256:6963-8.
56. De Matos MBC, Piedade AP, Álvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Braga ME, de Sousa HC. Dexamethasone-loaded poly (epsilon-caprolactone)/silica nanoparticles composites prepared by supercritical CO<sub>2</sub> foaming/mixing and deposition. *Int J Pharm* 2013;456:269-81.
57. García-Muñoz RA, Morales V, Linares M, González PE, Sanz R, Serrano DP. Influence of the structural and textural properties of ordered mesoporous materials and hierarchical zeolitic supports on the controlled release of methylprednisolone hemisuccinate. *J Mater Chem B Mater Biol Med* 2014;2:7996-8004.
58. Martín A, García RA, Sen Karaman D, Rosenholm JM. Polyethyleneimine-functionalized large pore ordered silica materials for poorly water-soluble drug delivery. *J Mater Sci* 2014;49:1437-47.
59. Doadrio AL, Salinas A, Sánchez-Montero JM, Vallet-Regí M. Drug release from ordered mesoporous silicas. *Current Pharmaceutical Design* 2015;21:6189-213.