

Elucidación del sitio de reacción de calyxaminas A y B en la acetilcolinesterasa y diseño de un fármaco derivado de calyxaminas A y B potencialmente activo contra Alzheimer, por medio de nanotecnología computacional.

Carrascoza F., Vargas R., Cobar O.
Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Universidad de San Carlos de Guatemala

*Premio a la Investigación destacada del área científica tecnológica y de la salud 2010.
Dirección General de Investigación

Resumen

El objetivo de este trabajo fue diseñar un potencial nuevo fármaco inhibidor de la enzima Acetilcolinesterasa, tomando como base para su diseño, las propiedades farmacofóricas de Calyxaminas A y B y su sitio de enlace a la Acetilcolinesterasa, utilizando la innovadora técnica de Nanotecnología Computacional. Para ello, se utilizaron programas computacionales de última generación, que apoyan actualmente las investigaciones nanotecnológicas y bioinformáticas a nivel mundial como SYBYL[®], Autodock, Gaussian[®], VMD, UCFS Chimera[®] y otros.

Se elucidó el sitio de enlace de Calyxaminas A y B con la Acetilcolinesterasa y en base a este complejo construido virtualmente, se diseñaron miles de derivados que fueron completamente evaluados. Se analizó detalladamente las interacciones entre los farmacóforos de Calyxaminas y sus derivados, con los residuos de aminoácidos en el sitio activo de Acetilcolinesterasa para seleccionar un candidato líder. Al final de esta investigación se obtuvo un potencial fármaco como candidato líder con una afinidad de enlace mayor de la que poseen Calyxaminas A y B con la Acetilcolinesterasa.

Adicionalmente se determinó con exactitud cuál es el sitio en la enzima en el que se enlazan Calyxaminas A y B y sus derivados.

El impacto de esta investigación en la rama de la salud, es el aporte que representa para Guatemala la búsqueda de nuevos fármacos, que potencialmente puedan convertirse en líderes en el mercado, utilizando la técnica del diseño inteligente de medicamentos que ofrece la Nanotecnología Computacional. Como valor agregado, se espera que trabajos de esta naturaleza, impulsen el desarrollo de la investigación científica en Guatemala para afrontar los retos del nuevo milenio.

El uso de Nanotecnología Computacional en el diseño de fármacos, es de un costo sumamente bajo en comparación con los costos actuales de las metodologías tradicionales en el diseño de drogas, lo cual implica que Guatemala tiene a su alcance la posibilidad de diseñar fármacos novedosos que sean alternativas de solución a problemas de salud específicos de nuestra región.

En cuanto al desarrollo de fármacos contra la Enfermedad de Alzheimer, esta alternativa ofrece la ventaja obtener uno o más candidatos líderes, al diseñar, elucidando "*in silico*" el sitio activo de la enzima que se quiere inhibir y su interacción directa con el potencial fármaco, (no a manera de prueba y error como hasta ahora se realiza y que representa millones de dólares para obtener un candidato líder). El producto de esta investigación (candidato líder y probable fármaco contra la Enfermedad de Alzheimer) puede llegar a convertirse en un futuro en un mejor tratamiento para esta enfermedad que actualmente alcanza a 17,000 personas en Guatemala (Asociación Guatemalteca contra el Alzheimer, 2007) y de impacto económico comercial a escala mundial en el tratamiento de una de las enfermedades más comunes de la tercera edad (Alzheimer's Disease Internacional, 2009).

Palabras claves: Nanotecnología Computacional, Calyxaminas, docking, Diseño inteligente de drogas, Acetilcolinesterasa, Propiedades Farmacofóricas.

Elucidation of the reaction site of Calyxamines A and B in Acetylcholinesterase and design of a drug derived from Calyxamines A and B, potentially active against Alzheimer's Disease through computational nanotechnology.

Abstract

The aim of this work was to design a new compound that successfully inhibits Acetylcholinesterase, based on the pharmacophoric properties of Calyxamines A and B and their link to the active site of Acetylcholinesterase, using the innovative technique "Computational Nanotechnology".

To achieve this, we used a top of the line computational programs that currently support worldwide research in drug design as Sybyl[®], Autodock, Gaussian[®], VMD, Chimera UCFS[®] and others. We elucidated the binding site of the Calyxamines A and B on the Acetylcholinesterase and the virtually complex they formed.

Thousands of compounds were designed "*in silico*" and their pharmacophoric activities fully evaluated on the active site of Acetylcholinesterase.

Then, through a rigorous chemical analysis of the interactions, was recognized a single lead drug candidate. Finally, we found an organic compound that has a higher binding affinity to the Acetylcholinesterase than Calyxamines A and B, and knows exactly the binding site of these amines on the Acetylcholinesterase, using a method that has been called "intelligent drug design".

The impact of this research in the field of public health, is the contribution by our country in the design of potentially new drugs, aided by the new technique of "intelligent design drugs" that provides Computational Nanotechnology.

Furthermore, this contribution to science is expected to achieve an advance in the development and progress in the scientific research activities in Guatemala.

The use of Computational Nanotechnology in drug design is cheaper compared with current drug design methodology, which implies that Guatemala has the potential to design new drugs to unravel in our region specific health problems.

In the development of active drugs against Alzheimer's Disease, this alternative has the advantage of design, constructed on the active site of the enzyme that wants to inhibit, on a directly way (and not by test and error as with the methods developed so far and that represents a cost of millions of dollars to get a leader candidate), potentially new candidates against the disease. This work is a contribution in a possible treatment of Alzheimer Disease, that currently reaches 17,000 people in Guatemala (Guatemalan Association against Alzheimer, 2007), and has an economic impact of global scale in the treatment of one of the most common diseases of the elderly (Alzheimer's Disease International, 2009).

Key words: Nanotechnology, Calyxamines, docking, intelligent drug design, Acetylcholinesterase, Pharmacophoric Properties.

Introducción

Las Calyxaminas fueron aisladas de *Calyx Podatypa*, una esponja marina del Caribe mesoamericano, por Rodríguez y Cóbar en 1997 (Rodríguez, A *et al.* 1997) y sintetizadas por primera vez por Vásquez y Cóbar en 2005, reportándose su inhibición contra la enzima Acetilcolinesterasa (Cóbar, O *et al.* 2005)

Por otra parte, las técnicas de “diseño inteligente de drogas *in silico*”, que se basan en la predicción y corroboración de propiedades farmacofóricas de moléculas orgánicas por medio de programas computacionales, permiten el desarrollo eficiente, certero y económico de nuevos fármacos. Este campo se ha posicionado en los últimos diez años, como la técnica líder y de vanguardia para la obtención de nuevos medicamentos para el tratamiento de múltiples enfermedades. (Song, C *et al.* 2009).

Debido a que Calyxaminas A y B son compuestos novedosos con potencial actividad contra la Enfermedad de Alzheimer y su reciente síntesis orgánica, se buscó determinar cuál es el sitio activo en Acetilcolinesterasa por el cual ambos compuestos inhiben esta enzima y estudiando sus interacciones, podría mejorarse la eficiencia del enlace Calyxamina-Enzima, modificando los grupos químicos funcionales de Calyxaminas A y B.

Como resultado, se propone un nuevo compuesto como fármaco líder, derivado de las Calyxaminas, del cual se infiere su acción específica, y se podrá (en futuras investigaciones) sintetizar químicamente a niveles de gramo, teniendo una alta certeza de su eficacia y eficiencia en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

Materiales y Métodos

Consideraciones Generales.

La búsqueda de una secuencia canónica fue el primer paso en la determinación de una estructura óptima sobre la cual se diseñó el derivado de Calyxamina. Una vez obtenida, se procedió a crear un archivo .pdb (protein data bank) de la proteína (sin su conformación terciaria), con el objeto de poder analizar las 85 secuencias obtenidas de las estructuras presentes y reportadas hasta esta fecha (www.pdb.org) sobre Acetilcolinesterasa, con lo cual se realizó una primera discriminación basada en la estructura primaria de las secuencias.

Los resultados fueron tabulados y graficados para obtener una idea clara del estado del total de los datos.

Modelaje Molecular de Calyxamina A y B.

Minimización de energía y obtención de su geometría molecular total, utilizando Avogadro/Linux, como primera aproximación para la obtención de coordenadas X, Y, Z.

Modelaje Molecular de Calyxamina A y B utilizando el “basis set” STO-G3 en GAMESS/Linux basada en los resultados obtenidos en Avogadro. Modelaje Molecular de Calyxamina A y B: minimización de energía y geometría molecular total utilizando SPARTAN 08[®]/Windows, como primera aproximación para la obtención de coordenadas X, Y, Z.

Modelaje Molecular de Calyxamina A y B utilizando STO-G3 en ChemOffice como interface para GAMESS para Windows.

Para la determinación de las Frecuencias respectivas, se utilizó STO-G3, con lo cual se computaron las constantes fisicoquímicas: Cv, Cp, S, H, E, G, utilizando SPARTAN 08[®]/Windows.

Se realizó la descripción de las Propiedades Farmacofóricas de Calyxaminas A y B, obteniendo su relación QSAR-ADME basadas en lo calculado en CoMSIA de SYBYL[®], obteniendo las descripciones de los grupos químicos potencialmente activos:

Hidrofobicidad

Aromaticidad

Aceptores/Dadores de puentes de Hidrógeno

Potencial electroquímico y estérico.

CLogP

Coefficiente de Refractividad

Las estructuras y propiedades obtenidas de Calyxaminas A y B, se almacenan en formatos compatibles con SYBYL[®] y Autodock 4.01.

La descripción bioquímica de la Acetilcolinesterasa se obtuvo mediante el programa MOLCAD/SYBYL[®]/Tripos.

Para el proceso de enlace automatizado (docking) entre Calyxamina-Acetilcolinesterasa, se utilizó el programa Autodock 4.01.

Medición de las Energías de Enlace.

Se utilizó el programa APBS -Adaptive Poisson-Boltzmann Solver- Version 5.1- desarrollado por Nathan A. Baker, con las siguientes características (citados en Inglés para evitar confusiones de traducción):

Vpbeactor: Using max ion radius (2 Å) for exclusion function.

Debye length: 30.4285 Å
 Current memory usage: 62.004 MB total, 62.004 Mb high water
 Using cubic spline charge discretization.
 Grid dimensions: 65 x 65 x 65
 Grid spacings: 1.593 x 1.825 x 1.758
 Grid lengths: 101.970 x 116.792 x 112.494
 Grid center: (-2.128, -0.580, 0.224)
 Multigrid levels: 5

Docking.

Los "docking" se efectuaron mediante el programa Autodock 4.01 con las siguientes características: (Toda otra característica que no se incluye en esta lista, fue asignada por default según las características que trae prediseñadas el programa).

Número de corridas en Algoritmo Lamarkiano: 100.

Tamaño de la población: 300.

Máximo Número de Evaluaciones: 2.5 millones.

Número Máximo de Generaciones: 27,000.

Número máximo de individuos que sobreviven por cada corrida: 1.

Número de generaciones de las cuales se escoge el peor individuo: 10.

Diseño de Derivados.

Se utilizó SYBYL[®] para desarrollar un grupo de derivados de las Calyxaminas.

Para obtener este grupo de derivados se utilizó el modelo de Calyxamina previamente construido y adicionalmente modelado. De la misma forma se construyó y modeló una molécula de Acetilcolina, también evaluada en presencia de la Acetilcolinesterasa en un docking "in silico", en donde se encontró que la Acetilcolina y la Calyxamina poseían lugares de reacción en común.

Selección del candidato líder.

A todas las series de compuestos, se les calculó sus propiedades farmacofóricas y constantes fisicoquímicas utilizando relaciones QSAR-ADME "in silico".

Posteriormente se seleccionó y estudió un mapa topológico de los compuestos que tuvieron los mejores resultados.

El mejor compuesto encontrado fue extraído en forma de complejo virtual computacional en conjunto con la enzima y se le realizó un "Docking Lamarkiano".

Se estudiaron dos compuestos como candidatos probables, codificados con los números 12857 y 5082, en este informe solamente se han adjuntado los resultados obtenidos para el compuesto 5082 al poseer mejores constantes y porque los resultados obtenidos para 12857 carecen de importancia, pues no fueron realizados para la misma enzima estándar.

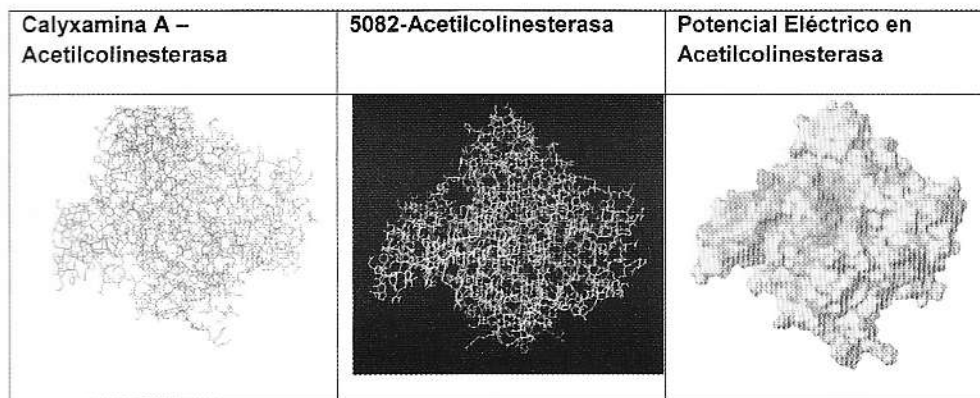
Resultados y Discusión.

A continuación se muestran los resultados en tablas y gráficas que explican los resultados obtenidos experimentalmente.

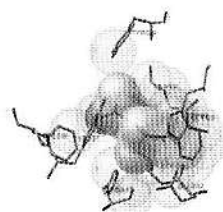
	E	H	G	CV	CP	S
	KCAL/MOL	KCAL/MOL	KCAL/MOL	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K	CAL/MOL-K
ELEC.	0	0	0	0	0	0
TRANS.	0.889	1.481	-10.964	2.981	4.968	41.741
ROT.	0.889	0.889	-8.609	2.981	2.981	31.855
VIB.	222.611	222.611	210.189	46.298	46.298	41.665
TOTAL	224.389	224.981	190.616	52.26	54.247	115.26

Tabla 1 Constantes Fisicoquímicas Obtenidas para Calyxamina A (Gauss/Windows)

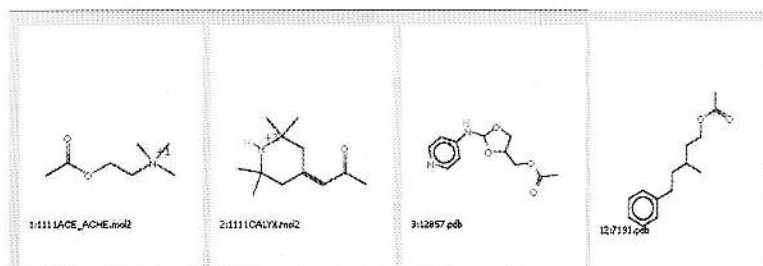
E=energía, H= entalpía, G =energía libre de Gibbs, CV=capacidad calorífica a volumen constante, CP=capacidad calorífica a presión constante, S=entropía, ELEC=Energía Electroestática, TRANS=Energía Traslacional, ROT=Energía Rotacional, VIB=Energía Vibracional, TOTAL=Sumatoria de todas las energías de enlace.



Gráfica 1 Determinación del Sitio Activo de Calyxaminas en Acetilcolinesterasa y Comparación con el sitio activo del derivado 5082 en la Acetilcolinesterasa.



Gráfica 2. Corrida 9, Rango 1-1, Calyxamina A-Acetilcolinesterasa
Análisis de las interacciones cercanas.



Gráfica 3: Ligandos Evaluados para la Acetilcolinesterasa.

Especie	ClogP	CMR	COMSIA STERIC AND ELECTROSTATIC	COMSIA DONOR AND ACCEPTOR
ACEACHE	-7.099	2.651	37.8577	2.405
CALYX	-3.249	4.2466	34.0902	3.3351
12857	-0.3364	5.5031	12.9965	5.2402
18978	1.922	5.2167	13.0249	1.8875
5082	2.98	6.1443	13.2917	1.8875
7191	2.98	6.1443	13.269	2.405

Tabla 2. Propiedades Farmacofóricas Segunda Serie de Derivados.

CMR=Columna de Refractividad Molar, CMR=Error: Medida de dificultad encontrada al calcular MR para esta molécula.
ClogP=Coefficiente del Logaritmo de Partición, ClogP ERROR=Medida de la dificultad encontrada al calcular ClogP.

La gráfica 1 muestra la estructura tridimensional de la enzima, si potencial electrostático y su sitio activo, adicionalmente se puede visualizar la ubicación de la molécula de Calyxamina dentro del mismo y su comparación con el compuesto 5082.

En la gráfica 2 se muestran las interacciones cercanas entre algunos de los compuestos evaluados y los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima.

En la gráfica 3, se observa el mapa topológico de interacciones farmacofóricas positivas y negativas para el potencial hidrofóbico de los cuatro mejores diseños encontrados en base a la estructura de Calyxamina. En las tablas 1 y 2, se enlistan las constantes fisicoquímicas y propiedades farmacofóricas de algunos de las moléculas estudiadas.

En representación de bolas y barras, en color naranja se observan los aminoácidos hidrófobos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa;

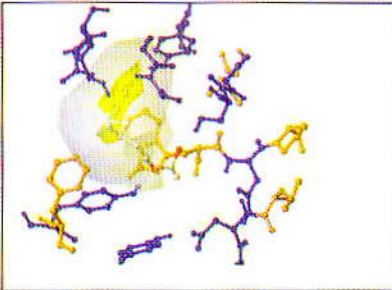
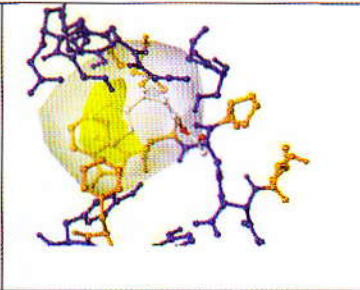
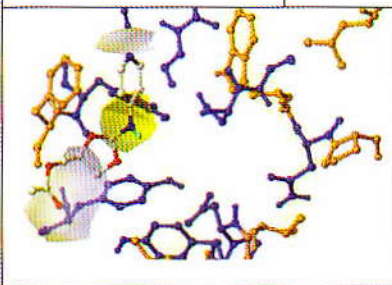
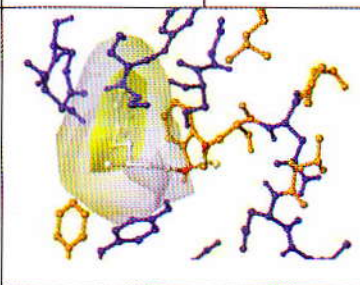
			
5082	6.9042	18978	5.9734
			
12857	3.2098	7191	6.9308

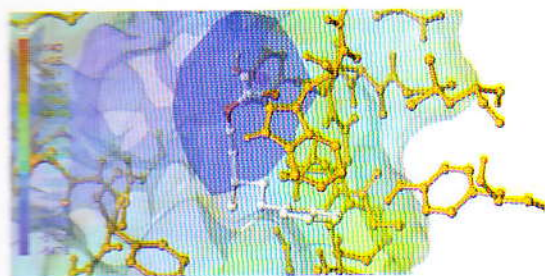
Tabla 3. Potencial Hidrofóbico

En el esquema, las moléculas se representan en forma de “bolas y barras”, de color azul se observan los aminoácidos hidrófilos en el sitio activo de la Acetilcolinesterasa; la molécula diseñada (candidato) en colores de acuerdo al tipo de átomo (C,H,N,O). Los mapas farmacofóricos de interacciones electrostáticas positivas se observan de color azul, las interacciones electrostáticas no favorables se observan de color rojo. Debajo de cada gráfica al lado izquierdo y resaltado en negrilla se encuentra el código numérico asignado al compuesto; al lado derecho y sin resaltar se encuentra el punteo asignado al campo farmacofórico para ese compuesto. Todas las interacciones se pueden observar representadas cada una como una esfera de color verde, la Acetilcolinesterasa está representada en esquema de líneas de color blanco.

Corrida No.	A única	B única	Acetilcolina	5082
Rango	1-1	2-1	1-1	1-1
Energía de Enlace	-7.59	-6.41	-3.47	-4.62
Constante de Inhibición -K _i -	2.74 μ M	20.14 μ M	2.84 μ M	407.97 μ M
Energía Intermolecular	-7.89	-7.3	-4.67	-6.71
Energía Interna	-0.12	-0.15	0.32	-0.07
Energía Torsional	0.3	0.89	1.19	2.09
Energía Extendida de No enlace	: -0.12	-0.15	-0.32	-0.07
Media de la Raíz Cuadrada (RMS)	0	0	0	0.0
RMS de Referencia	206.6	123.51	123.22	17.95
Eficiencia de Ligando	-0.54	-0.46	-0.35	-0.29

Tabla 4. Comparación entre el compuesto 5082 y las moléculas de referencia.

Para los 4 mejores compuestos encontrados el potencial electrostático es muy cercano. Este potencial se debe principalmente al poder iónico del grupo éster que está presente en todos los compuestos. Es posible observar que para 18978 y para 12857, el potencial cambia debido la interacción iónica que encuentran sus miembros. El valor de interacción positiva mayor, está reflejado por el mayor campo electrostático positivo (azul) encontrado, menos el total de campo electrostático desfavorable (rojo). Por este motivo, aunque el compuesto 12857 tiene mayor potencial electrostático total, su valor es menor que el de 18978.



Gráfica 4. Interacciones electrostáticas del compuesto 5082.

En esta gráfica pueden observarse las interacciones electrostáticas representadas para la Acetilcolinesterasa en un campo de Van der Waals mapeado en toda su superficie.

La escala del nivel electrostático se aprecia en el lado izquierdo de la gráfica.

Para la molécula 5082 es posible observar el campo electrostático de color azul.

El campo electrostático de 5082 aquí mostrado es positivo, se encuentra principalmente formado por el grupo éster, el cual es el grupo base con el cual trabaja la enzima.

La molécula 5082 ha sido seleccionada como el mejor candidato de todos los generados y evaluados en esta investigación. Esta selección se ha basado en todos los parámetros previamente discutidos. Aunque todos son importantes, probablemente los dos parámetros que dan una idea más inmediata de la calidad del candidato escogido son ClogP y la energía libre de enlace enzima-ligando.

De esta manera, el "docking" realizado con el programa Autodock 4.01 muestra en su gráfica que los sitios activos de 5082 en la Acetilcolinesterasa no están dispersos, sino bien localizados. Estos focos de reactividad 5082-enzima están directamente relacionados con los sitios de enlace encontrados para la Acetilcolina y para la Acetilcolinesterasa.

En la gráfica 4, también pueden apreciarse tres puntos principales. El de mayor tamaño indica el mejor sitio activo de 5082 en la Acetilcolina, base al cual fue diseñado 5082.

La cara opuesta de la enzima también presenta otras varias interacciones que marcan otros sitios de reacción para 5082, estos otros sitios también están relacionados con otros encontrados para la Acetilcolina.

En base a las propiedades determinadas para la Acetilcolinesterasa fue posible encontrar una serie de sitios activos presentes en la enzima, cuya función es hidrolizar la Acetilcolina y los cuales están de acuerdo con lo previamente reportado experimental y teórico en la literatura.

Los sitios activos presentes en la Acetilcolinesterasa para Calyxamina A, Calyxamina B y Acetilcolina, son prácticamente los mismos, existen pequeñas

diferencias entre los aminoácidos que poseen preferencia en la interacción entre las tres moléculas, pero básicamente se puede decir que estos aminoácidos generalmente son Fenilalanina, Triptófano y Tirosina.

Existe un sitio activo principal en la Acetilcolinesterasa, determinado por el hallazgo recurrente de muy bajas energías de enlace liberadas para la interacción de todas las moléculas afines sustrato-Acetilcolinesterasa que fueron evaluadas en esta investigación.

Dicho sitio activo se ubica esencialmente alrededor de la TYR337, con importantes interacciones aportadas por PHE298 y PHE337.

Se han obtenido varios derivados que mejoraron la energía de enlace desplegada Calyxaminas A y B y Acetilcolina, dentro de ellos se ha seleccionado a 5082 (3-metil-5-fenilpentilacetato) como el mejor candidato líder encontrado en esta serie de compuestos diseñada, basándose en la excelente calidad de sus propiedades farmacofóricas encontradas, dentro de ellas.

Es más afin a la Acetilcolinesterasa que la Acetilcolina, pero menos que las Calyxaminas. Su ClogP es 2.98, siendo el ClogP ideal cercano a 5.00 se considera el valor obtenido como bueno. Aunque en su evaluación fisicoquímica total es la segunda mejor en la lista, el análisis global de los resultados la ubican como la primera opción. Posee excelente calidades hidrófobas.

Su análisis de hidrógenos dadores y aceptores lo ubica en 1.98 siendo uno de los mejores compuestos obtenidos.

Se considera que químicamente 3-metil-5-fenilpentilacetato posee una estructura química fácil de sintetizar ya que únicamente está constituido por un anillo aromático y una cadena alifática que termina en grupo éster. Además es posible decir que su síntesis puede partir de compuestos económicos y fáciles de encontrar.

Se ha corroborado la eficiencia del enlace 3-metil-5-fenilpentilacetato-Acetilcolinesterasa mediante la realización de un "docking", el cual ha demostrado que la afinidad de este compuesto es superior a la de la Acetilcolina.

Agradecimientos

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero de la Dirección General de Investigación DIGI y el co-financiamiento de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Referencias

Asociación Guatemalteca contra el Alzheimer, 2007, Informe Anual (2009) Alzheimer's disease facts and figures. May;5(3):234-70

Bagautdinov B, Yutani K, Riken (2008) Structural GenomicsPROTEOMICS, Initiative (Rsg)

Cóbar, O.; Vásquez, A. (2005) Síntesis y Actividad Biológica de Calyxaminas y Calyxolanos, Dos Nuevas Clases de Productos Naturales Marinos. *Resúmenes de Proyectos de Investigación 2004*, Dirección General de Investigación. Universidad de San Carlos de Guatemala, 26-29.

Cachau RE, Gonzalez-Nilo FD, Ventura ON, Fritts MJ. (2007) In-silico nanobio-design. A new frontier in computational biology. *Curr Top Med Chem.* 7(15):1537-40

Gil-Néciga E., Gobartt AL., (2008) Treatment patten of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. *Rev Neurol* , 46(8):461-4.

Guo J, Hurley MM, Wright JB, Lushington GH.(2004) A dockin score function for estimating ligand-protein interactions: application to acetylcholinesterase inhibition. *J MedChem* (22):5492-500

Harel, M., Schalk, I., Ehter-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C Axelsen, Ph., Silman, I., And Sussamn, J.L. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:9031-9035.

Kubis AM, Janusz M. (2008) Alzheimer's disease: new prospects in therapy and applied experimental models. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. Aug 5;62:372-92.

Landmark K, Reikvam A. (2008) Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia--are they useful in clinical practice? *Tidsskr Nor Laegeforen.* 128(3):294-7

Lee SH, Van HT, Yang SH, Lee KT, Kwon Y, Cho WJ. (2009) Molecular design, synthesis and docking study of benz[b]oxepines and 12-oxobenzo[c]phenanthridinones as topoisomerase I inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* May 1;19(9):2444-7.

Lucas S, Heim R, Negri M, Antes I, Ries C, Schewe KE, Bisi A, Gobbi S, Hartmann RW. (2008) Novel aldosterone synthase inhibitors with extended carbocyclic skeleton by a combined ligand-based and structure-based drug design approach. *J Med Chem.* 2008 Oct 9;51(19):6138-49.

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., And Vallette, F. M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41:31-91

Pepcu G, Giovannini MG. (2009) Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr Alzheimer Res.* 2:86-96

Rodriguez, A.; Cobar, O.; Padilla, O.; Barnes, C. (1997) Calyxamines A and B, Novel Piperidine Alkaloids from the Caribbean Sea Sponge *Calyx podatypa*. *Journal of Natural Product.* 60, 1331-1333.

Shevtsov PN, Shevtsova EF, Burbaeva GSh. (2008) Effect of tacrine, amiridine, akatinol memantine, and triazolam on phosphorylation, structure, and assembly of microtubules from brain microtubular proteins in Alzheimer diseases. *Bull Exp Biol Med.* 145(2):218-22

Song CM, Lim SJ, Tong JC. (2009) Recent advances in computer-aided drug design. *Advance Access, Oxford Journals, Brief Bioinform.*

Taylor, P, and Radić, Z. (1994) The cholinesterases from genes to proteins annu. *Rev Pharmacol. Toxicol.* 34:281-320

Tiseo, P.; Perdomo, C.; Friedhoff, L. (1998). Metabolism and elimination of ¹⁴C-donepezil in healthy volunteers: a single-dose study. *British Journal of Clinical Pharmacology. Suppl. 1*, pp. 19-24.