

Resumen del artículo:

“Structure-Based Discovery of Novel Non-nucleosidic DNA Alkyltransferase Inhibitors: Virtual Screening and in Vitro and in Vivo Activities”

En la actualidad se puede decir que todas las compañías farmacéuticas emplean métodos de química computacional o in-silico durante las etapas de búsqueda y desarrollo de fármacos de forma rutinaria. Los métodos in-silico, se clasifican como “basados en la estructura” si la estructura molecular de la proteína diana ha sido resuelta. Una de estas metodologías es el denominado “virtual screening” (VS). EL VS consiste en aplicar de forma iterativa métodos de mecánica molecular (MM) simplificados, también denominados “docking molecular”, sobre librerías digitales de sustancias. Los métodos de docking molecular (DM) permiten establecer un ranking basado en la energía de interacción proteína-ligando. Adicionalmente, el output de DM contiene las posibles orientaciones e interacciones con los residuos del sitio activo del sustrato. Conocida la orientación aproximada del ligando en el sitio activo, es posible mediante dinámica molecular (DM) estimar la contribución de la desolvatación a la energía libre de reacción, así como la contribución entrópica debida a los cambios conformacionales y así estimar la constante de equilibrio en disolución. Los métodos DM son una extensión del modelo MM y suponen la integración de las ecuaciones de movimiento en un espacio de tiempo definido. A diferencia de los métodos de MM, el coste computacional es muy exigente (desde horas, hasta días), y su aplicación esta hoy en día reducida a comparar grupos de sustancias y depurar energías de interacción de ligandos de la misma familia.

Una aplicación combinada de las técnicas de MM y DM la encontramos en el trabajo de Ruiz et. al descubrir el primer inhibidor no nucleosídico de la DNA alquiltransferasa (MGMT). El MGMT es una proteína de enorme importancia biomédica, que actúa reparando las alquilaciones del ADN producidas tanto por agentes naturales como por los tratamientos de quimioterapia, disminuyendo la eficacia de estos.

En la búsqueda de un inhibidor de MGMT se parte de una librería de 2.3₁ de sustancias obtenida de ZINC previamente filtrada mediante la regla de Lipinski. La estructura de MGMT se prepara a partir de la cadena A de la estructura 1T39 obtenida de PDB. El sitio activo de la proteína se estima a partir del ligando cocrystalizado E1X, seleccionando los residuos en un radio de 5 Å. Mediante GAGA se obtiene una imagen en negativo del sitio activo. El espacio de búsqueda es construido con CGRID. La librería de 2.3₁ es procesada con DOCK. Las sustancias que geoméricamente no entran en la imagen del sitio activo son desestimadas, y la energía de interacción de cada sustancia de las resultantes es rankeada mediante su zScore. Se desechan las sustancias con zScore >= 5, resultado un conjunto de 1664. El conjunto de sustancias obtenido es re-rankeado con CDOCK. En el cálculo de re-rankeado se permite girar a los rotameros de los ligandos y de los residuos. Igualmente, se estima y corrige con DelPhi la energía de desolvatación en función del área accesible a solvente. Entre los 1664 compuestos se seleccionan 17 para ensayos in-vitro, teniendo en cuenta sus propiedades físico-químicas y su energía de interacción con MGMT obtenida con CDOCK.

Los ensayos in-vitro de los 17 compuestos seleccionados muestran que únicamente 4 tienen actividad (IC₅₀) del orden de μM (los denominamos 1, 2, 3 y 4). La actividad in-vivo de los cuatro compuestos es testada en cultivos de células tumorales HTB-38. Para tres compuestos 1, 3 y 4, se confirma una actividad biológica del orden de 10 μM, el compuesto 2 se queda en 50 μM (según los autores por la posibilidad de que no pueda difundirse al interior de la célula).

La energía de interacción y las poses de los ligandos activos (1, 2, 3 y 4) es depurada mediante DM con el método MMGBSA. Se encuentra que los valores de energía obtenidos mediante DM están correlacionados con el IC₅₀ obtenido in-vitro. Igualmente, la energía de interacción y las orientaciones respecto del sitio activo (en especial los residuos TYR114, ARG128, ARG135 y TYR158) concuerdan con los datos experimentales existentes acerca del mecanismo de acción del MGMT.

En vista de los resultados, los cuatro ligandos pueden ser considerados como los primeros inhibidores de MGMT no nucleosídicos referenciados. Hay que añadir que pertenecen a dos familias de sustancias: quinolinonas (1,2) y triazopirimidinas (3,4). De esta forma se abre la puerta a futuros estudios de optimización de estos compuestos con vistas a su posible aplicación farmacológica.

Cálculos de docking realizados personalmente con estos cuatro compuestos empleando AutoDock y Molegro, muestran comportamientos similares (en cuanto a distribución de energía de interacción y modos de docking, ver información suplementaria) a los determinados mediante DM en este artículo.

Todos estos datos demuestran que actualmente que los métodos de la química computacional son fácilmente aplicables en investigación rutinaria en biomedicina y ofrecen información valiosa sobre el mecanismo de interacción de las dianas moleculares.

Comparación de valores de energía entre diversos métodos.

	AutoDock Total Intermolec. Energy	CDOCK energy	MMGBSA energy ^c	In.vitro IC ₅₀ (μM) ^d	In.vivo IC ₅₀ (μM) ^e
<input type="checkbox"/> lig1 to dnaprotein	-8.48 kcal/mol	-34.57	-32.26 (2.59)	54	10
<input type="checkbox"/> lig2 to dnaprotein	-9.98 kcal/mol	-31.91	-43.54 (3.35)	34	50
<input type="checkbox"/> lig3 to dnaprotein	-9.76 kcal/mol	-32.42	-46.52 (3.26)	24	10
<input type="checkbox"/> lig4 to dnaprotein	-9.19 kcal/mol	-32.37	-56.90 (3.24)	22	10

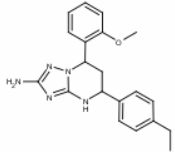
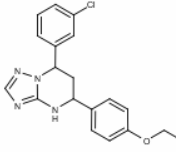
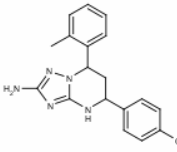
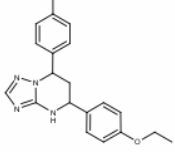
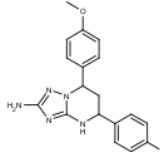
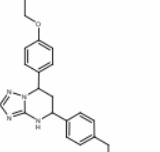
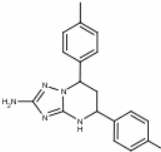
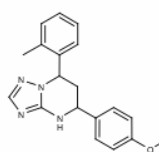
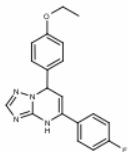
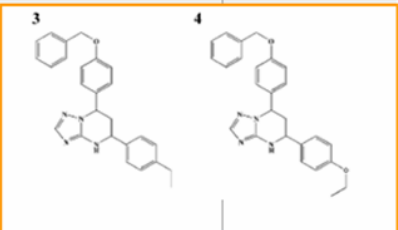
Comparación de los valores de energía entre compuestos similares al 3 obtenidos de PubChem.

<input type="checkbox"/> 5307592 1 to dnaprotein	-7.44 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5308189 1 to dnaprotein	-7.89 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5308531 1 to dnaprotein	-7.72 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5738746 1 to dnaprotein	-7.07 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5738751 1 to dnaprotein	-7.37 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5738766 1 to dnaprotein	-8.33 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5738856 1 to dnaprotein	-7.48 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5738914 1 to dnaprotein	-7.82 kcal/mol
<input type="checkbox"/> 5739219 1 to dnaprotein	-7.17 kcal/mol

Compuestos similares a Comp_3 testeados

MarvinView 5.2.3_1 BioActivity Analysis: 1 Bioassay and 1369 Substances (9 Tested)

File Edit View Table Tools Help

 49777033 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5738746 1	 49777123 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5738766 1	 49777260 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5208189 1	 49777603 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5308531 1																											
 49802721 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5307592 1	 49919742 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5738751 1	 49920295 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5738856 1	 49920592 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5738914 1																											
 49946804 PUBCHEM_COMPOUND_ID_TYPE: 0 PUBCHEM_CID_ASSOCIATIONS: 5739219 1			<p>Sim3 docking</p> <table border="1"> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5307592.1 to dnprotein</td><td>-7.44 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5308189.1 to dnprotein</td><td>-7.89 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5308531.1 to dnprotein</td><td>-7.72 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5738746.1 to dnprotein</td><td>-7.07 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5738751.1 to dnprotein</td><td>-7.37 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/></td><td>5738766.1 to dnprotein</td><td>-8.33 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5738856.1 to dnprotein</td><td>-7.48 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5738914.1 to dnprotein</td><td>-7.82 kcal/mol</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td>5739219.1 to dnprotein</td><td>-7.17 kcal/mol</td></tr> </table>	<input type="checkbox"/>	5307592.1 to dnprotein	-7.44 kcal/mol	<input type="checkbox"/>	5308189.1 to dnprotein	-7.89 kcal/mol	<input type="checkbox"/>	5308531.1 to dnprotein	-7.72 kcal/mol	<input type="checkbox"/>	5738746.1 to dnprotein	-7.07 kcal/mol	<input type="checkbox"/>	5738751.1 to dnprotein	-7.37 kcal/mol	<input checked="" type="checkbox"/>	5738766.1 to dnprotein	-8.33 kcal/mol	<input type="checkbox"/>	5738856.1 to dnprotein	-7.48 kcal/mol	<input type="checkbox"/>	5738914.1 to dnprotein	-7.82 kcal/mol	<input type="checkbox"/>	5739219.1 to dnprotein	-7.17 kcal/mol
<input type="checkbox"/>	5307592.1 to dnprotein	-7.44 kcal/mol																												
<input type="checkbox"/>	5308189.1 to dnprotein	-7.89 kcal/mol																												
<input type="checkbox"/>	5308531.1 to dnprotein	-7.72 kcal/mol																												
<input type="checkbox"/>	5738746.1 to dnprotein	-7.07 kcal/mol																												
<input type="checkbox"/>	5738751.1 to dnprotein	-7.37 kcal/mol																												
<input checked="" type="checkbox"/>	5738766.1 to dnprotein	-8.33 kcal/mol																												
<input type="checkbox"/>	5738856.1 to dnprotein	-7.48 kcal/mol																												
<input type="checkbox"/>	5738914.1 to dnprotein	-7.82 kcal/mol																												
<input type="checkbox"/>	5739219.1 to dnprotein	-7.17 kcal/mol																												

Autodock calculations

Docking calculations were carried out using DockingServer (<http://www.dockingserver.com>). The MMFF94 force field (Halgren, 1998) was used for energy minimization of ligand molecule using DockingServer. Gasteiger partial charges were added to the ligand atoms. Non-polar hydrogen atoms were merged, and rotatable bonds were defined.

Docking calculations were carried out on **MGMT** protein model. Essential hydrogen atoms, Kollman united atom type charges, and solvation parameters were added with the aid of AutoDock tools (Morris, Goodsell et al., 1998). Affinity (grid) maps of 25x25x25 Å grid points and 0.375 Å spacing were generated using the Autogrid program (Morris, Goodsell et al., 1998). AutoDock parameter set- and distance-dependent dielectric functions were used in the calculation of the van der Waals and the electrostatic terms, respectively.

Docking simulations were performed using the Lamarckian genetic algorithm (LGA) and the Solis & Wets local search method (Solis and Wets, 1981). Initial position, orientation, and torsions of the ligand molecules were set randomly. Each docking experiment was derived from 100 different runs that were set to terminate after a maximum of 2500000 energy evaluations. The population size was set to 150. During the search, a translational step of 0.2 Å, and quaternion and torsion steps of 5 were applied.

References

Bikadi, Z., Hazai, E.

Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock
 J. Cheminf. **1**, 15 (2009)

T. A. Halgren

Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parametrization, and performance of MMFF94
 Journal of Computational Chemistry **17** (5-6), 490-519 (1998)

G. M. Morris, D. S. Goodsell, et al.

Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function
 Journal of Computational Chemistry **19** (14), 1639-1662 (1998)

F. J. Solis and R. J. B. Wets

Minimization by Random Search Techniques
 Mathematics of Operations Research **6** (1), 19-30 (1981)

Reproducción de las interacciones del compuesto 3 con MGMT realizada con Molegro.

Mecanismo propuesto

- La mutación del residuo **CYS145** inactiva a la MGMT
- El residuo **ARG128** se introduce en el interior de la doble hélice.
- La base dañada se coloca en un hueco hidrofóbico formada por los residuos sitio activo **VAL155 - GLY160** y la cadena lateral de **MET134**.
- Los grupos carbonilo de **SER145** y **VAL148** pueden aceptar enlaces de hidrogeno del grupo amino de la base dañada.
- Los residuos **TYR114** y **SER159** pueden donar puentes de hidrogeno a la base dañada
- El residuo **TYR114** parece facilitar el posicionamiento de la base dañada en el hueco activo de la proteína.

Molecule	Resid	ID	Total
1T39 [A]	Tyr	158	-52.3076
1T39 [A]	Cys	145	-22.8564
1T39 [A]	Ser	159	-20.4773
1T39 [A]	Tyr	114	-19.7234
1T39 [A]	Asn	157	-16.0484
1T39 [A]	Arg	135	-14.6748
1T39 [A]	Asn	137	-11.0512
1T39 [A]	Pro	140	-10.879
1T39 [A]	Lys	165	-4.32936
1T39 [A]	Gly	131	-3.98796
1T39 [A]	Val	130	-3.42405
1T39 [A]	Gly	160	-3.22319
1T39 [A]	Met	134	-3.14916
1T39 [A]	Leu	33	-1.67402
1T39 [A]	Pro	138	-1.1134
1T39 [A]	His	146	-0.441859
1T39 [A]	Val	148	4.7325

El problema biomédico

Análisis del título

J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 844–854

**Structure-Based Discovery of Novel Non-nucleosidic DNA Alkyltransferase Inhibitors:
Virtual Screening and in Vitro and in Vivo Activities**

Federico M. Ruiz,[†] Rubén Gil-Redondo,[‡] Antonio Morreale,[‡] Ángel R. Ortiz,^{*,‡}
Carmen Fábrega,^{*,†} and Jerónimo Bravo^{*,†}

- ¿Descubrimiento de un inhibidor basándose en la estructura de una proteína?
- ¿inhibidor no nucleosídico del DNA alquiltransferasa?
- ¿Virtual screening? ¿magia negra?
- ¿Qué tiene que ver el la actividad in-vitro/in-vivo con el virtual screening?

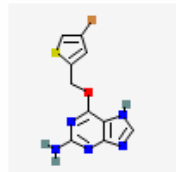
El problema biomédico

DNA-repair O6-alkylguanine DNA alkyltransferase (MGMT or hAGT)

- Es una proteína que se encarga de reparar los daños al ADN producidos por los agentes alquilantes del entorno.
- Juega un importante papel en la resistencia de los tumores a los tratamientos de quimioterapia ya que
- El mecanismo de acción de los agentes alquilantes citotóxicos empleados en la quimioterapia (**streptozotocin, procarbazine, or dacarbazine**) es atacar a la guanina del ADN en diversas posiciones.
- Las células tumorales expresan niveles altos de DNA alquiltransferasa.
- La DNA alquiltransferasa genera resistencia a los agentes alquilantes disminuyendo la efectividad de la quimioterapia.
- Se ha comprobado que la metilación del promotor de MGMT está asociado con una mayor supervivencia de los pacientes tratados con quimioterapia.
- Los inhibidores de MGMT encontrados hasta el momento son derivados nucleosídicos que actúan inactivando el residuo CYS145. Tienen limitaciones terapéuticas por su baja solubilidad. Ejemplo: Lomeguatrib

1: CID: 3025944

Gene, OMLM, Taxonomy, Parent Compound, Similar Compounds, Similar Conformers, PubChem Same Substances, PubMed MeSH Keyword Summary, PubMed Citations, PMC Articles, PubMed (MeSH Keyword), MeSH Keyword



Lomeguatrib; PaTrin 2; Lomeguatrib [INN] ...

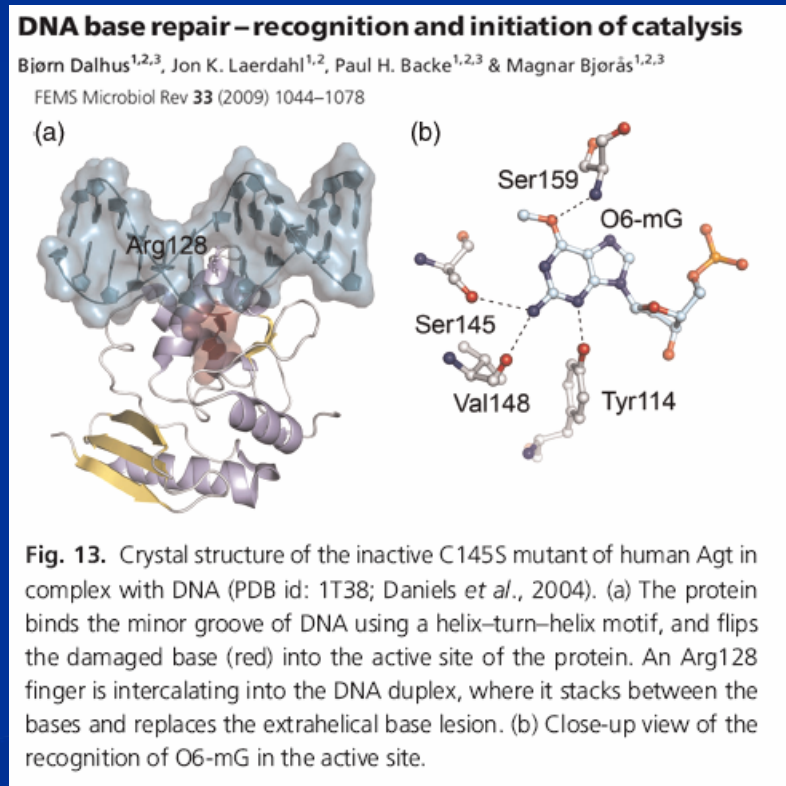
IUPAC: 6-[(4-bromothiophen-2-yl)methoxy]-7H-purin-2-amine

MW: 326.172420 g/mol | MF: C₁₀H₈BrN₅OS

El problema biomédico

Mecanismo de acción de MGMT

- El mecanismo se puede inferir a través de la estructura (estructura-función)
- Las estructuras por RX de MGMT asociadas a fragmentos de ADN con guaninas metiladas en O-6 (Daniels et al., 2004; Duguid et al., 2005) muestran un posible mecanismo de reacción:
 - La mutación del residuo CYS145 inactiva a la MGMT
 - El residuo ARG128 se introduce en el interior de la doble hélice.
 - La base dañada se coloca en un hueco hidrofóbico formada por los residuos sitio activo VAL155 - GLY160 y la cadena lateral de MET134.
 - Los grupos carbonilo de SER145 y VAL148 pueden aceptar enlaces de hidrógeno del grupo amino de la base dañada.
 - Los residuos TYR114 y SER159 pueden donar puentes de hidrógeno a la base dañada
 - El residuo TYR114 parece facilitar el posicionamiento de la base dañada en el hueco activo de la proteína.



Como afrontar el problema desde el punto de vista in-silico

- El problema se puede tratar mediante muchos puntos de vista.
- Dependiendo de
 1. ¿Qué información queremos obtener? ¿cabeza de serie? ... ¿sitio activo? ¿optimizar ligando?
 2. ¿Qué información disponemos? ... ¿Algún ligando? ¿estructura? ... ¿mecanismo?

British Journal of Pharmacology (2007) 152, 21–37

In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond

S Ekins^{1,2}, J Mestres³ and B Testa⁴

Comprehensive ("global") *in silico* predictive methods
Methods applicable to versatile biological systems
(i.e., many enzymes and many reactions)

• **Meta-systems combining A) docking, 3D-QSAR, MO, and B) a number of enzymes and other functional proteins** (*MetaDrug*TM, etc);

→ nature of major and minor metabolites, adduct-forming metabolites, metabolic trees, induction, inhibition, transport, etc.

• **Databases** (*Metabolite, Biotransformations*)

→ nature of major and minor metabolites, reactive/adduct-forming metabolites, ...

• **Expert systems (and their databases)**

(*Meta, MetabolExpert, Meteor*)

→ nature of major and minor metabolites, metabolic trees, reactive/adduct-forming metabolites,

Specific ("local") *in silico* predictive methods
(Methods applicable to simple biological systems
(e.g., a single enzyme) or to a single reaction.

• **QSAR** (linear, multilinear, multivariate, ...)

→ affinities, relative rates, ...
depending on the physicochemical properties considered

• **3D-QSAR** (*CoMFA, Catalyst, GRID/GOLPE, ...*)

→ substrate behaviour, relative rates, inhibitor behaviour, ...

• **Molecular modelling and docking:**

→ ligand yes or no (substrate? inhibitor?), regioselectivity, ...

• **Quantum mechanical** (MO) methods (*ab initio, semi-empirical*):

→ regioselectivity, mechanisms, relative rates, ...

• **Expert systems combining docking, MO and 3D-QSAR**

(*MetaSite, ...*)

Como afrontar el problema desde el punto de vista in-silico

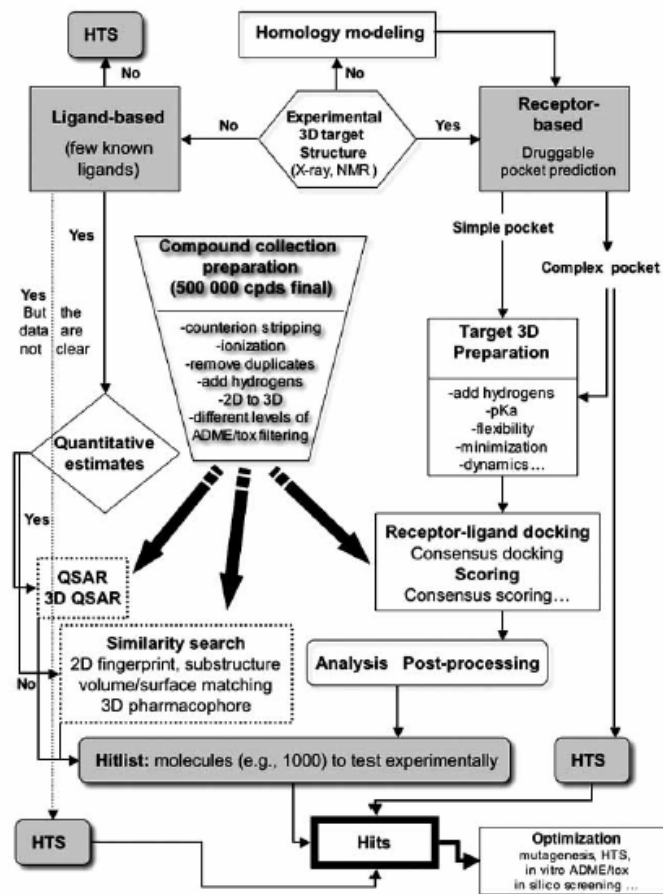
Elección de la estrategia – visión general

- El proceso de descubrimiento de dianas moleculares es una combinación de métodos in-silico y experimentales.
- La estrategia depende de los datos disponibles sobre el problema.
- Siempre hace falta un punto de partida ... ligando Proteína Mecanismo ...
- Al final siempre hay que comprobar experimentalmente la actividad del ligando....

■ Datos que disponemos:

1. Existen estructuras de RX de la proteína en interacción con el DNA.
2. El mecanismo está definido
3. Existen ligandos inhibidores

Current Protein and Peptide Science, 2007, 8, 381-411



In silico Drug Discovery

¿Qué queda fuera del alcance de un método de screening?

- Al final siempre hay que comprobar experimentalmente la actividad del ligando.... Y otras cosas ..

Current Protein and Peptide Science, 2007, 8, 381-411

Fig. (2). ADME/tox: properties that make a compound “drug-like”

For a compound to become a successful drug, it needs not only to perform the right molecular interactions with its target, but also to be processed correctly by the body. For most projects the ideal compound is soluble, able to pass through the gut wall, not broken down too quickly by liver enzymes and has a minimal affinity to fatty tissues and blood proteins. Collectively these properties are known as the ADME properties (for absorption, distribution, metabolism and excretion). In addition, a compound should exist in the body long enough to have a therapeutic effect, this is often referred to as its pharmacokinetics properties.

Safe

- No toxic metabolites
- No drug-drug interactions
- No undesirable off-target effects

Efficacious

- Adequate potency
- Desired pharmacological effect

Available to targets

- Cross appropriate biological barriers

Half-life

- Persists in the body long enough

Easy to handle

- Right solubility, rate of dissolution and chemical stability

Métodos - Pero, ¿Qué es el modelado molecular?

- **El Modelado molecular es un término general que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar o imitar el comportamiento de moléculas.**
- **Las técnicas son utilizadas en los campos de**
 - la Química computacional,
 - Biología computacional y Ciencia de materiales
 - para el estudio de sistemas moleculares que abarcan desde pequeños sistemas químicos a grandes moléculas biológicas y disposiciones materiales.
- **La complejidad de los cálculos requiere el uso de computadores. La característica particular de las técnicas de modelado es la descripción a nivel atómico de los sistemas moleculares; el menor nivel de información es por átomos individuales (o un pequeño grupo de átomos).**

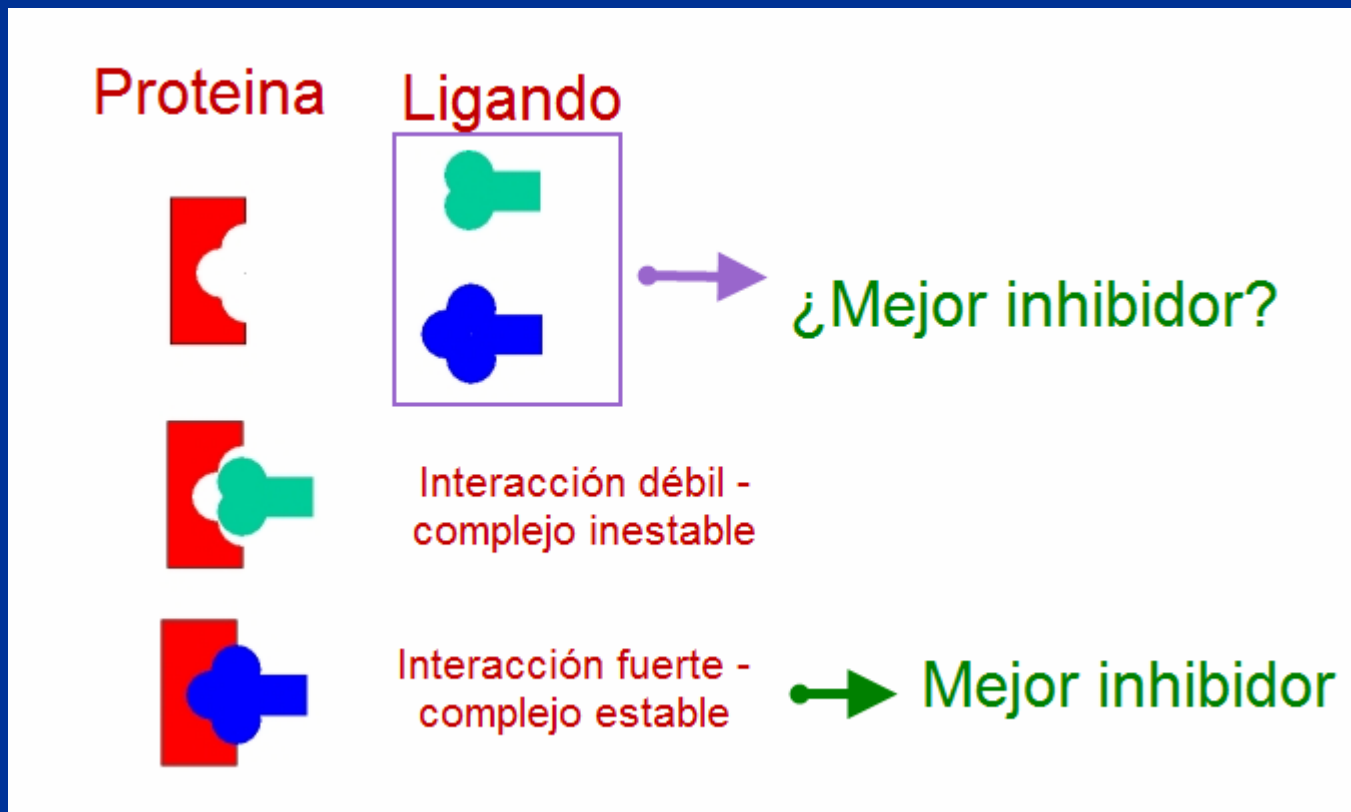
¿Que es el modelado molecular?

- **Los métodos de modelado molecular son usados rutinariamente en la actualidad para investigar la estructura, dinámica y termodinámica de sistemas inorgánicos, biológicos y poliméricos.**
- **Los tipos de actividad biológica que han sido investigados usando modelado molecular incluyen:**
 - plegamiento proteico,
 - catálisis de enzimas,
 - estabilidad de proteínas, cambios conformacionales asociados con la función biomolecular,
 - reconocimiento molecular de proteínas, ADN, y complejos de membranas.

Modelado molecular

Complementariedad molecular

- La forma “molecular” es una primera aproximación al problema.
- La energía de interacción depende de las restricciones estéricas.



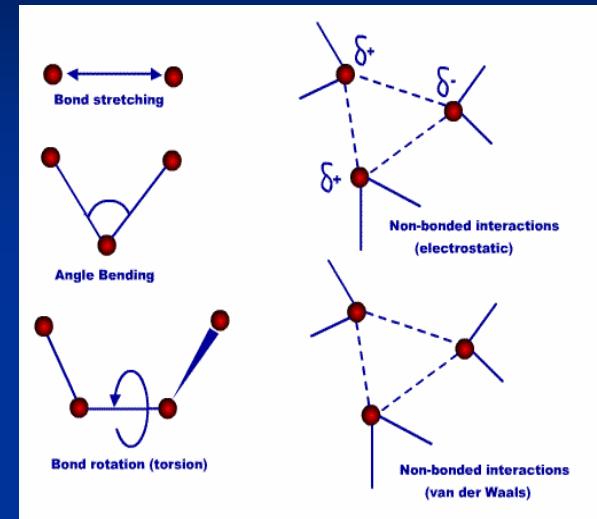
Modelado molecular

Mecánica molecular-Dinámica molecular

- Las moléculas se representan como un conjunto de partículas (átomos) a los cuales se les asignan coordenadas en el espacio cartesiano o en Coordenadas internas.
- Las partículas tienen masa y una distribución electrostática (carga, momento dipolar, etc)
- y también se les pueden asignar velocidades al realizar simulaciones dinámicas.
- Las velocidades atómicas están relacionadas con la temperatura del sistema y su entropía.
- La expresión matemática completa se conoce como una función potencial y está relacionada a la energía interna del sistema.
- Los métodos que minimizan la energía potencial, son conocidos como técnicas de minimización de energía
- Mientras que los métodos que recrean el comportamiento del sistema con el tiempo son conocidos como Dinámica molecular.

Modelado molecular-Mecánica molecular

- La Mecánica molecular es una parte del modelado molecular, ya que implica el uso de mecánica clásica/mecánica newtoniana para describir las bases físicas tras los modelos.**
 - Los modelos moleculares describen normalmente átomos como cargas puntuales con una masa asociada.
 - Las interacciones entre los átomos vecinos son descritas por interacciones tipo oscilador armónico, "muelles", que (representando enlaces químicos)
 - Las fuerzar intermoleculares se representan como Fuerzas de van der Waals. (Potencial de Lennard-Jones)
 - Las interacciones electrostáticas son calculadas por la Ley de Coulomb.



$$V(R)_{\text{total}} = V(R)_{\text{internal}} + V(R)_{\text{external}}$$

$$V(R)_{\text{internal}} = \sum_{\text{bonds}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} K_\chi [1 + \cos(n\chi - \sigma)]$$

$$V(R)_{\text{external}} = \sum_{\text{nonbonded atom pairs}} \left(\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}} \right)$$

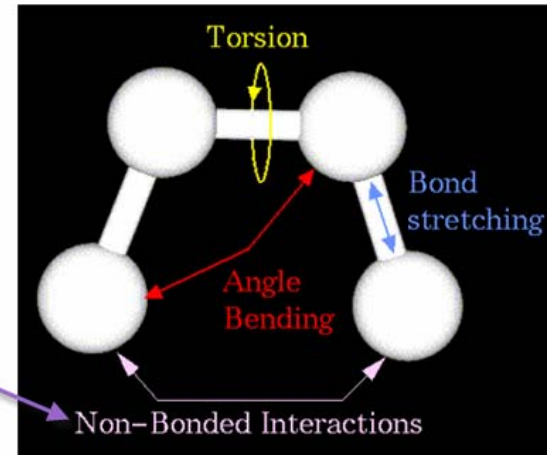
Modelado molecular-Mecánica molecular

Energía del sistema

$$V(R)_{\text{total}} = V(R)_{\text{internal}} + V(R)_{\text{external}}$$

$$V(R)_{\text{internal}} = \sum_{\text{bonds}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} K_\chi[1 + \cos(n\chi - \sigma)]$$

$$V(R)_{\text{external}} = \sum_{\text{nonbonded atom pairs}} \left(\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}} \right)$$



- La energía de interacción entre un ligando (fármaco) y una proteína (receptor) se puede estimar mediante este mismo procedimiento.
- A mayor energía de interacción (más negativa) más estabilidad.
- Los valores de energía de interacción permiten comparar las constantes de inhibición entre dos ligandos.
- La energía de interacción calculada de esta forma es una aproximación ya que es estática y no tiene en cuenta la termodinámica del sistema.

Modelado molecular-Dinámica molecular

- La dinámica molecular permite introducir la contribución energética de la entropía del sistema.
- La estructura de la proteína es flexible y cambiante durante la interacción con el ligando.
- Se obtiene una evaluación mas realista de la energía de interacción

Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design

Hernán Alonso,¹ Andrey A. Bliznyuk,² Jill E. Gready¹

¹Computational Proteomics Group, John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra ACT 0200, Australia
²ANU Supercomputer Facility, The Australian National University, Canberra ACT 0200, Australia

Published online 6 June 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/med.20067

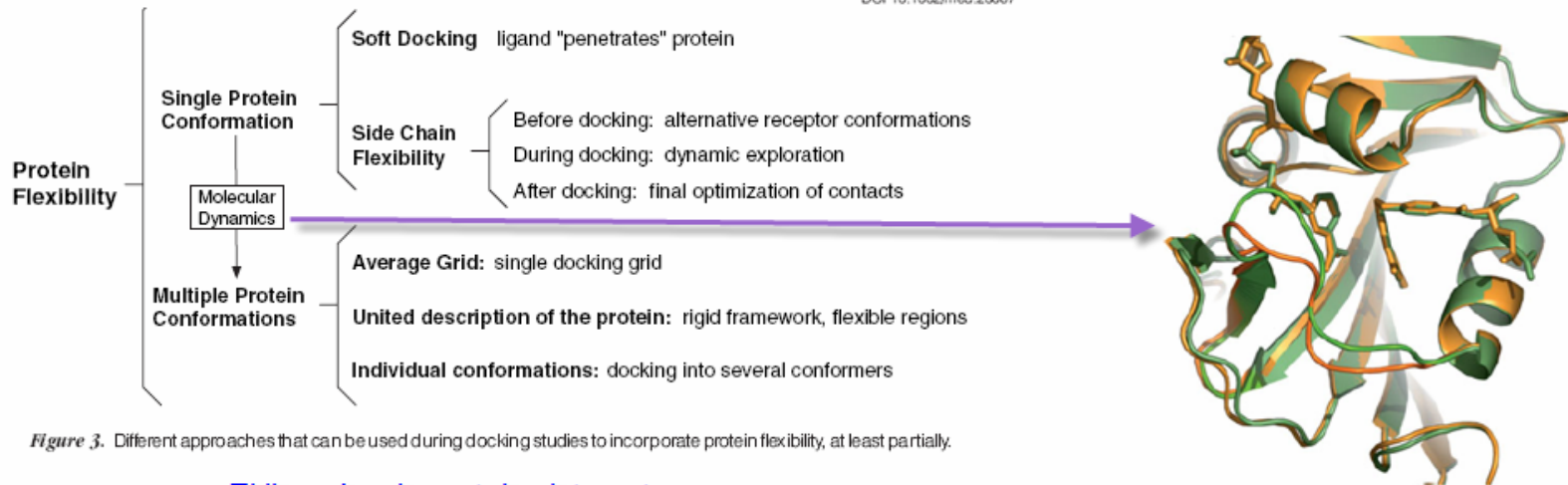


Figure 3. Different approaches that can be used during docking studies to incorporate protein flexibility, at least partially.

El ligando y la proteína interactúan.

Figure 4. The flexibility of proteins is clearly shown in these two superimposed ternary complexes of the enzyme dihydrofolate reductase with folate and NADP⁺ (1RA2 and 1RX2). The flexible loop has been shown to adopt different conformations during the catalytic process; here it is seen "frozen" in the open (orange) and closed (green) states in two different crystal forms of the same complex.

Modelado molecular-Dinámica molecular

- La dinámica molecular permite introducir la contribución energética de la entropía del sistema y el efecto de la solvatación.
- La estructura de la proteína es flexible y cambiante durante la interacción con el ligando.
- Se obtiene una evaluación mas realista de la energía de interacción

RECEPTOR-LIGAND COMPLEX

ΔS_{rot}
LIGAND IN SOLUTION

ΔH_{LW}

RECEPTOR

ΔH_{RW}

BOUND WATER

FREE ROTATION

ΔS_{int}

LOOSELY ASSOCIATED WATER MOLECULES

FREE WATER

ΔH_{LR}

ΔS_{vib}

ΔS_w

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
Gibbs-Helmholtz Equation

G-FREE ENERGY
H- ENTHALPY
S-ENTROPY
T- TEMPERATURE

Multiple steps in the receptor – ligand interaction:

- Approach
- Desolvation of the ligand and the binding site of a protein
- Penetration into the protein cavity
- Change of the ligand orientation
- Adoption of the correct “active” conformation
- Establishing of new H-bonds, electrostatic and hydrophobic contacts

In general free energy function is formed from several terms

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elect} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Modelado molecular-Dinámica molecular

- La dinámica molecular permite introducir la contribución energética de la entropía del sistema y el efecto de la solvatación.
- La estructura de la proteína es flexible y cambiante durante la interacción con el ligando.
- Se obtiene una evaluación mas realista de la energía de interacción

Comparison of the protein-protein interfaces in the p53-DNA crystal structures: Towards elucidation of the biological interface

3988-3993 | PNAS | March 15, 2005 | vol. 102 | no. 11

Buyong Ma^{1*}, Yongping Pan², K. Gunasekaran³, R. Babu Venkataraghavan¹, Arnold J. Levine^{2*}, and Ruth Nussinov^{2,3*}

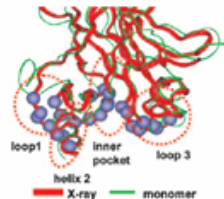
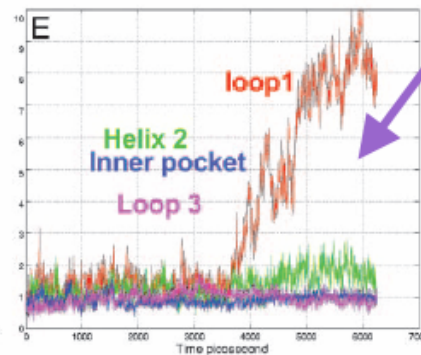
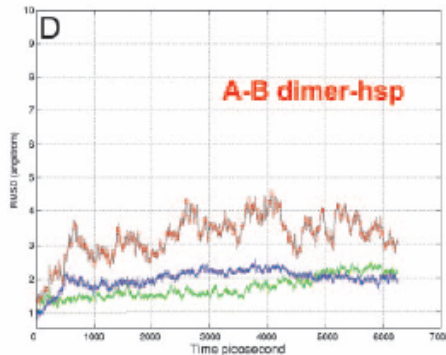
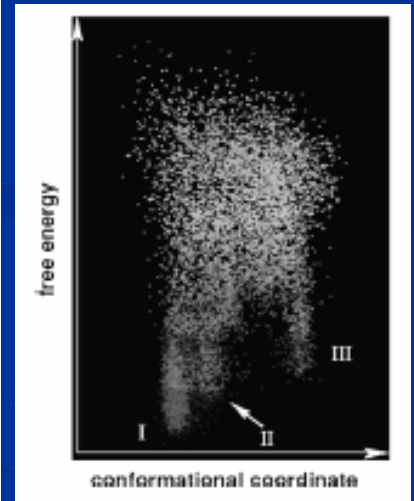


Fig. 1. Definition of structure and dynamics of p53 CID. The red ribbon represents the B chain in the crystal structure. The green ribbon is a snapshot from a monomer simulation.



$$F_i = -\frac{\partial V(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)}{\partial \mathbf{r}_i}$$

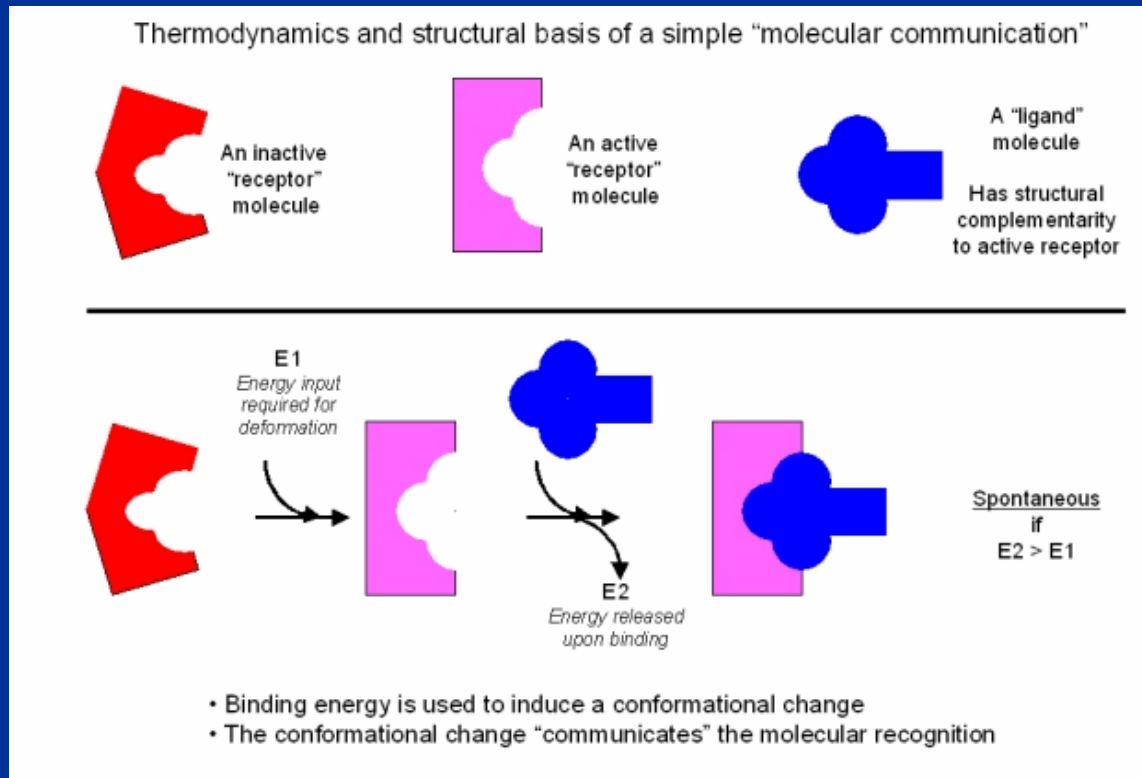
$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = F_i$$



Modelado molecular

Docking – Importancia de la estructura de la proteína

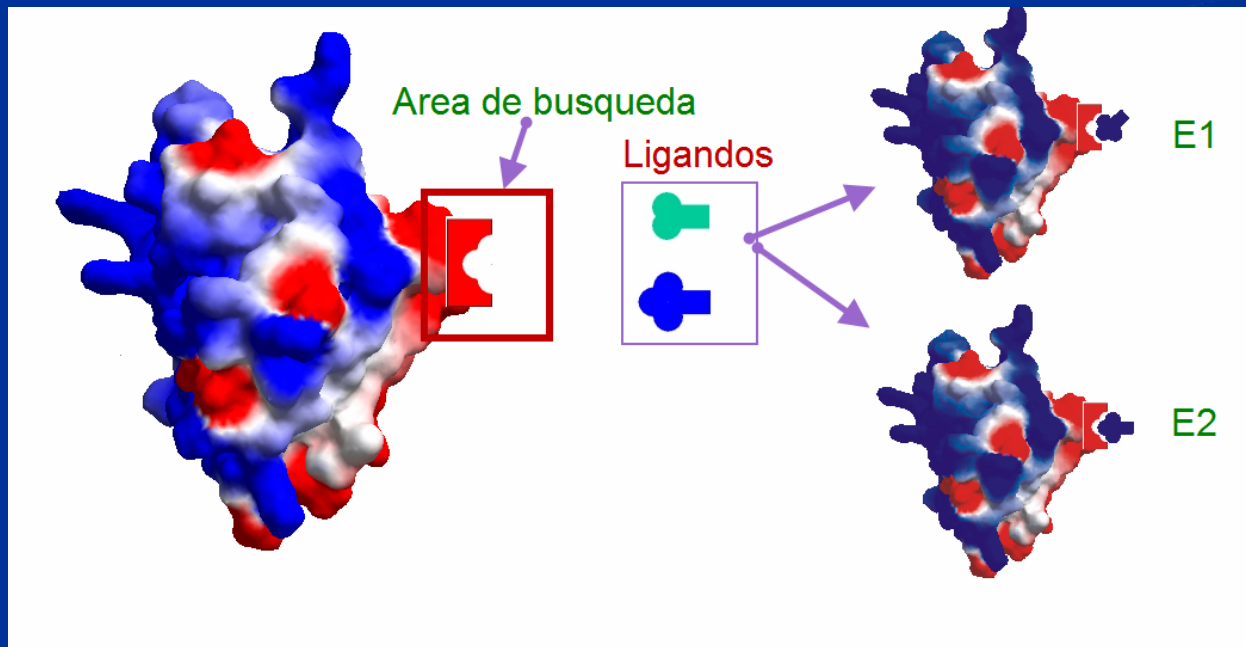
- Nos interesa que la estructura de la proteína de partida este en su posición activa.
- Co-cristalizada con un ligando >>> alternativa Dinámica molecular



Modelado molecular

Docking y virtual screening

- El docking molecular es buscar la conformación más estable para un ligando dado y una proteína.
- Se define un área de búsqueda de la mejor conformación en una zona de la proteína.
 - Es un grid sobre el cual se va situando el ligando rotándolo y sucesivamente calculando su energía.
- Se obtiene un conjunto de poses (posiciones en el grid) o configuraciones valoradas por un “score” basado en la complementariedad molecular y la energía de interacción.



Modelado molecular

Docking y virtual screening

Virtual screening es hacer docking sobre una librería de ligandos o fármacos potenciales.

- Obtendremos un listado ordenado de ligandos según su energía
- Dependiendo del modelo aplicado obtendremos mayor o menor precisión
- A mayor complejidad del modelo más tiempo de cálculo (ligandos y residuos rotables)

PROTEIN - LIGAND DOCKING

Rigid Docking

- Virtual HTS
- Structural diversity
- Multi-site ranking of docking poses

*Existing molecules
One docking pose
per site/molecule*



Molecular database
(millions of molecules)

Flexible Docking

- Single/few molecule
- Conformational diversity
- Single site ranking of docking poses

*Systematic scan
Multi-pose output*



Single molecule

BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS. VOL 10. NO 5. 579-591
Advance Access publication May 11, 2009

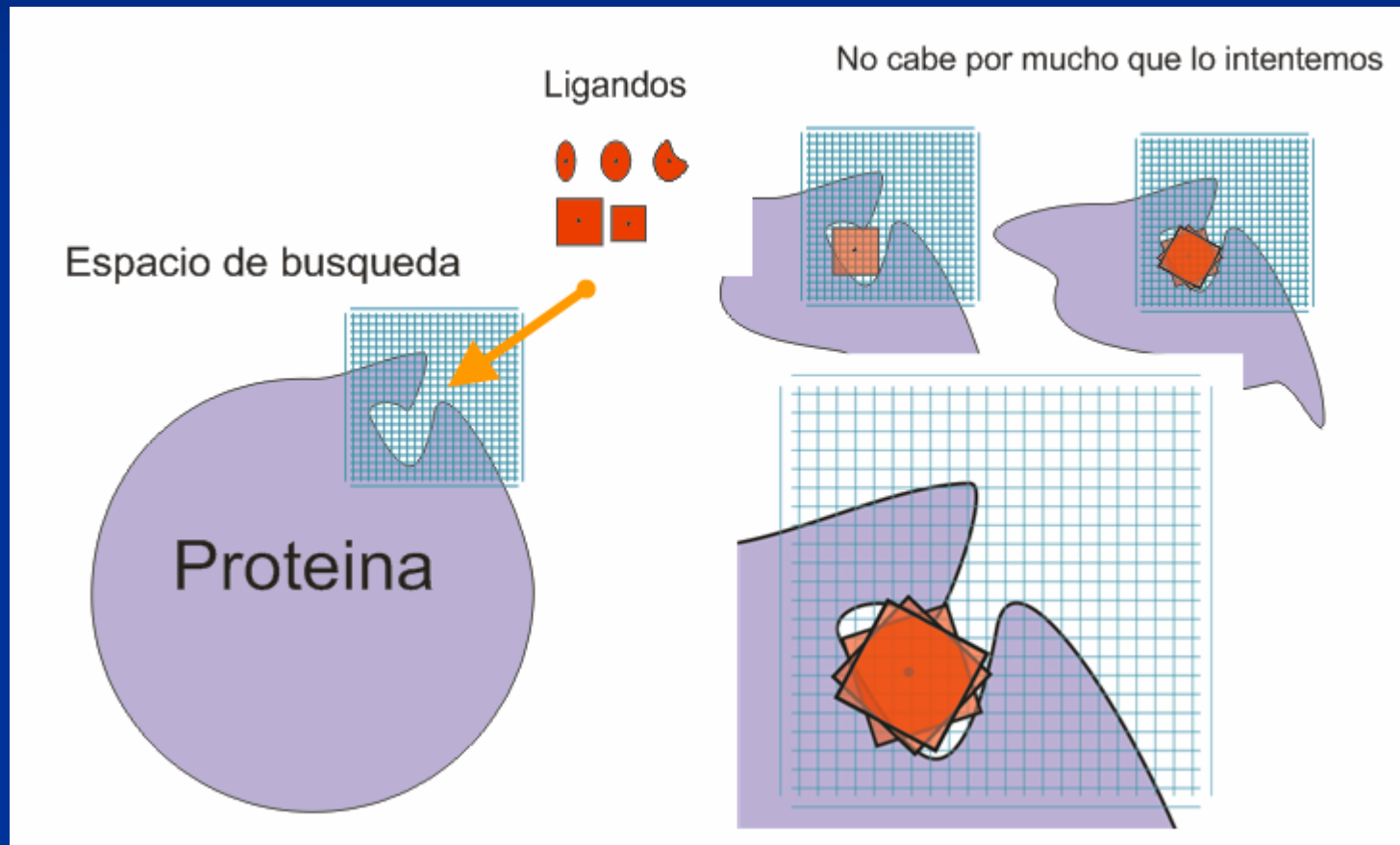
Table I: Some small molecule databases reviewed in this article

Name	URL
PubChem	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
ACD	http://www.mdli.com
ZINC	http://zinc.docking.org/
LIGAND	http://www.genome.jp/ligand/
DrugBank	http://www.drugbank.ca/
ChemDB	http://cdb.ics.uci.edu/

Modelado molecular

Docking y virtual screening

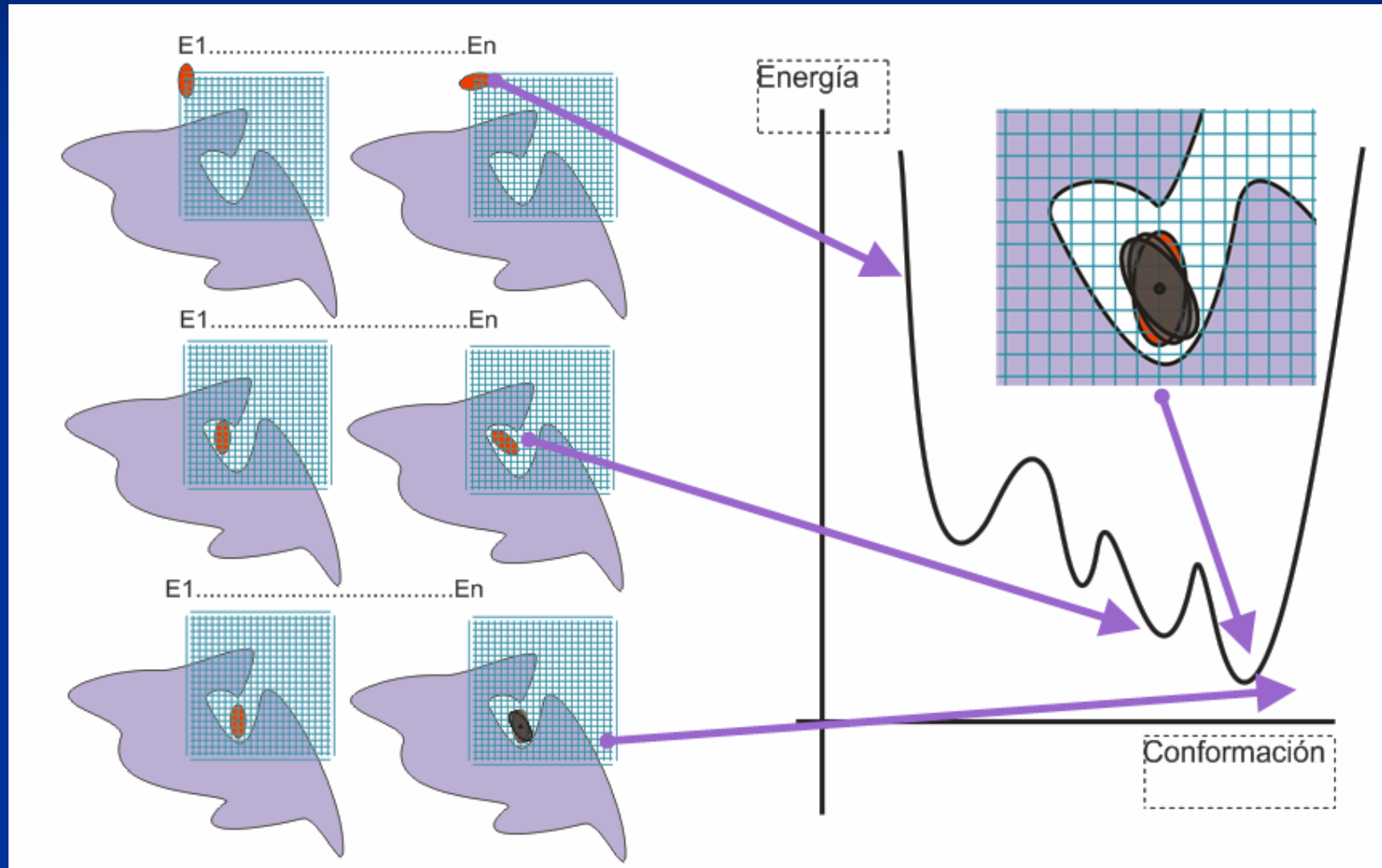
Virtual screening es hacer docking sobre una librería de ligandos o fármacos potenciales. Espacio de búsqueda de la mejor conformación



Modelado molecular

Docking y virtual screening

Virtual screening es hacer docking sobre una librería de ligandos o fármacos potenciales.



Modelado molecular

Docking y virtual screening

- Por ejemplo

Molegro Virtual Docker Batchjob (Finished)

Batchjob started: dom 17. ene 21:10:28 2010. Elapsed: 00:12:14

Finish (estimated): 21:22:45. Remaining: 00:00:03

Working path: C:/Program Files/Molegro/MVD/examples/DockingOutput

Docking progress (4 / 4 ligands) 100%

Current ligand (2 / 2 runs) 100%

Log Poses (current ligand) [2] Poses (all) [8] Graph Current script

Filename	Ligand	MolDock Score [GRID] (*)	MolDock Score	Rerank Score	Torsions
[01] C4.mol2	C4	22228.5	22155.4	581.584	7
[01] C3.mol2	C3	22282.5	22122.2	385.495	6
[00] C4.mol2	C4	22373	22171.4	429.153	7
[00] C3.mol2	C3	32134.2	22097.1	359.45	6
[00] C1.mol2	C1	35677.4	35466.6	1096.32	7
[01] C1.mol2	C1	35745.5	35579.1	1528.51	7
[01] C2.cdx.mol2	C2.cdx	39073.7	38467.8	1417.51	6
[00] C2.cdx.mol2	C2.cdx	40829.1	40571.8	1952.03	6

(*) Scoring values obtained before post-processing poses (energy minimization and hydrogen bond optimization).

Results: ...egro/MVD/examples/DockingOutput/DockingResults.mvdresults

Status: Finished.

Pause Close

Mejor puntuación

Resolución del problema

Estrategia de docking

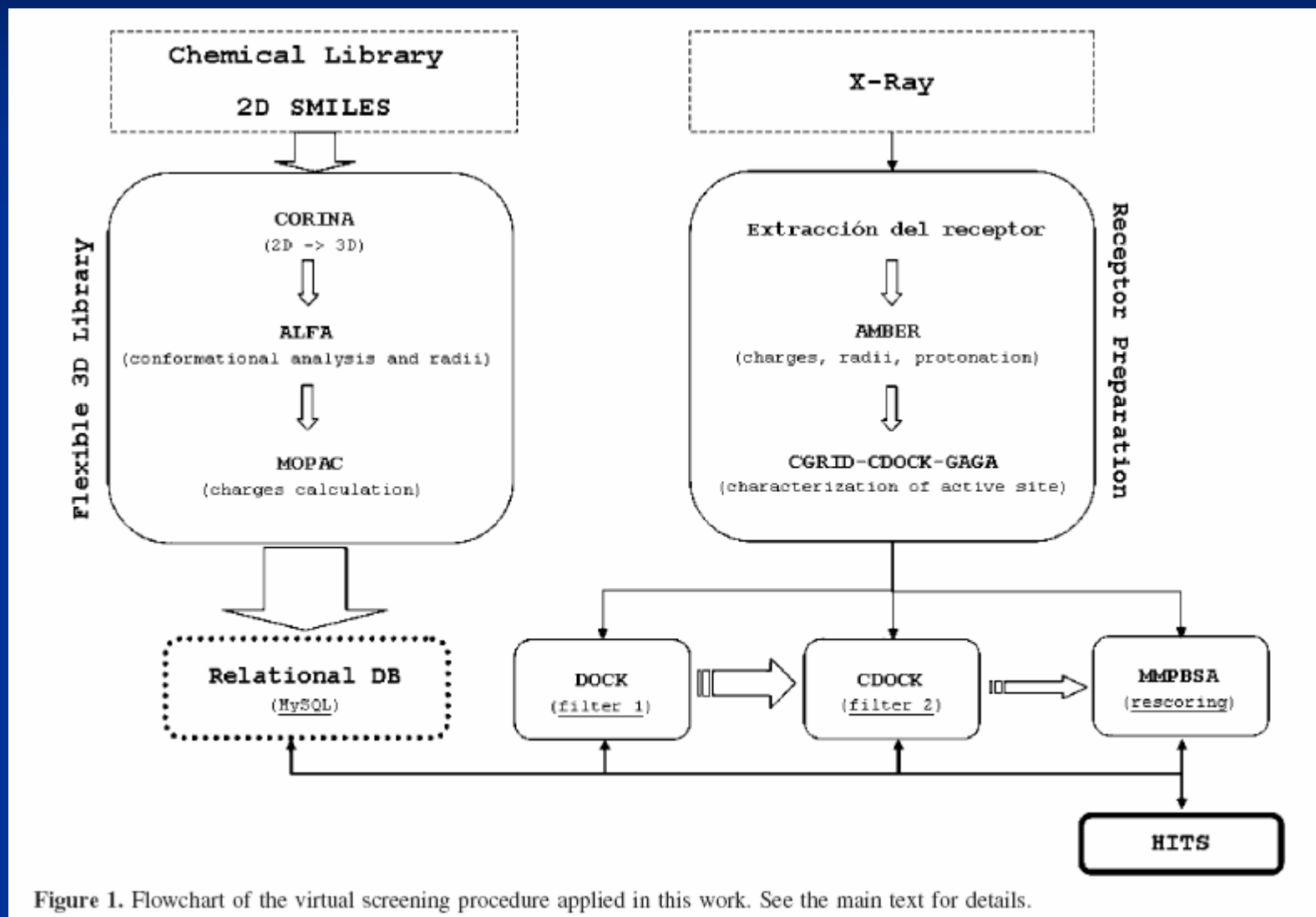


Figure 1. Flowchart of the virtual screening procedure applied in this work. See the main text for details.

Resolución del problema

Librería de compuestos - preparación

- Se parte de una librería de 2.6 millones de compuestos.
- Se procesa la librería para convertir los ficheros de coordenadas de 2D a 3D.
- Se asignan las cargas a los átomos con MOPAC con un campo de fuerzas tipo AMBER
- Se establecen los enlaces que pueden girar (rotámeros) y se eliminan los que no cumplen la regla de Lipinsky Quedan 2.3 millones

UCSF University of California, San Francisco | About UCSF | Search UCSF | UCSF Medical Center

Shoichet Laboratory docking.org

Property Subsets

A free database for virtual screening
ZINC
is not commercial

Home Subsets HELPI Mailing Lists

Ready-to-download subsets of ZINC filtered by physical properties are available below. To go to the download page, click on the browse sample compounds, click on the number of compounds. Three versions of subsets are available:

- Standard subsets, numbers 1-10 (for delivery in 1-10 weeks)
- "clean" subsets, numbers 11-20, in which stricter filtering rules have been applied
- "immediate availability subsets", numbers 21-30 (for delivery in 7-14 days max)

More about ZINC subsets is [here](#). You can also create your own [minisubset](#). ZINC may be used free of charge for research by its institutions. **Whereas you are free to share the results of a ZINC search or a screen of molecules from ZINC, you may major portions of ZINC without the express written permission of John Irwin.**

Subset Click to download and Description	Compounds Click to browse	Last Update	Selection criteria	Only one source	T<.9	T<.8
lead-like (#1) Teague, Davis, Leeson, Oprea, Angew Chem Int Ed Engl. 1999 Dec 16;38(24):3743-3746.	1476972	2010-01-14	p.xlogp < 3.5 and p.mwt < 350 and p.rb <= 7	299987	N/A	N/A
fragment-like (#2) Carr RA, Congreve M, Murray CW, Rees DC.	458080	2009-11-18	p.xlogp <=2.5 and p.mwt <=250 and p.rb <= 5	199485	N/A	N/A

Regla de Lipinski (Lipinski's Rule of Five) (biodisponibilidad via oral)

- nº dadores de enlaces de Hidrógeno < 5
- nº aceptores de enlaces de Hidrógeno < 10
- Log P < 5 [Calculado a partir del coeficiente de reparto (agua/ n-octanol)]
- M. W. < 500
- Se consideran excepciones los sustratos de transportadores y los productos naturales.

Resolución del problema

Preparación de la proteína y caracterización del sitio activo

- La proteína se descarga de PDB. Se elige una estructura enlazada a ADN entre las existentes Hay más de una.
- **Preparación de la proteína para docking**
 - limpiar los ligandos, se trabaja sólo con la cadena A.
 - Añadir los hidrógenos (los pdb no los llevan)
 - Añadir las cargas y los tipos de enlace según el campo de fuerzas AMBER ff99.

PDB
PROTEIN DATA BANK

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures
As of Tuesday Jan 05, 2010 at 4 PM PST there are 62430 Structures | PDB Statistics

WHAT'S NEW | HELP | PRINT

PDB ID or keyword Search Advanced Search

Summary | Derived Data | Sequence | Seq. Similarity | Literature | Biol. & Chem. | Methods | Geometry | Links

1T39 Display Files Download Files Print this Page Share this Page

HUMAN O6-ALKYLGUANINE-DNA ALKYL TRANSFERASE COVALENTLY CROSSLINKED TO DNA
DOI:10.2210/pdb1t39/pdb NDB ID: PD0542

Primary Citation
DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT.
Daniels, D.S., Woo, T.T., Luu, K.X., Noll, D.M., Clarke, N.D., Pegg, A.E., Tainer, J.A.
PubMed: 15221026 DOI: 10.1038/nsmb791 Search Related Articles in PubMed

PubMed Abstract:
O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT), or O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), prevents mutations and apoptosis resulting from alkylation damage to guanines. AGT irreversibly transfers the alkyl lesion to an active site cysteine in a stoichiometric, direct damage reversal pathway. AGT expression therefore elicits tumor resistance to alkylating chemotherapies, and AGT inhibitors are in clinical trials. We report here structures of human AGT in complex with double-stranded DNA containing the

Molecular Description

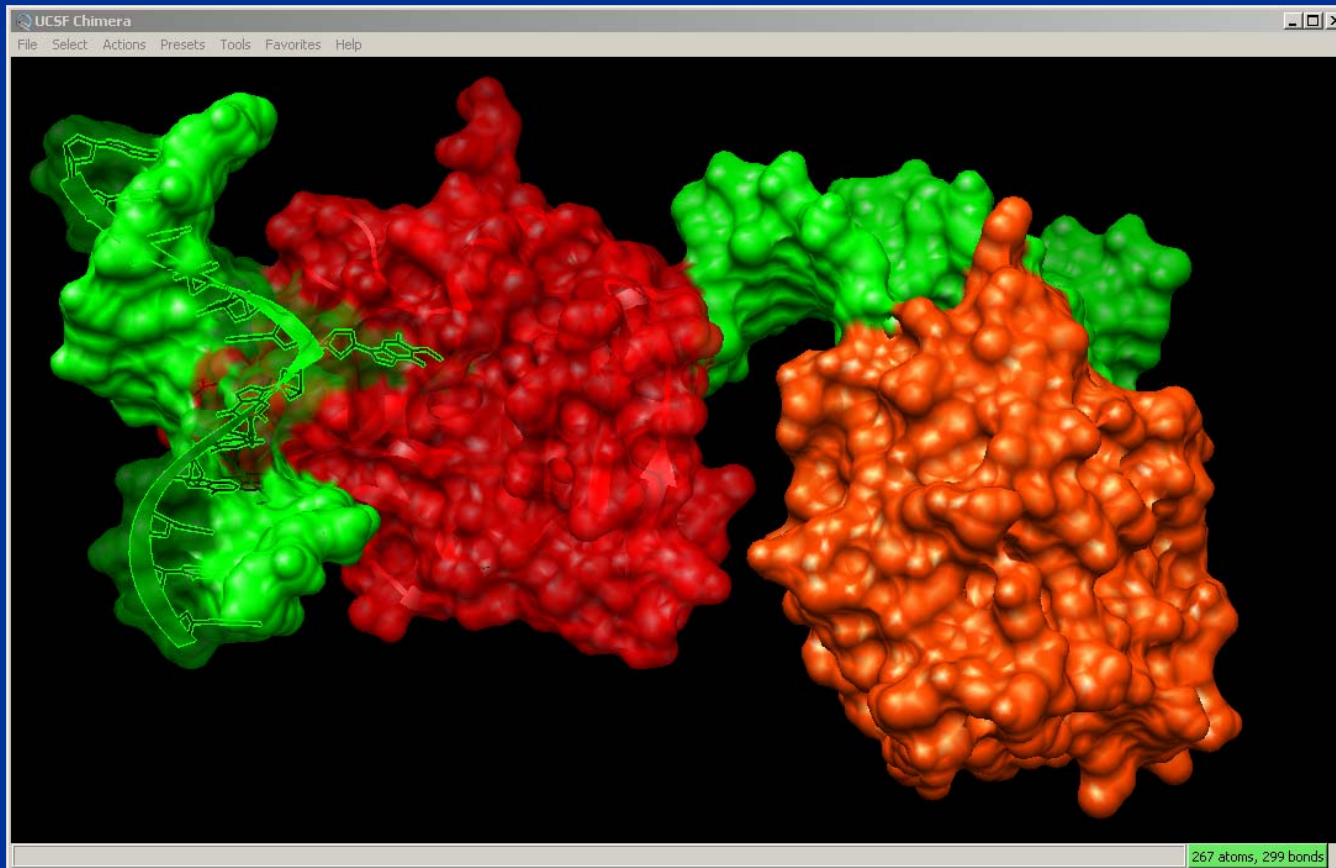
Classification:	Transferase/dna
Structure Weight:	56655.80
Molecule:	5'-D>(*GP*CP*AP*TP*GP*(E1X)P*CP*TP*AP*GP*TP*A)-3'
Polymer:	1 Type: polydeoxyribonucleotide Length: 13
Chains:	C, E
Molecule:	5'-D(*TP*AP*CP*TP*AP*GP*CP*CP*AP*TP*GP*GP*C)-3'
Polymer:	2 Type: polydeoxyribonucleotide Length: 13
Chains:	D, F
Molecule:	Methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase
Polymer:	3 Type: polypeptide(L) Length: 188
Chains:	A, B
EC#:	2.1.1.63

La estructura tiene dos proteínas

Resolución del problema

Caracterización del sitio activo

- El sitio activo esta formado por los residuos en las proximidades del ligando co-cristalizado E1X
- Mediante el Algoritmo GAGA se construye una imagen en negativo del sitio de interacción.



Resolución del problema

Caracterización del sitio activo

- El sitio activo esta formado por los residuos en las proximidades del ligando co-cristalizado E1X
- Mediante el Algoritmo GAGA se construye una imagen en negativo del sitio de interacción.

The screenshot displays the Molegro Virtual Docker software interface. The main window shows a 3D model of a protein (blue) with a ligand (green and yellow) docked in its active site. The protein surface is colored by electrostatic potential, with red indicating negative charge and blue indicating positive charge. The ligand is shown as a semi-transparent surface. The interface includes a menu bar (File, Edit, View, Rendering, Preparation, Docking, Tools, Window, Help), a toolbar, and a sidebar with an 'Items' panel listing 'Ligands [4]', 'Proteins [1]', and 'Surfaces [1]'. A 'Property' table is visible at the bottom left.

The 'Docking Wizard' dialog box is open, titled 'Choose Scoring Function and Define Binding Site'. It contains the following settings:

- Scoring function: MolDock Score [GRID]
- Score: [Empty field]
- Grid resolution (Å): 0.30
- Based on the current resolution, and the search space size defined below, the grid will require approx. 67.6 MB of memory
- Ligand evaluation: Internal ES Internal HBond Sp2-Sp2 Torsions
- Displaceable Water. Entropy reward (for each water displaced): 0.00
- Binding site: Origin: User-defined
- Center: X: 78.32, Y: 7.93, Z: 12.30
- Radius: 13

Buttons for '< Back', 'Next >', and 'Cancel' are located at the bottom of the dialog box.

Resolución del problema

Filtrado de la librería con DOCK

- La librería de 2.5 mill. Se filtra mediante DOCK (un programa de docking) empleando la imagen del sitio activo.

The Official UCSF DOCK Web-site

What Is DOCK?

DOCK addresses the problem of "docking" molecules to each other. In general, "docking" is the identification of the low-energy binding modes of a small molecule, or ligand, within the active site of a macromolecule, or receptor, whose structure is known. A compound that interacts strongly with, or binds, a receptor associated with a disease may inhibit its function and thus act as a drug. Solving the docking problem computationally requires an accurate representation of the molecular energetics as well as an efficient algorithm to search the potential binding modes.

Historically, the DOCK algorithm addressed rigid body docking using a geometric matching algorithm to superimpose the ligand onto a negative image of the binding pocket. Important features that improved the algorithm's ability to find the lowest-energy binding mode, including force-field based scoring, on-the-fly optimization, an improved matching algorithm for rigid body docking and an algorithm for flexible ligand docking, have been added over the years. For more information on past versions of DOCK, click [here](#).

With the release of DOCK 6, we continue to improve the algorithm's ability to predict binding poses by adding new features like force-field scoring enhanced by solvation and receptor flexibility. For more information about the current release of DOCK, click [here](#).

Why Use DOCK?

We and others have used DOCK for the following applications:

- predict binding modes of small molecule-protein complexes
- search databases of ligands for compounds that inhibit enzyme activity
- search databases of ligands for compounds that bind a particular protein
- search databases of ligands for compounds that bind nucleic acid targets
- examine possible binding orientations of protein-protein and protein-DNA complexes
- help guide synthetic efforts by examining small molecules that are computationally derivatized
- many more...

DOCK [University of California San Francisco.](#)

AutoDock [Scripps Research Institute.](#)

Molegro Virtual Docker [Molegro ApS, University of Aarhus, Denmark.](#)

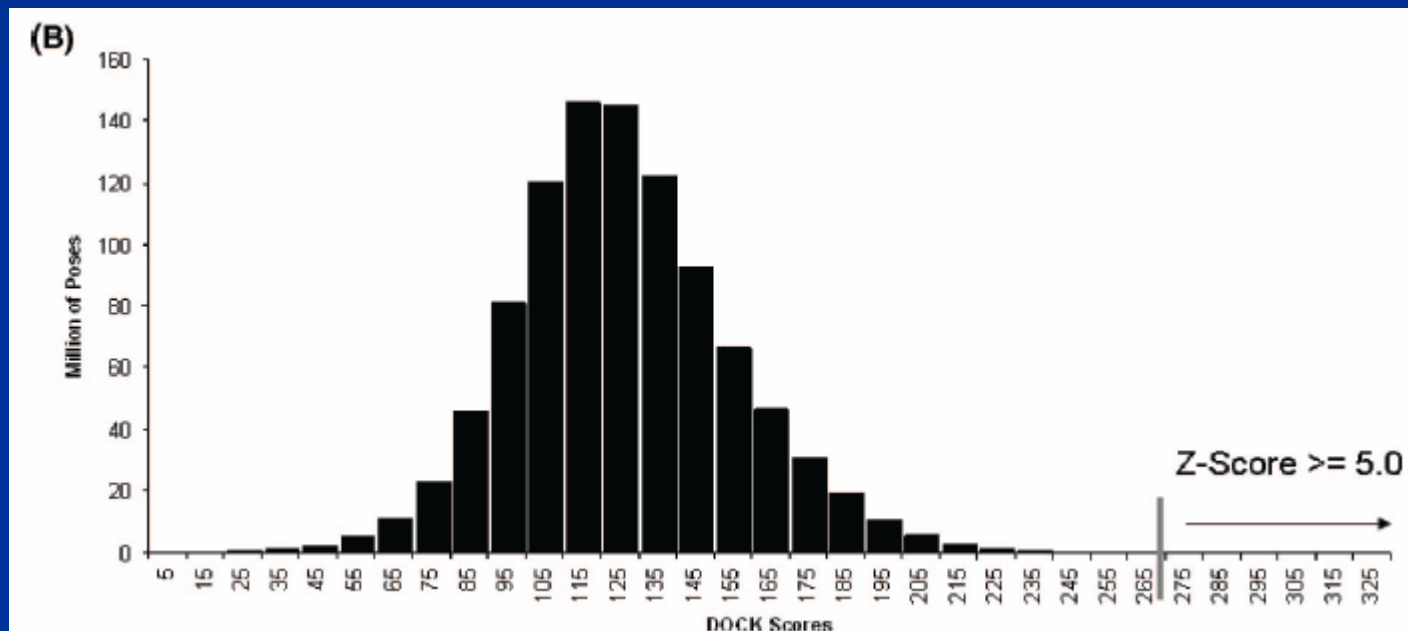
Hex Protein Docking. [University of Aberdeen, UK.](#)

GRAMM Protein docking software
[Center for Bioinformatics, University of Kansas, USA.](#)

Resolución del problema

Filtrado de la librería con DOCK

- La librería de 2.5 mill. Se filtra mediante DOCK empleando la imagen del sitio activo.
- Se obtiene una clasificación de los ligandos ordenados por un Score. La función de contacto de DOCK. Se genera una distribución entorno a la media y se separan los ligandos por encima de 5 (zScore)



- Pasan el filtro 1664 compuestos.

Resolución del problema

Filtrado de la librería con CDOCK

- **Los 1664 compuestos se depuran con CDOCK:**
 - Antes se corrige la energía de interacción con el disolvente mediante delPhi
 - No se tiene en cuenta la entropía conformacional.
 - Los enlaces pueden girar, los residuos pueden girar
- **Las 17 mejores compuestos Los que mayor interacción presentan se seleccionan para ser testeados experimentalmente.**

NEW DNA ALKYLTRANSFERASE INHIBITORS *J. Chem. Inf. Model., Vol. 48, No. 4, 2008 847*

Table 1. List of the 17 Top-Ranked Compounds Obtained in the Virtual Screening Computation^a

compound (ZINC code)	log P	H-bond donors	H-bond acceptors	charge	MW ^b	CDOCK energy	MMGBSA energy ^c	in-vitro IC ₅₀ (μM) ^d	in-vivo IC ₅₀ (μM) ^e
1 (ZINC00910802)	3.52	2	9	1	536	-34.57	-32.26 (2.59)	54	10
2 (ZINC00889422)	4.24	2	7	1	505	-31.91	-43.54 (3.35)	34	50
3 (ZINC03642335)	6.18	1	5	0	410	-32.42	-46.52 (3.26)	24	10
4 (ZINC02487935)	5.61	1	6	0	426	-32.37	-56.90 (3.24)	22	10
5 (ZINC01327643)	4.23	2	6	0	437	-31.24	ND ^f	>100	ND
6 (ZINC00714917)	6.41	1	6	0	503	-31.84	ND	>100	ND
7 (ZINC01360953)	5.01	0	7	0	563	-32.06	ND	>100	ND
8 (ZINC01360953)	4.51	2	6	0	433	-31.73	ND	>100	ND
9 (ZINC02809317)	1.34	0	11	0	463	-32.95	ND	>100	ND
10 (ZINC03404767)	4.88	1	8	0	481	-34.08	ND	>100	ND
11 (ZINC01437200)	2.81	2	8	2	479	-32.71	ND	>100	ND
12 (ZINC03052303)	3.50	2	7	0	516	-33.90	ND	>100	ND
13 (ZINC00784955)	0.90	3	9	2	452	-32.61	ND	>100	ND
14 (ZINC00892609)	4.45	2	7	1	505	-31.56	ND	>100	ND
15 (ZINC01352201)	3.06	1	9	0	472	-33.19	ND	>100	ND
16 (ZINC02835223)	4.34	1	6	0	433	-28.35	ND	>100	ND
17 (ZINC00738815)	4.48	2	6	0	460	-32.52	ND	>100	ND

^a The computed chemical properties (as found in the ZINC database), the computed binding energies (computed both with CDOCK and the MMGBSA method, see Materials and Methods for details), and the in vitro and in vivo activities of the active compounds are shown. ^b MW molecular weight. ^c Average interaction energy during the MD simulation in kilocalories per mole; standard deviation is shown in parenthesis. ^d IC₅₀ in vitro value (concentration of the compounds required to produce 50% reduction in the MGMT activity). ^e IC₅₀ in vivo value (concentration of the compounds required to produce 50% cell killing in the presence of 80 μM sBCNU). ^f ND not determined.

Resolución del problema

Determinación de IC50 in-vitro

- De los 17 mejores compuestos Se determina su IC50
- IC50 cantidad de compuesto necesaria para producir una disminución del 50% de la actividad de MGMT.
- Cuatro compuestos muestran actividad de orden micromolar y son seleccionados para ensayos in-vivo.

NEW DNA ALKYLTRANSFERASE INHIBITORS

J. Chem. Inf. Model., Vol. 48, No. 4, 2008 847

compound (ZINC code)	CDOCK energy	MMGBSA energy ^c	in-vitro	in-vivo
			IC ₅₀ (μM) ^d	IC ₅₀ (μM) ^e
1 (ZINC00910802)	-34.57	-32.26 (2.59)	54	10
2 (ZINC00889422)	-31.91	-43.54 (3.35)	34	50
3 (ZINC03642335)	-32.42	-46.52 (3.26)	24	10
4 (ZINC02487935)	-32.37	-56.90 (3.24)	22	10
5 (ZINC01327643)	-31.24	ND	>100	ND
6 (ZINC00714917)	-31.84	ND	>100	ND
7 (ZINC01360953)	-32.06	ND	>100	ND
8 (ZINC01360953)	-31.73	ND	>100	ND
9 (ZINC02809317)	-32.95	ND	>100	ND
10 (ZINC03404767)	-34.08	ND	>100	ND
11 (ZINC01437200)	-32.71	ND	>100	ND
12 (ZINC03052303)	-33.90	ND	>100	ND
13 (ZINC00784955)	-32.61	ND	>100	ND
14 (ZINC00892609)	-31.56	ND	>100	ND
15 (ZINC01352201)	-33.19	ND	>100	ND
16 (ZINC02835223)	-28.35	ND	>100	ND
17 (ZINC00738815)	-32.52	ND	>100	ND

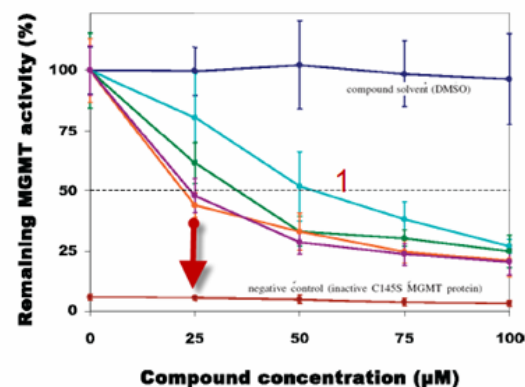


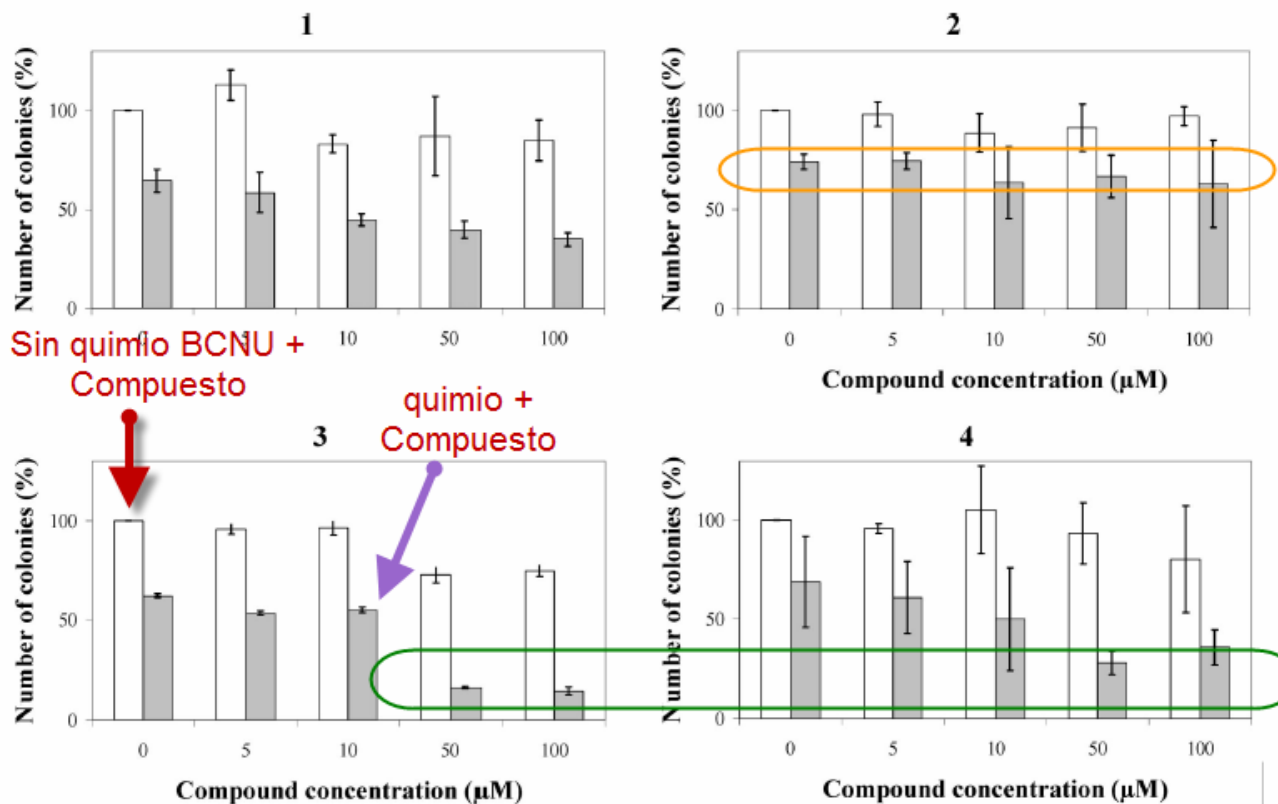
Figure 3. Concentration curve showing the inactivation of human alkyltransferase by compounds 1, 2, 3, and 4. Remaining MGMT activity vs compound concentration is shown relative to untreated control samples. Compounds 1 (cyan), 2 (green), 3 (orange), and 4 (violet) show inhibitory effect on MGMT activity in the micromolar range. The negative control (inactive C145S MGMT protein) is shown in brown, and the effect of the compound solvent (DMSO) on MGMT activity is shown in blue. The dotted line marks the 50% remaining MGMT activity.

Se seleccionan para ensayo in-vivo los que tienen actividad en el orden de microMolar

Resolución del problema

Determinación de IC50 in-vivo

- La actividad in-vivo se determina en colonias de HBT-38.
- El compuesto 2 parece que no es absorbido por la célula y no tiene actividad
- El compuesto 3 parece que es el más activo




Cell Biology	
ATCC® Number:	HTB-38™ <input type="button" value="Order this Item"/>
Designations:	HT-29
Depositors:	J Fogh
Biosafety Level:	1
Shipped:	frozen
Medium & Serum:	See Propagation
Growth Properties:	adherent
Organism:	<i>Homo sapiens</i> (human)
Morphology:	epithelial
Source:	 Organ: colon Disease: colorectal adenocarcinoma

Figure 5. Effect of compounds in HBT-38 cells survival, relative to untreated cells. White bars show samples with no BCNU added in the presence of different concentrations of each of the four compounds, and gray bars show the same experiment in the presence of BCNU at 30 µM. BCNU alone reduce the cell number to an average of 68%; 10, 50, 10, and 100 µM are the concentrations required to produce 50% cell killing of compounds 1, 2, 3, or 4, respectively.

Resolución del problema

Depuración de la energía con Dinámica molecular

- Los 4 compuestos activos in-Vitro se recalculan con Dinámica Molecular.
 - Campo de fuerzas AMBER 99
 - Se tiene en cuenta la contribución de la solvatación (MM-GBSA)
- La dinámica molecular confirma que los compuestos 3 y 4 presentan más actividad.

	AutoDock Total Intermolec. Energy	CDOCK energy	MMGBSA energy ^c	In.vitro IC ₅₀ (μM) ^d	In.vivo IC ₅₀ (μM) ^e
<input type="checkbox"/> liq1 to dnaprotein	-8.48 kcal/mol	-34.57	-32.26 (2.59)	54	10
<input type="checkbox"/> liq2 to dnaprotein	-9.98 kcal/mol	-31.91	-43.54 (3.35)	34	50
<input type="checkbox"/> liq3 to dnaprotein	-9.76 kcal/mol	-32.42	-46.52 (3.26)	24	10
<input type="checkbox"/> liq4 to dnaprotein	-9.19 kcal/mol	-32.37	-56.90 (3.24)	22	10

↓
 ¿Donde está la diferencia entre los ordenes de magnitud?
 ... ¿Solvatación?
 ¿Método de calculo?

↓
 Quedan ordenados
 Aumenta la energía de interacción >>
 disminuye IC50

El que tiene mayor energía de interacción (más megativa)

Resolución del problema

Análisis de los modos de docking

- Es posible separar la energía de interacción de cada residuo.
- Sirve para:
 - Estudiar el mecanismo de reacción
 - Mejorar la eficacia del inhibidor >>> propuestas de modificación de la estructura del fármaco
 - Entender ensayos en animales. Proteínas homólogas

Table 2. Interaction Energy Analysis (Standard Deviations in Parentheses), As Computed from the Molecular Dynamics Simulations by the MMGBSA Approach, for the Four Active Molecules Found in This Work^a

res no.	compound			
	1	2	3	4
ARG128	-5.99 (0.65)	-4.09 (1.51)	-6.01 (0.99)	-6.71 (0.64)
TYR114	-1.92 (0.31)	-4.33 (0.47)	-5.46 (0.65)	-4.87 (0.46)
ARG135	-5.52 (0.77)	-1.39 (0.56)	-3.51 (0.84)	-4.75 (0.95)
TYR158	-1.53 (0.44)	-3.17 (0.41)	-1.39 (0.24)	-4.03 (0.55)
GLY131		-2.31 (0.44)	-2.83 (0.36)	-3.17 (0.38)
ASN157	-2.69 (0.65)	-3.34 (0.42)	-1.38 (0.27)	-2.93 (0.52)
MET134		-3.11 (0.51)	-2.25 (0.34)	-2.58 (0.41)
ALA127	-1.11 (0.24)			-1.68 (0.29)
SER159	-1.30 (0.29)	-1.65 (0.35)		-1.55 (0.29)
GLN115			-2.36 (0.62)	-1.37 (0.33)
CYS150				-1.18 (0.46)
CYS145		-1.21 (0.32)		-1.01 (0.42)
total	-20.06 (0.48)	-24.60 (0.54)	-25.19 (0.51)	-35.83 (0.48)

^a All values are in kilocalories per mole.

Mecanismo propuesto

- La mutación del residuo **CYS145** inactiva a la MGMT
- El residuo **ARG128** se introduce en el interior de la doble hélice.
- La base dañada se coloca en un hueco hidrofóbico formada por los residuos sitio activo **VAL155 - GLY160** y la cadena lateral de **MET134**.
- Los grupos carbonilo de **SER145 y VAL148** pueden aceptar enlaces de hidrógeno del grupo amino de la base dañada.
- Los residuos **TYR114 y SER159** pueden donar puentes de hidrógeno a la base dañada
- El residuo **TYR114** parece facilitar el posicionamiento de la base dañada en el hueco activo de la proteína.

Resolución del problema

Análisis de los modos de docking

- Es posible separar la energía de interacción de cada residuo. Sirve para:
 - Comparación con los datos experimentales

The screenshot displays a molecular docking software interface. The main window shows a 3D model of a protein (blue and red) with a ligand (green) docked in its binding pocket. Several residues are labeled: Arg 128, Tyr 114, Val 148, Val 155, Arg 135, Tyr 158, Ser 159, and Gly 160. A text box on the left titled "Mecanismo propuesto" provides a list of proposed interactions and mutations.

Mecanismo propuesto

- La mutación del residuo **CYS145** inactiva a la MGMT
- El residuo **ARG128** se introduce en el interior de la doble hélice.
- La base dañada se coloca en un hueco hidrofóbico formada por los residuos sitio activo **VAL155** - **GLY160** y la cadena lateral de **MET134**.
- Los grupos carbonilo de **SER145** y **VAL148** pueden aceptar enlaces de hidrógeno del grupo amino de la base dañada.
- Los residuos **TYR114** y **SER159** pueden donar puentes de hidrógeno a la base dañada
- El residuo **TYR114** parece facilitar el posicionamiento de la base dañada en el hueco activo de la proteína.

Ligand Energy Inspector

Ligand/pose: [01] C4 Hide other liga

Ligand Targets Total Energy Settings

Show Residue / Molecule Contributions

Molecule	Resid	ID	Total
1T39 [A]	Tyr	158	-52.3076
1T39 [A]	Cys	145	-22.8564
1T39 [A]	Ser	159	-20.4773
1T39 [A]	Tyr	114	-19.7234
1T39 [A]	Asn	157	-16.0484
1T39 [A]	Arg	135	-14.6748
1T39 [A]	Asn	137	-11.0512
1T39 [A]	Pro	140	-10.879
1T39 [A]	Lys	165	-4.32936
1T39 [A]	Gly	131	-3.98796
1T39 [A]	Val	130	-3.42405
1T39 [A]	Gly	160	-3.22319
1T39 [A]	Met	134	-3.14916
1T39 [A]	Leu	33	-1.67402
1T39 [A]	Pro	138	-1.1134
1T39 [A]	His	146	-0.441859
1T39 [A]	Val	148	4.7325

[Copy tables to clipboard](#)

Resolución del problema

Conclusiones

- Los métodos de modelado molecular pueden proporcionar un punto de partida en la búsqueda de un fármaco
- Siempre es necesaria una información de partida lo más fidedigna posible. Ya sea
 - un ligando activo,
 - una estructura de partida, o estructuras homologas,
 - datos de constantes de inhibición,
- Son métodos aproximados, sirven para comparar actividades entre compuestos
- El coste computacional es exponencial con lo exquisito del sistema y puede variar desde unos segundos a varios días!!!
- Los valores de energía de dos “métodos distintos” NO son comparables
- Se puede establecer una relación entre “Energía” y constante de equilibrio, pero hay que calibrarla con datos experimentales
- Los resultados de docking hay que analizarlos desde el punto de vista
 - Físico: ¿Es correcto el modelo?, ¿Es lógico el resultado?...
 - Químico: ¿El modelo de reacción es correcto?, ¿Es posible sintetizar el fármaco?...
 - Biológico: ¿Será toxico?, ¿Traspasará la membrana?, ¿Afectará a otras dianas?....
 - Biomédico: ¿Qué enfermedad queremos curar?, ¿Tiene efecto terapeutico?