

## Aplicaciones quimioinformáticas en el descubrimiento de fármacos.

Carlos Requena Triguero<sup>1</sup>, Carlos Roca Magadán<sup>2</sup>, Víctor Sebastián Pérez<sup>2</sup>,  
Nuria E. Campillo Martín<sup>2, a</sup>

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, C/ Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Madrid, España.

a. nuria.campillo@csic.es

**Palabras clave:** quimioinformática; diseño de fármacos; docking; GSK-3 $\beta$ ; PDE8

### Resumen

La quimioinformática ha sufrido un crecimiento exponencial en los últimos años y ha cambiado la forma en la que se conduce la investigación química, proporcionando un acceso a la información insostenible para los métodos tradicionales. Está basada en aproximaciones computacionales al ligando (métodos indirectos) o a la diana (métodos directos), que constituyen el centro de lo que se conoce como cribado virtual. Las aplicaciones que tienen estas técnicas en el descubrimiento de fármacos, son muchas y variadas, y han conseguido pasar de un proceso poco eficiente a un proceso conocido como desarrollo de fármacos de forma racional, en el que se ahorra mucho tiempo y dinero. Este trabajo pretende la búsqueda, mediante técnicas computacionales, de soluciones en diferentes etapas del desarrollo de un fármaco. El estudio se centra en la búsqueda de nuevos sitios de unión para el desarrollo de un fármaco frente a la diana GSK-3 $\beta$  de *Leishmania* y en la búsqueda del modo de unión de diferentes compuestos frente a la enzima PDE8, para poder desarrollar inhibidores más selectivos.

**Cita:** Requena Triguero, Carlos; Roca Magadán, Carlos; Sebastián Pérez, Víctor; Campillo Martín, Nuria E. (2016) Aplicaciones quimioinformáticas en el descubrimiento de fármacos. *Dianas* 5 (2): e20160901. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20160901](http://journal.dianas.e20160901) <http://www3.uah.es/dianas?e20160901>.  
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Requena-Triguero C, Roca-Magadán C, Sebastián-Pérez V, Campillo-Martín NE. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

Desde el principio, la química, la biología o la física, han desarrollado la mayor parte de su ser desde la observación y de la extracción de datos a partir de estas observaciones. Ha sido más adelante cuando las técnicas han evolucionado lo suficiente como para poder hacer predicciones lo suficientemente buenas de lo que puede ocurrir, o estar ocurriendo.

Sin embargo, muchos fenómenos relacionados, son tan complejos que desafían las bases sobre las que se asientan estas disciplinas. Así, el avance de éstas, todavía se basa en el análisis de una gran cantidad de datos experimentales, un proceso que implica un aprendizaje inductivo. Desde hace 50 años se ha venido reconociendo que este tipo de aprendizaje se puede beneficiar de los avances tecnológicos, y más concretamente de la evolución computacional [1]. Los equipos y el *software* se han desarrollado de tal manera que son capaces de procesar ingentes cantidades de datos, muchos más de los que un investigador podría manejar, y además de hacerlo de una manera muy rápida, de nuevo, mucho más rápido de lo que un científico podría [1].

La química médica y el descubrimiento de fármacos son áreas que se han beneficiado de estos avances tecnológicos y computacionales. La aparición de la quimioinformática, ha contribuido sustancialmente al desarrollo de una gran cantidad de nuevos fármacos [2,3]. Buena prueba de ello es que prácticamente todos los fármacos diseñados recientemente han utilizado en algún punto de su desarrollo técnicas computacionales [4].

En general, las aproximaciones computacionales en las que se basa la quimioinformática se pueden clasificar en dos grupos: los métodos indirectos, o basados en los ligandos y los métodos directos o aproximaciones basadas en la diana [5].

Las aproximaciones empleadas en los métodos indirectos están basadas en el conocimiento del ligando y su objetivo es la deducción de los elementos necesarios del mismo, para obtener una determinada propiedad biológica (actividad, ADMET...). Estas técnicas, analizan un conjunto de moléculas con el fin de extraer la información estructural común a todas ellas, de forma que se pueda correlacionar con la propiedad a estudiar. Así, encontramos técnicas basadas en modelos matemáticos que relacionan la estructura con la propiedad biológica a estudiar, como QSAR, QSAR3D y RNAs; y técnicas basadas en el

desarrollo de un farmacóforo, que pretende la búsqueda de los aspectos estructurales indispensables para la interacción con una diana terapéutica [6].

Por otro lado la aproximación directa se basa en el conocimiento de la diana y en el efecto biológico de la interacción ligando-diana. Lo que se pretende es el desarrollo de fármacos de forma “racional”, tanto optimizando compuestos cabeza de serie como comprendiendo el comportamiento de moléculas pequeñas en su diana [7]. La herramienta más utilizada en este tipo de aproximación es el *docking*. El *docking* es un método de predicción del acoplamiento de complejos moleculares (proteína-ligando, proteína-proteína) en función de sus conformaciones y orientaciones. Está basado en ecuaciones matemáticas que intentan mimetizar los comportamientos químicos conocidos, utilizando por un lado, algoritmos de búsqueda conformacional para la deducción de las poses del ligando [8], y por otro, funciones de puntuación para valorar la calidad de esas conformaciones y su interacción con la diana [9].

Todas estas aproximaciones pretenden la correlación de parámetros fisicoquímicos o biológicos con la estructura de diferentes compuestos, y son el centro de lo que llamamos cribado virtual (*Virtual Screening*). El cribado virtual consiste en un proceso computacional orientado a seleccionar, de entre grandes bases de datos de compuestos químicos (de compuestos conocidos o compuestos que podrían sintetizarse), aquellos que presenten mayor probabilidad de poseer una actividad biológica específica al tiempo que reúnen las características estructurales necesarias para exhibir un perfil farmacocinético adecuado [10]. Esto ha cambiado el paradigma en el que se basa el diseño de fármacos, pasando de un método poco eficiente basado en cribados de alto rendimiento altamente costosos y con poco ratio de éxito, al uso de técnicas computacionales que permiten un gran ahorro de tiempo y ante todo, de dinero.

El objetivo de este trabajo es la aplicación de diversas herramientas quimioinformáticas durante las diferentes etapas en el desarrollo de un fármaco, es decir desde la identificación y estudio de la diana hasta el desarrollo de un candidato prometedor.

## Materiales y métodos.

### Diseño de inhibidores selectivos de *Im*GSK-3 $\beta$ . Análisis de secuencia y predicción de sitios de unión (*druggable binding site*)

El alineamiento de las secuencias de la GSK-3 $\beta$  humana y de *Leishmania major*, así como las de rata y ratón, se ha llevado a cabo con el programa ClustalW2, un programa de alineamiento múltiple de secuencia que pretende calcular la mejor coincidencia para las secuencias seleccionadas y las alinea de tal manera que se puedan ver las identidades, similitudes y diferencias entre ellas.

Para determinar las diferentes cavidades de GSK-3 $\beta$ , se ha usado Fpocket, un software de detección de bolsillos de acceso gratuito que se puede encontrar en <http://www.sourceforge.net/projects/fpocket>. El software de Fpocket se puede resumir en tres grandes etapas. Durante la primera etapa, todo el conjunto de esferas alfa (esferas que hacen contacto con cuatro átomos en su periferia y no contienen un átomo interno) se determina a partir de la estructura de la proteína. Fpocket devuelve una colección de esferas prefiltradas. La segunda etapa consiste en identificar conjuntos de esferas muy juntas entre sí, identificar bolsillos y eliminar grupos de poco interés. Por último se calculan las propiedades de los átomos del bolsillo con el fin de asignar una puntuación a cada uno. Fpocket utiliza como entrada, archivos PDB (*Protein Data Bank*) estándar, que se han obtenido de la página web [www.pdb.org](http://www.pdb.org). Se ha cogido la única estructura de GSK-3 $\beta$  de *leishmania* cristalizada disponible, 3E3P. Antes de su uso, se le han eliminado las aguas, los ligandos, los metales pesados y los cofactores que pudiera tener utilizando el programa Pymol ([www.Pymol.org](http://www.Pymol.org)). Tras el uso de Fpocket, se analizó la estructura de forma visual y se organizaron los principales bolsillos teniendo en cuenta la puntuación que devuelve el programa.

Los bolsillos encontrados se han validado y comparado teniendo en cuenta los bolsillos descubiertos en los diferentes cristales de GSK-3 humana ya reportados en un trabajo previo de este grupo [14]. Además se ha realizado, con Fpocket, un análisis de los bolsillos de una GSK-3 $\beta$  humana, 1I09, para completar y poder comparar más en profundidad los residuos implicados en cada bolsillo.

### Estudio de *docking* de inhibidores selectivos de hPDE8

Los compuestos utilizados en el *docking* se han dibujado utilizando la herramienta *2D Sketcher* del paquete incluido en Maestro [24]. La conversión de 2D a 3D la realiza el propio programa, pero para buscar la conformación energética más estable para el ligando se ha utilizado *Jaguar*, otra aplicación incluida dentro del paquete de software de Maestro [24]. Para ello, se ha utilizado el método *Hartree-Fock* con el set de bases 6-31\*\*+, que es una aproximación a las ecuaciones de mecánica cuántica, y se ha marcado la opción de asignar cargas ESP (*Atomic electrostatic potential charges*).

Antes de realizar los cálculos de *docking* se ha llevado a cabo la preparación de la proteína 3ECM, obtenida de [www.pdb.org](http://www.pdb.org). Para ello se ha utilizado la herramienta de Maestro llamada *Protein Preparation Wizard* [25], que preprocesa la proteína borrando aguas, simula un entorno fisiológico para

protonar residuos de la forma más apropiada y lo acompaña de una pequeña minimización hasta que los átomos pesados converjan en un RMSD de 0,30 Angstroms, utilizando el campo de fuerza OPLS2005 [26].

Para realizar el *docking* de los compuestos, nos hemos servido del programa Autodock (<http://autodock.scripps.edu/>). Se ha utilizado el método del algoritmo genético Lamarckiano para realizar el *docking*. Para realizar los cálculos, al ligando se le han añadido cargas Gasteiger y se han marcado con capacidad para rotar todos aquellos enlaces que Autodock Tools (ADT) [27] encuentre que pueden rotar, por último, se le ha asignado el tipo de átomo AD4. El ligando, por tanto es tratado como flexible, mientras que la proteína es tratada como una estructura rígida. A la proteína se le eliminan los hidrógenos no polares, se le asigna las cargas Gasteiger y se le asigna el tipo de átomo AD4. Estas estructuras ya modificadas se convierten a formato PDBQT con ADT para realizar los cálculos en AutoDock.

La grilla se genera por el programa Autogrid. Se ha centrado en la Tyr748 con un tamaño de 60x60x60 Å<sup>3</sup> y con un espaciamiento de 0,375 Å, pues es la que mejor abarca toda la cavidad. El protocolo de *docking* consiste en la búsqueda de 200 poses por ligando con un número máximo de evaluaciones de 2500000 por pose y unas tasas de mutación de 0.2 y de entrecruzamiento de 0.8. Se analizan los mejores *clusters* y las poses menos energéticas de forma visual. Se toman las 10 mejores poses del *cluster* más poblado para hacer cálculos de MM/GBSA.

Para llevar a cabo los cálculos de MM/GBSA utilizamos la aplicación Prime-MM/GBSA que se encuentra dentro del paquete de *software* de Maestro. Cogemos las mejores conformaciones desde el programa de Autodock y la proteína previamente preparada por *Protein Preparatio Wizard*. Se utiliza el modelo de solvatación VSGB y se utilizan las cargas parciales del ligando obtenidas de *Jaguar*. De los valores obtenidos se hace una media y se comparan.

El *docking* del resto de compuestos se ha realizado también con Autodock debido a la comodidad y precisión de los resultados que devuelve. Se ha seguido el mismo protocolo utilizado para el *docking* de WP519, y, de la misma forma, se ha seguido el protocolo para el cálculo de MM/GBSA.

## Resultados y discusión

### Diseño de inhibidores selectivos de *Im*GSK3-β. Análisis de secuencia y predicción de sitios de unión (*druggable binding site*)

La glicógeno sintasa quinasa 3β (GSK-3β), es una conocida proteína quinasa involucrada en el último paso de la síntesis de glucógeno. Se ha visto que es una diana prometedor para el tratamiento de graves y diversas enfermedades como la diabetes tipo II, enfermedades inflamatorias crónicas o enfermedades neurodegenerativas [11]. Además se ha visto que GSK-3β parece estar implicada en el metabolismo de *Leishmania spp.*, siendo una proteína crucial para su supervivencia [12]. Dada la previa experiencia del grupo en el desarrollo de inhibidores selectivos de GSK-3β humana y la implicación de esta diana en enfermedades parasitarias, se han realizado estudios computacionales sobre GSK-3β de *Leishmania*, con el objetivo de entender y poder diseñar fármacos selectivos frente a este parásito.

```

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      MSGRPRRTTSFAESCKPVQQPSAFGSMKVSRDKGSKVTTVVATPGQGPDR  50
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    -----MSLN-----AAAADERSR  14
                             *..                .*:..:.*

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      PQEVSYTDTKVIINGSGFVVYQAKLDCSGELVAIKKVLQDKRFKRELQI  100
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    KEMDRFQVERMAQGTFGTVQLGKEKSTGMSVAIKKVIQDPRFRNRELQI  64
                             : : : : *:*:*.* .* .:* *****:* *:*:*****

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      MR---KLDHCNIVRLRYFFYSSEK-KDEVYLNVLVDYVPETVYRVARHY  146
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    MQDLAVLHHPNIVLQSYFYTLGERDRDIYLNVMMEYVPTLHRCRNY  114
                             *:* *:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      SRAKQTLFVIYVKLYMYQLFRSLAYIH--SFGICHRDIKPNLLDPPDTA  194
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    YRRQVAPPPILIKVFLFQLIRSIGCLHLPSVNVCHRDIKPHNVLVNEADG  164
                             * : : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      VLKLCDFGSAKQLVRGEPNVSYICSRYYRAPELIFGATDYTSSIDVWSAG  244
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    TLKLCDFGSAKQLSPSEPNVAYICSRYYRAPELIFGNQHYTTAVDIWSVG  214
                             .*****:* .*****:***** .*:*:*:*:*:*

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      CVLAELLGQPIFPGDSGVDQLVEIIKVLGTPREQIREMNPNYTEFKFP  294
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    CIFAEMMLGEPIFRGDSAGQLHEIVRVLGCPSREVLKLNPSHTVDVLY  264
                             *:*:*:*:*:* *.....* *:*:*:* *:* *:*:*:*:*:..

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      QIKAHPWTKVFRPR---TPPEAIALCSRLLLEYTPTARLTPLEACAHSFFD  341
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    NSKGIWNSVNSDHSKDAKEAYDLLSALLQYLPEERMKPYEALCHPYFD  314
                             : * . * : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      ELRDPNVKLFNGRDTPA-LFNFTQELSNPPLATILIPPHARIQAAAST  390
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    ELHDPATKLPNNKLDPEDLFRFLPNEI-----EVMSE  346
                             *:* * . * * * . * * * * . : * :

sp|P49841|GSK3B_HUMAN      PTNATAASDANTGDRGQTNNAASASASNST  420
tr|Q4QE15|Q4QE15_LEIMA    AQKARLVRK-----  355
    
```

Figura 1.- Alineamiento de las secuencias de la GSK-3β de *Leishmania major* (Q4QE15) y humana (P49841-2)

El alineamiento y análisis de secuencias en bioinformática es una forma de representar y comparar dos o más secuencias. En la figura 1 se muestra el alineamiento de GSK-3 $\beta$  de *Leishmania major* y humana. Este alineamiento se realizó con el programa ClustalW2, un programa de alineamiento múltiple, mediante el cual se ha visto que la GSK-3 $\beta$  de *Leishmania major* es similar en un 69.3% e idéntica en un 38.6% a la GSK-3 $\beta$  humana.

La detección, la comparación y el análisis de los bolsillos de unión de ligandos son fundamentales para el diseño de fármacos basados en la estructura de la diana y pueden ayudar a encontrar bolsillos de unión o sitios alostéricos por los cuales empezar el desarrollo de pequeños ligandos con efectos terapéuticos. En este caso se ha utilizado un programa, basado en un algoritmo geométrico, llamado Fpocket (<http://fpocket.sourceforge.net>) [13] para estudiar la superficie de GSK-3 $\beta$  de *Leishmania major* (PDB: 3E3P) con el objetivo de poder compararla con la humana y poder identificar sitios de unión que difieran de la enzima humana con el fin de diseñar inhibidores selectivos.

De los 22 bolsillos encontrados, se identificaron en las primeras posiciones del ranking los 7 bolsillos conservados en la hGSK-3 $\beta$  (Figura 2) [14]. En la Tabla 1 se muestran los bolsillos más destacados de esta proteína [14] con su porcentaje de similaridad e identidad.

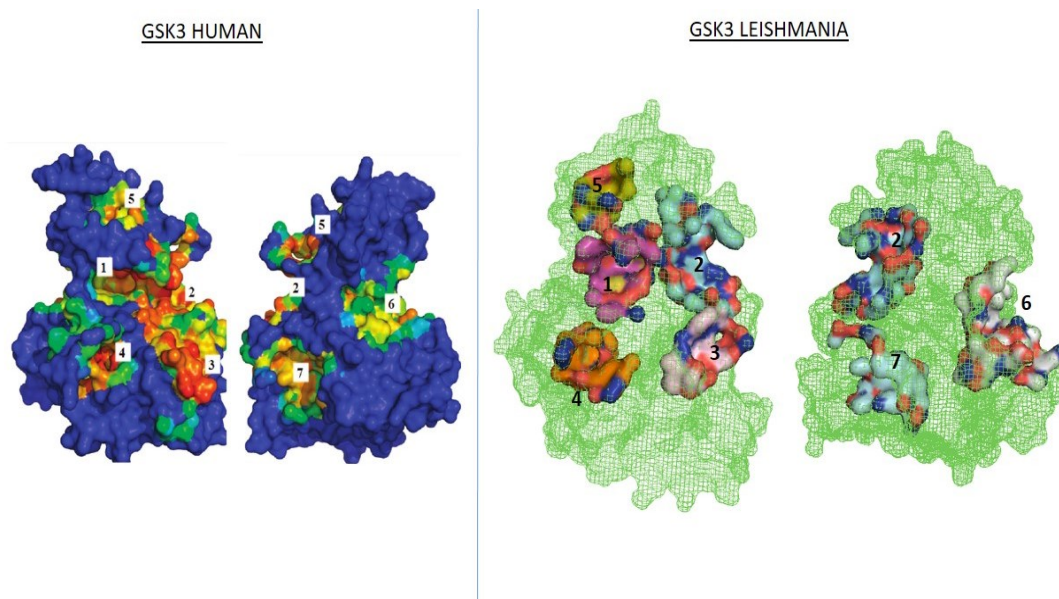


Figura 2.- Comparación de los 7 bolsillos más conservados en la GSK-3 $\beta$  humana con los bolsillos encontrados en la GSK-3 $\beta$  de *Leishmania major*. Los bolsillos están numerados según los estudios anteriores [14].

El análisis de estos tres bolsillos se ha llevado a cabo mediante el alineamiento de los residuos implicados en cada uno de ellos frente a los residuos de GSK-3 $\beta$  humana, utilizando ClustalW2 (Tabla 1). Estos resultados dan pie a la posibilidad de orientar la búsqueda de compuestos hacia el bolsillo alostérico, para ganar selectividad frente al parásito.

<b>Bolsillos</b>	<b>Identidad</b>	<b>Similaridad</b>
<i>Unión a ATP</i>	52.0%	64.0%
<i>Unión a sustrato</i>	55.2%	58.6%
<i>Bolsillo alostérico</i>	10.0%	25.0%

Tabla 1.- Resultados del alineamiento de los residuos implicados en los bolsillos de unión a sustrato, a ATP y en el bolsillo alostérico.

El compuesto VP0.7 es una pequeña molécula sintetizada previamente por nuestro grupo de investigación, que ha resultado ser un inhibidor de hGSK-3 $\beta$  no competitivo ni de ATP, ni de sustrato [14]. Los estudios previos demostraron que se unía al bolsillo alostérico de hGSK-3 $\beta$ , interaccionando de forma más notable con los residuos Arg209 (pi-cation), Thr205 (hidrofóbico) y Ser206 (puente de hidrógeno). Este compuesto inhibe la hGSK-3 $\beta$  y es eficaz modelos de rata y ratón, pero se ha visto que no es activo ni en *Leishmania spp.*, ni en *Aspergillus fumigatus* [15]. Tras el análisis de los residuos mutados se observa que el residuo Arg209 de hGSK-3 $\beta$  esta mutado por Pro179 en *lm*GSK-3 $\beta$ , una mutación importante que podría afectar a la unión del compuesto (Figura 3). Además GSK-3 $\beta$  de *Aspergillus fumigatus* también tiene mutado ese residuo de arginina [15]. Para corroborar la posibilidad

de que esta mutación sea responsable o no de la unión, se realizó un alineamiento entre GSK-3 $\beta$  humana y las de rata y ratón, observándose que esta Arg209 no está mutada, lo que da pie a pensar que la falta de esta arginina impide la unión del compuesto a la diana.

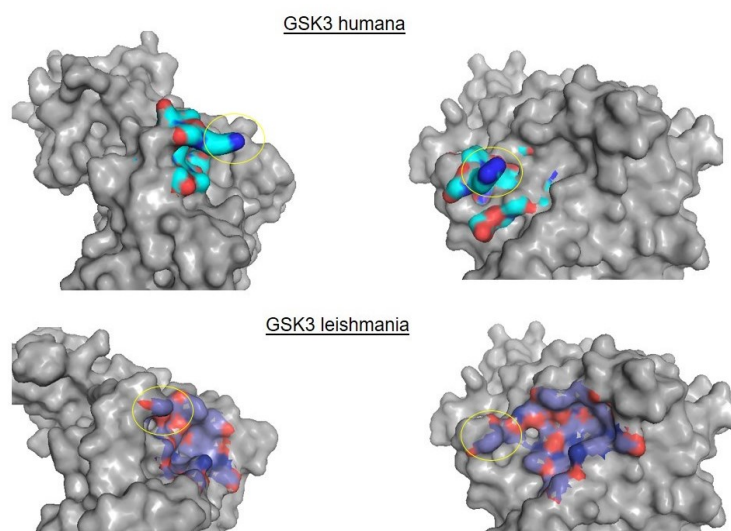


Figura 3.- Comparativa del bolsillo alostérico de la GSK-3 $\beta$  humana con la de *Leishmania major*. El residuo Arg209, que parece ser un residuo clave, modifica drásticamente la superficie del bolsillo

Todos estos datos apuntan a la posibilidad de usar este bolsillo como diana para conseguir en primer lugar selectividad, pues se evita el bolsillo de unión a ATP (más conservado) y también especificidad, pues la mutación de Arg209 por Pro179 parece discriminar entre ambas GSK-3 $\beta$ .

#### Estudio de *docking* de inhibidores selectivos de hPDE8

La enzima PDE8 es una fosfodiesterasa específica de AMPc que está implicada en multitud de procesos biológicos (regulación de la activación de células T, quimiotaxis o modulación de la producción de testosterona) [16,17]. Se encuentra en testículos, cardiomiocitos, glándula adrenal, tiroides y cerebro. Hidroliza específicamente AMPc sobre GMPc, ocasionando una depleción del mismo y evitando la activación de, entre otros, PKA, CREB o Epac [16]. Por su gran implicación en diferentes procesos, y debido a la falta de inhibidores selectivos, la modulación de esta enzima es una diana ideal para el tratamiento de diferentes patologías [17].

A lo largo de los últimos años se han ido desarrollando diferentes compuestos como inhibidores de PDE8. De ellos, se ha tomado su esqueleto, se ha simplificado su producción y se han desarrollado de forma lógica una serie de derivados que se han testado en ensayos enzimáticos (Figura 4).

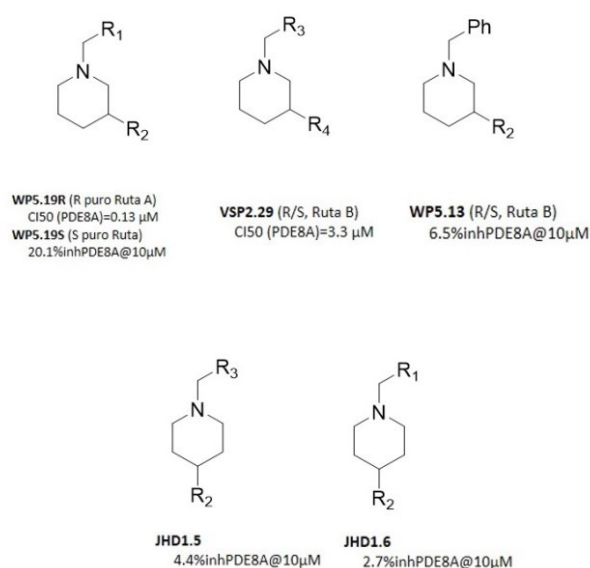


Figura 4.- Esqueleto de los compuestos usados para realizar los estudios de *docking*. Sintetizados en el grupo y sobre los que se ha ensayado actividad biológica. Los compuestos activos son WP519R y VSP2.29.

El objetivo de este segundo proyecto es estudiar el modo de unión de estos inhibidores y conocer en profundidad las interacciones que gobiernan la relación estructura actividad con el fin de poder diseñar inhibidores más eficaces y selectivos. Concretamente este estudio está dirigido a ver diferencias entre los enantiómeros de WP519 (experimentalmente se conoce que el R es activo y el S no) y diferencias entre compuestos derivados del mismo. Para ello nos hemos servido del uso de un programa de *docking*, Autodock [18], así como de cálculos de energía libre MM/GBSA [19] y estudios de dinámica molecular.

De la literatura, sabemos que la enzima PDE8 comparte características bastante similares con otras fosfodiesterasas, se ha visto que el residuo Gln778 comparte una posición similar a las glutaminas de PDE4 (Gln369) y PDE7 (Gln413), y que tiene un papel importante en la actividad catalítica de ellas [20]. Además el residuo Tyr748 es único en la enzima PDE8, pues en el resto de fosfodiesterasas en esa posición hay un residuo de fenilalanina, lo que es muy interesante para el diseño de inhibidores selectivos de hPDE8 [20].

En primer lugar, se diseñó y validó el protocolo de *docking* para llevar a cabo este estudio. El protocolo consta de un paso previo a la realización del *docking* con Autodock, que consiste en la asignación de cargas de mecánica cuántica (QM) al ligando, utilizando el programa *Jaguar* [21].

Para validar el protocolo, se ha intentado reproducir la pose encontrada en un cristal de hPDE8 (código PDB: 3ECN) de un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas (IBMX), en otro cristal de hPDE8 sin ligando (código PDB: 3ECM).

Tras su preparación se realiza el *docking*, la pose obtenida se puede ver en la Figura 5. Se ve que una de las poses que predice Autodock se parece mucho a la pose encontrada en el cristal, pero no es la mejor pose del mejor *cluster*, concretamente es la pose 6 del *cluster* 7, y esto probablemente se deba a que es un inhibidor inespecífico de hPDE8, siendo su IC<sub>50</sub> de más de 700µM [20]. La pose predicha tiene un RMSD de 0.767 Å, obtenida tras un alineamiento de los heteroátomos en Sybyl [22].

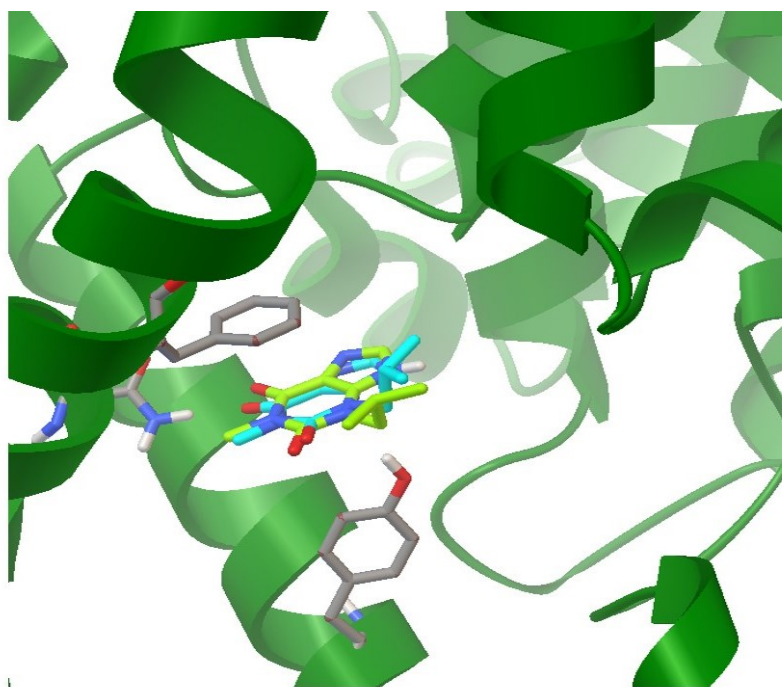


Figura 5.- Representación de la pose 7-6 de IBMX obtenida con Autodock (en verde) junto a la pose de IBM del cristal 3ECN (en azul). Se resaltan los residuos Gln778, Tyr748 y Phe781.

Considerando que el programa es capaz de reproducir la pose del cristal, se procedió al estudio de los enantiómeros R y S de WP519. La posibilidad de que estos compuestos estén protonados a pH fisiológico es muy similar a la probabilidad de que no lo estén, debido a que el pK<sub>a</sub> de la piperidina es de 7.73, por ello se ha realizado el *docking* con los compuestos protonados y sin protonar.

Debido a la alta complejidad para discernir entre la actividad y su relación con la estructura de dos enantiómeros de forma computacional, se ha realizado un *docking* y cálculos de MM/GBSA con la intención de obtener resultados similares y dar consistencia a la predicción.

El *docking* se realizó sobre la PDE8 cristalizada sin ligando (código PDB: 3ECM), que tiene una resolución de 1.9Å, sus resultados están en la Tabla 2. De estos resultados podemos ver que hay una diferencia de 1kcal/mol a favor del enantiómero R frente al S cuando están sin cargar, lo que no es un resultado significativo.

<i>Compuesto</i>	Número de poses <i>cluster</i> más poblado	Energía
<i>WP519R sin cargar</i>	11	-4.35 kcal/mol
<i>WP519S sin cargar</i>	21	-3.68 kcal/mol
<i>WP519R cargado</i>	15	-4.75 kcal/mol
<i>WP519S cargado</i>	15	-5.50 kcal/mol

Tabla 2.- Resultados del *docking* de los compuestos WP519 R y S, cargados y sin cargar con el programa Autodock

Además, cuando están cargados el programa no es capaz de diferenciar cuál de los dos es más activo y las mejores poses de cada enantiómero se colocan de forma muy similar, orientando la parte del anillo de cinco hacia la Gln778 (Figura 6a y 6b), lo que no explica la diferencia de actividad entre ellos.

Estos resultados ponen de manifiesto que los estudios de *docking* no son una técnica adecuada para explicar la diferencia de actividad entre enantiómeros ya que, por lo visto aquí, y lo publicado por otros autores [23], no es una técnica lo suficientemente sensible.

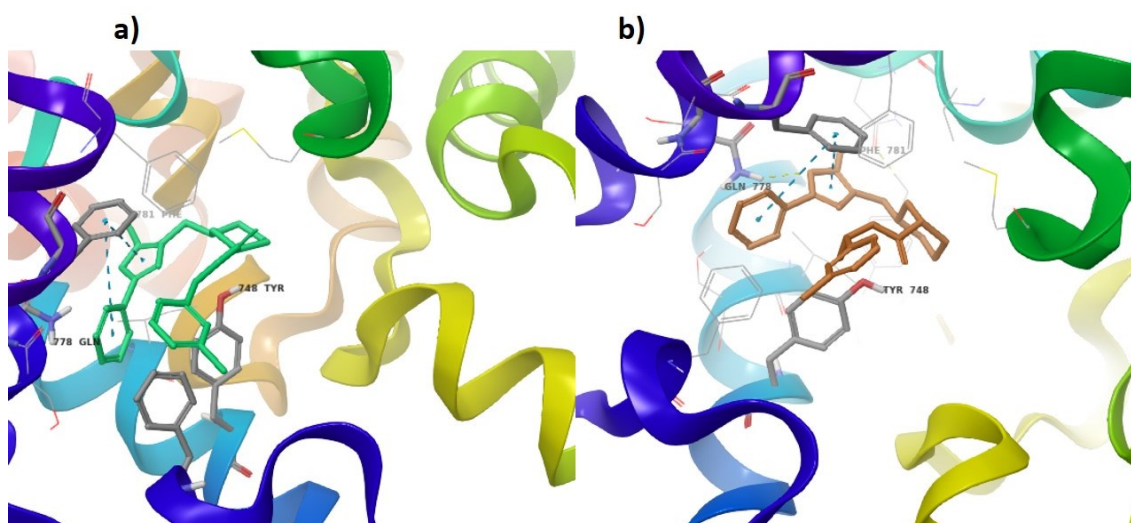


Figura 6.- a) Resolución de la mejor pose de WP519R protonado obtenida con autodock. b) Resolución de la mejor pose de WP519S protonado obtenida con Autodock. Se observa que en ambas el anillo de cinco queda a muy poca distancia de la Gln778, impidiendo así ver diferencias entre ambos enantiómeros

Así, el siguiente paso fue realizar estudios de MM/GBSA. Se calculó la media de la puntuación para las diez primeras poses de cada *cluster* más poblado, los resultados están en la Figura 7. Se puede observar que existe una diferencia entre el R y S, pero de nuevo no es suficiente para aseverar la gran diferencia de actividad entre uno y otro.

WP519R	WP519S
-71,206	-81,480
-66,657	-78,778
-70,007	-72,534
-68,534	-48,357
-70,704	-62,284
-67,700	-78,014
-71,934	-59,003
-73,064	-48,298
-71,130	-56,622
-71,330	-68,920
<b>Average: -70,227</b>	<b>Average: -65,429</b>

Figura 7.- Resultados del cálculo de MM/GBSA de las diez mejores poses de los *cluster* más poblados de los enantiómeros R y S protonados. La media pone de manifiesto una mejor puntuación para el R que para el S.

Los estudios de *docking* se ampliaron al resto de la familia de compuestos ya sintetizados por el grupo y que tienen actividad conocida (Figura 4). Se ha realizado un *docking* con Autodock y se han analizado las poses de forma visual, los datos están en la Tabla 3.

La puntuación varía entre el compuesto activo y los no activos aproximadamente en 1 kcal/mol, excepto en el JHD1.6, que no varía. Por ello se realiza un cálculo de MM/GBSA, y en este caso sí que se observan diferencias significativas en la puntuación asignada al compuesto activo y a los no activos (Tabla 4).

Compuesto	Número de poses en <i>cluster</i> más poblado	Energía
VSP2.29	57	-3.96 kcal/mol
WP513	41	-2.72 kcal/mol
JHD1.5	34	-3.12 kcal/mol
JHD1.6	47	-4.04 kcal/mol

Tabla 3.- Resultados del *docking* de los compuestos derivados de WP519 obtenidos por Autodock.

Compuesto	Energía	Actividad
VSP2.29	-77.556	IC50=3.3µM
WP5.13	-59.428	6.5% inh @ 10µM
JHD1.6	-60.750	2.7% inh @ 10µM

Tabla 4.- Energía libre de unión obtenida de los cálculos de MM/GBSA. Se ha dejado de lado el compuesto JHD1.5 por su gran similitud con JHD1.6, y se ha cogido JHD1.6 porque era el que menos se diferenciaba del activo en el cálculo de *docking*.

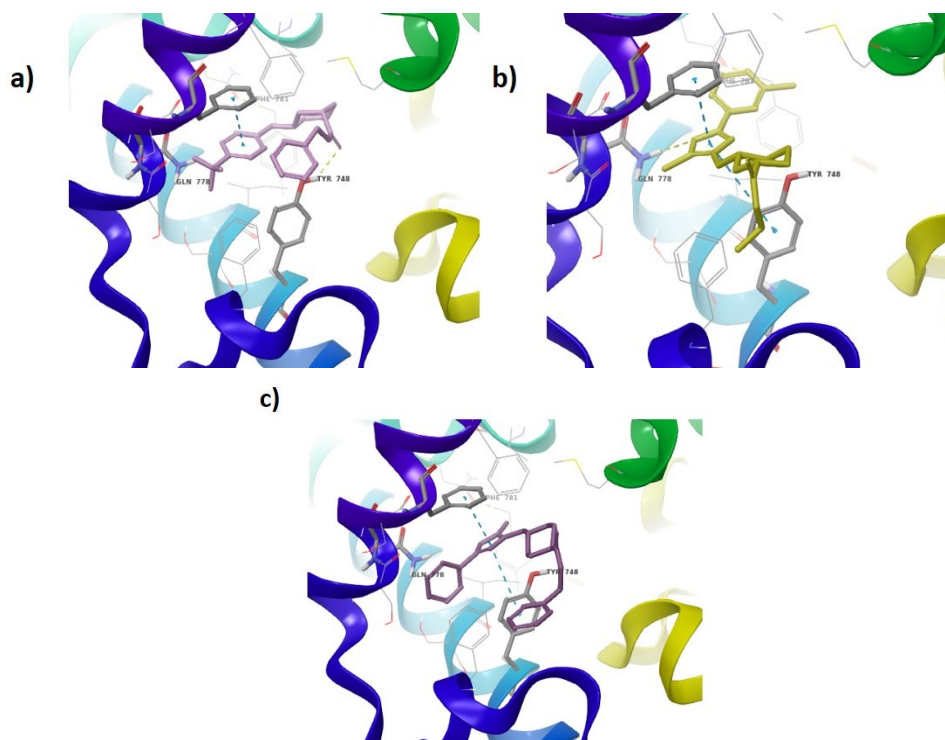


Figura 8.- a) Representación de la mejor pose obtenida para WP513. b) Representación de la mejor pose de JHD1.6. c) Representación de la mejor pose para VSP2.29

El análisis visual permite entrever algunas ideas interesantes: el compuesto VSP2.29, que es activo, orienta el anillo de cinco hacia la Gln778 y además, el hecho de eliminar la zona donde estaba el radical 3 parece que no afecta demasiado a la actividad (Figura 8C). El compuesto JHD1.6, también orienta el anillo de cinco hacia la Gln778 pero no interacciona con ella, porque al ser 1,4 disustituido no permite una conformación más plegada (Figura 8B). Por último el compuesto WP5.13, ha modificado el anillo de cinco por un sustituyente, que es el que se orienta hacia la Gln778, pero no le permite interaccionar con ella (Figura 8A). Toda esta información puesta en conjunto parece indicar que es el anillo de cinco y la interacción con la Gln778 lo que más contribuye a la actividad inhibitoria frente a esta enzima. Sin embargo, no explica porque hay tanta diferencia entre el enantiómero R y S de WP519, ya que ambos orientan la parte del anillo de cinco hacia la Gln778.



## Agradecimientos

A todos los Chemfinders, por ser como una gran familia. A Carmen, Valle, Julie y Ana, por hacer este trabajo posible.

A Carlos, Victor y Nuria, entre muchas cosas, por enseñarme este mundo y sus pequeñas victorias.

## Referencias

1. J. Gasteiger, 2016. *Chemoinformatics: Achievements and Challenges, a Personal View*. Vol. 21.
2. M. D. Varney, G. P. Marzoni, C. L. Palmer, J. G. Deal, S. Webber, K. M. Welsh, R. J. Bacquet, C. A. Bartlett, C. A. Morse, and C. L. Booth. 1992. "Crystal-Structure-Based Design and Synthesis of Benz[*Cd*]Indole-Containing Inhibitors of Thymidylate Synthase." *Journal of Medicinal Chemistry* 35 (4): 663-676.
3. M. von Itzstein, W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. Van Phan, M. L. Smythe, H. F. White, and S. W. Oliver. 1993. "Rational Design of Potent Sialidase-Based Inhibitors of Influenza Virus Replication." *Nature* 363 (6428): 418-423.
4. B. K. Shoichet, 2004. "Virtual Screening of Chemical Libraries." *Nature* 432 (7019): 862-865.
5. Kitchen, Douglas B., Helene Decornez, John R. Furr, and Jurgen Bajorath. 2004. "Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications." *Nat Rev Drug Discov* 3 (11): 935-949.
6. J. J. Irwin and B. K. Shoichet. 2016. "Docking Screens for Novel Ligands Conferring New Biology." *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (9): 4103-4120.
7. S. F. Sousa, P. A. Fernandes, and M. J. Ramos. 2006. "Protein-ligand Docking: Current Status and Future Challenges." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65 (1): 15-26.
8. C. Bissantz, B. Kuhn, and M. Stahl. 2010. "A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions." *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (14): 5061-5084.
9. S. Y. Huang, S. Z. Grinter, and X. Zou. 2010. "Scoring Functions and their Evaluation Methods for Protein-Ligand Docking: Recent Advances and Future Directions." *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* 12 (40): 12899-12908
10. W. L. Jorgensen, 2004. "The Many Roles of Computation in Drug Discovery." *Science (New York, N.Y.)* 303 (5665): 1813-1818.
11. A. Martinez, A. Castro, I. Dorronsoro, and M. Alonso. 2002. "Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibitors as New Promising Drugs for Diabetes, Neurodegeneration, Cancer, and Inflammation." *Medicinal Research Reviews* 22 (4): 373-384
12. A. Kannoji, S. Phukan, V. Sudher Babu, and V. N. Balaji. 2008. "GSK3beta: A Master Switch and a Promising Target." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12 (11): 1443-1455.
13. V. Le Guilloux, P. Schmidtke, and P. Tuffery. 2009. "Fpocket: An Open Source Platform for Ligand Pocket Detection." *BMC Bioinformatics* 10 (1): 1-11
14. V. Palomo, I. Soteras, D. I. Perez, C. Perez, C. Gil, N. E. Campillo, and A. Martinez. 2011. "Exploring the Binding Sites of Glycogen Synthase Kinase 3. Identification and Characterization of Allosteric Modulation Cavities." *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (24): 8461-8470.
15. V Sebastian, M. T. Manoli, D. I. Perez, C. Gil, E. Mellado, A. Martinez, E. A. Espeso, and N. E. Campillo. 2016. "New Applications for Known Drugs: Human Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors as Modulators of *Aspergillus Fumigatus* Growth." *European Journal of Medicinal* 116: 281-289.
16. S. Perez-Torres, R. Cortes, M. Tolnay, A. Probst, J. M. Palacios, and G. Mengod. 2003. "Alterations on Phosphodiesterase Type 7 and 8 Isozyme mRNA Expression in Alzheimer's Disease Brains Examined by in Situ Hybridization." *Experimental Neurology* 182 (2): 322-334.
17. A. Martinez and C. Gil. 2014. "CAMP-Specific Phosphodiesterase Inhibitors: Promising Drugs for Inflammatory and Neurological Diseases." *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24 (12): 1311-1321.
18. D. S Goodsell, G. M. Morris, and A. J. Olson. 1996. "Automated Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock." *Journal of Molecular Recognition : JMR* 9 (1): 1-5.
19. S. Genheden, and U. Ryde. 2015. "The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities." *Expert Opinion on Drug Discovery* 10 (5): 449-461.

20. W., Huanchen, Z. Yan, S. Yang, J. Cai, H. Robinson, and H., Ke. 2008. "Kinetic and Structural Studies of Phosphodiesterase-8A and Implication on the Inhibitor Selectivity." *Biochemistry* 47 (48): 12760-12768.
21. Schrödinger Release 2015-4: Jaguar, version 9.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
22. SYBYL-X 1.2, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA
23. Ramirez, D. and J. Caballero. 2016. "Is it Reliable to use Common Molecular Docking Methods for Comparing the Binding Affinities of Enantiomer Pairs for their Protein Target?" *International Journal of Molecular Sciences* 17 (4).
24. Schrödinger Release 2015-4: Maestro, version 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
25. Schrödinger Release 2015-4: Schrödinger Suite 2015-4 Protein Preparation Wizard; Epik version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Impact version 6.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Prime version 4.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
26. J.L. Banks; H.S. Beard; Y. Cao; A.E. Cho; W. Damm; R Farid.; A.K. Felts; T.A. Halgren; Mainz, D.T.; Maple, J.R.; Murphy, R.; Philipp, D.M.; Repasky, M.P.; Zhang, L.Y.; Berne, B.J.; Friesner, R.A.; Gallicchio, E.; Levy. R.M. 2005 Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *Journal of Computational Chemistry* . 26, 1752.
27. G. Morris, M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 2009, **16**: 2785-91