

Búsqueda computacional de fármacos contra diabetes tipo 2 y esclerosis lateral amiotrófica

Alberto Maroto Ferrer

Máster universitario de bioinformática y bioestadística

Bioinformática farmacéutica

Nombre Consultor/a: Melchor Sánchez Martínez

Nombre Profesor/a responsable de la asignatura: Maria Jesús Marco Galindo

26/12/2016



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Búsqueda computacional de fármacos contra diabetes tipo II y esclerosis lateral amiotrófica</i>
Nombre del autor:	<i>Alberto Maroto Ferrer</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Melchor Sánchez Martínez</i>
Nombre del PRA:	<i>Maria Jesús Marco Galindo</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	26/12/2016
Titulación::	<i>Máster en bioinformática y bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Bioinformática farmacéutica</i>
Idioma del trabajo:	<i>Español</i>
Palabras clave	<i>“Structure-based virtual screening”, “ligand-based virtual screening” y “quantitative structure-activity relationship (QSAR)”</i>

Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): *Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.*

El descubrimiento de nuevos medicamentos es una labor muy exigente a nivel de tiempo y dinero. Esto ha provocado la necesidad de desarrollar nuevas técnicas y conocimientos que permitan agilizar el proceso y reducir los costes. Un claro ejemplo es la bioinformática, una herramienta cada vez más importante no solo en la industria farmacéutica, sino en todos los campos relacionados con el ámbito científico. En este trabajo se aplica ésta para la búsqueda de nuevas moléculas con fin terapéutico en las enfermedades de la diabetes tipo II y la esclerosis lateral amiotrófica. Para ello, se ha partido de dianas terapéuticas reconocidas para ambas enfermedades y, mediante un screening basado en estructura, se han encontrado una serie de moléculas que interactúan con estas. A partir de aquí, se ha hecho un análisis de toxicidad asociada a cada uno y se han seleccionado aquellos con mejores resultados. Se han utilizado estos últimos como plantilla para generar moléculas parecidas a nivel estructural y así poder aumentar el número de compuestos de interés. Por último, se han utilizado tres moléculas con propiedades terapéuticas reconocidas en diabetes tipo II (dapagliflozina, gliquidona y mitiglinida) para generar nuevas moléculas con las que estudiar su interacción con “fatty acid-binding protein” un transportador lipídico que actúa como proteína chaperona en lípidos y que se la ha relacionado en los últimos años con diabetes mellitus tipo 2.

Abstract (in English, 250 words or less):

Our Project consist of a computational drug discovery focused on type 2 diabetes mellitus and amyotrophic lateral sclerosis, two diseases with an important impact in our society. The aim of this study is to find novel molecules that interact with the known targets of these diseases.

After doing a structure-based screening between these proteins and the molecules of the libraries diverse and iPPI, we have found some molecules with desirable safety and physicochemical properties. We have analyzed the results using CAESAR test, which is based of QSAR methodology.

Using these compounds as a template we have generated new libraries by similarity methods (ligand-based screening).Then, we have used these new libraries as a tool for another screening using the corresponding targets.

Finally, due to the fact that we have not find screening results with the fatty acid-binding protein, which is an important target of DM II, we tried a new screening using own generated libraries. We have made these ones using three important clinical compounds in DM II: dapagliflozine, gliquidone y mitiglinide. In this final case, we have found three compounds with good and desirable properties.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. BÚSQUEDA COMPUTACIONAL DE FÁRMACOS PARA DIABETES TIPO 2	5
3. BÚSQUEDA COMPUTACIONAL DE FÁRMACOS PARA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	22
4. GENERACIÓN DE MOLECULAS ADICIONALES A PARTIR DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS EN EL SCREENING INICIAL	37
5. CONCLUSIONES.....	40
6. GLOSARIO.....	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43
8. ANEXOS	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

El descubrimiento de nuevos fármacos es arriesgado además de exigir una gran cantidad de tiempo y dinero. Se estiman 14 años desde la primera idea del medicamento en sí hasta que llega al mercado (Baker A. et al., 2011) y un billón de dólares en todo el proceso (Thier SO et al., 2005). Por lo que existe una necesidad de rebajar esto mediante técnicas alternativas y novedosas como es la bioinformática, que se cree que podría reducir los costes actuales en un 50% (Liang XJ et al, 2010). Este campo trata aspectos diversos en lo que se refiere al descubrimiento de nuevas moléculas, incluyendo programas con los que diseñar, evaluar y estudiar posibles interacciones de la molécula de interés (Tong JC et al., 2009). Además, con los ensayos iniciales *in silico* se pueden obtener una amplia gama de moléculas candidatas a ser medicamentos con los que realizar después estudios *in vitro* mucho más focalizados y costosos.

1.2 Objetivos del Trabajo

La diabetes tipo II es un trastorno metabólico de etiología heterogénea que se caracteriza por una incapacidad del cuerpo a producir o usar insulina correctamente. Debido al alarmante incremento de casos en niños y adolescentes, junto a las complicaciones que la cronicidad que esta presenta, han situado a la diabetes tipo II en una de las enfermedades con mayor repercusión a nivel mundial (Lee YS et al., 2009).

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de funcionamiento y muerte de neuronas motoras (Rosenfeld J. et al., 2015). En la actualidad no es posible curar esta enfermedad y los tratamientos van dirigidos exclusivamente a paliar los síntomas y retrasar el avance de esta. En consecuencia, esta enfermedad es un campo abierto al desarrollo de nuevos fármacos para mejorar la situación con la que cuentan los pacientes actualmente.

Con estas dos enfermedades como punto de partida y, utilizando la bioinformática como herramienta, en este trabajo se pretende realizar una búsqueda de nuevas moléculas que interactúen con las dianas reconocidas actualmente para ambas anomalías.

Los objetivos que nos planteamos en este trabajo son los siguientes:

- Encontrar, mediante técnicas de screening basado en estructura, una batería de moléculas que presenten una buena interacción con algunas de las dianas reconocidas para ambas enfermedades.

- Analizar las propiedades físicas de las moléculas obtenidas, así como su toxicidad asociada para poder seleccionar las mejores candidatas a estudios posteriores.
- Expandir la cantidad de moléculas encontradas a partir de la generación de compuestos similares a los seleccionados inicialmente.
- Utilizar dapagliflozina, gliquidona y mitiglinida, tres fármacos reconocidos en diabetes tipo II, como plantilla para la generación de nuevas moléculas de interés.

1.3 Enfoque y método seguido

Dependiendo de la información de partida, existen a nivel general dos caminos a seguir en la bioinformática enfocada al descubrimiento de nuevos fármacos. En la primera de ellas (screening basado en estructura), es necesario contar con la estructura 3D de la diana terapéutica a buena resolución. En la segunda, en cambio, se tiene en cuenta algún ligando (principio activo conocido, por ejemplo) para esa patología en concreto. A pesar de esto, estos dos procedimientos no son independientes entre sí y muchas veces se recurre a ambos para ampliar el rango de resultados. En este trabajo ha partido de un screening basado en estructura por contar con la estructura 3D a buena resolución de algunas de las dianas para ambas enfermedades. En la segunda parte del trabajo se ha utilizado un screening basado en ligando para aumentar el número de moléculas encontradas. Para ello, se ha partido de las mejores moléculas de la primera parte del trabajo y de tres fármacos reconocidos como ligandos.

Como materia prima de moléculas para el screening basado en estructura se han utilizado dos librerías propias del servidor MTiOpenScreen: diverse y iPPI. La primera de ellas, diverse, consiste en 12 librerías de PubChem BioAssay (Bryant SH. et al., 2014), a las que se les han suprimido moléculas con propiedades fisicoquímicas no deseables y toxicidad asociada.

La segunda librería utilizada, iPPI, consiste en 51232 moléculas destinadas a estudiar interacciones entre proteínas.

En la parte final del trabajo se utilizan las moléculas seleccionadas en el screening inicial como plantilla para generar nuevos compuestos (screening basado en ligando). Estos nuevos compuestos generados se han usado como librerías para un nuevos screenings basado en estructura.

Para realizar cada screening ha sido necesario calcular la el sitio de unión de cada ligando a la proteína de interés (tanto en eje de coordenadas como en tamaño). Para ello, se ha utilizado un script de programación en Python (anexo 1).

QSAR es el modelo por el cual la estructura química de una molécula se correlaciona cuantitativamente con una actividad biológica. En el caso concreto de este trabajo: mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad asociada y sensibilidad al contact. El test CAESAR, el cual se fundamenta en este

principio, ha sido desarrollado teniendo en cuenta la legislación de REACH, un Reglamento de la Unión Europea, adoptado con el fin de mejorar la protección de la salud humana y el medio ambiente contra los riesgos que pueden presentar los productos químicos.

Se ha realizado este test a las cinco moléculas que han mostrado mejor energía de unión a su proteína para cada screening.

En este trabajo se analiza la mutagénesis, carcinogénesis, toxicidad y sensibilidad a la piel asociados a cada uno de los compuestos obtenidos. Se han seleccionado únicamente aquellas sustancias que muestran resultados negativos para las cuatro pruebas anteriores, es decir, sustancias no mutagénicas, no carcinogénicas, no tóxicas y sin aparente efecto sensibilizador sobre la piel.

1.4 Planificación del Trabajo

Los recursos necesarios para la realización del trabajo han sido los siguientes:

- Portal online para la realización del screening basado en estructura. En este caso se han utilizado MTiOpenScreen (<http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms>) y mcule (<https://mcule.com/>).
- Web para la realización del screening basado en ligando. Se han utilizado SwissSimilarity (<http://www.swiss similarity.ch/>) y USR-VS (<http://usr.marseille.inserm.fr/>).
- Visualizador de moléculas Jmol.
- Pymol, un lector y visualizador de ficheros de extensión .mol2.
- OpenBabel, un conversor de ficheros de distintas extensiones de carácter científico.
- El servidor de búsqueda de cavidades o “binding sites” de proteínas <http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::fpocket>
- Las bases de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), RSCB PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) y DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>).
- Las librerías de moléculas “diverse” y “iPPI-lib”.
- Test CAESAR QSAR con el programa Vega (<http://www.vega-qsar.eu/>).
- Portal SwissDock para la realización de docking online (<http://www.swissdock.ch/>).
- La plataforma Anaconda para leer y programar en Python.

La descripción de las tareas a realizar en este trabajo y su planificación temporal han sido las siguientes:

FECHAS	TAREAS
10/10/2016-16/10/2016	ELABORACIÓN DEL PLAN DE TRABAJO
17/10/2016-23/10/2016	BÚSQUEDA DE DIANAS TERAPÉUTICAS DE ELA Y DMII Y ELABORACIÓN DE UNA MATRIZ CON LOS DATOS OBTENIDOS
24/10/2016-30/10/2016	BÚSQUEDA DE LA ESTRUCTURA 3D DE LAS DIANAS OBTENIDAS EN EL PASO ANTERIOR PARA AMBAS PATOLOGÍAS
31/10/2016-6/11/2016	SCREENING BASADO EN ESTRUCTURA PARA OBTENER MOLÉCULAS CANDIDATAS A NUEVOS FÁRMACOS EN ELA Y DMII
7/11/2016-13/11/2016	SCREENING BASADO EN ESTRUCTURA PARA OBTENER MOLÉCULAS CANDIDATAS A NUEVOS FÁRMACOS EN ELA Y DMII
14/11/2016-20/11/2016	SCREENING BASADO EN ESTRUCTURA PARA OBTENER MOLÉCULAS CANDIDATAS A NUEVOS FÁRMACOS EN ELA Y DMII
21/11/2016-27/11/2016	QSAR PARA EL ANÁLISIS DE TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS
28/11/2016-4/12/2016	SELECCIÓN DE LAS MEJORES MOLÉCULAS OBTENIDAS, COMPROBACIÓN DE RESULTADOS POR DOCKING Y SCREENING BASADO EN LIGANDO CON ESTAS
5/12/2016-11/12/2016	SCREENING BASADO EN LIGANDO CON LOS FÁRMACOS DAPAGLIFLOCINA, GLIQUIDONA Y MITGLINDA
12/12/2016-18/12/2016	SCREENING BASADO EN ESTRUCTURA CON LAS MOLÉCULAS OBTENIDAS EN LOS DOS PUNTOS ANTERIORES COMO LIBRERÍA
19/12/2016-25/12/2016	ELABORACIÓN DE LA MEMORIA DEL TRABAJO FINAL (1.1 y 1.2)
25/12/2016-28/12/2016	ELABORACIÓN DE LA MEMORIA DEL TRABAJO FINAL (1.1 y 1.2)
29/12/2016-10/01/2017	PREPARACIÓN DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO (1.1 y 1.2)

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

En cada una de las etapas se han obtenido diferentes clases de productos que han sido la materia prima para el siguiente paso del trabajo. A continuación se describen estos en orden cronológico:

- Estructura 3D de las dianas o “targets” de DM II y ELA en formato PDB.
- Cavidades o “binding sites” de las dianas en formato PDB.
- Resultados del screening basado en estructura en formato PDBQT y CSV.
- Librerías de moléculas en formato SDF
- Resultados QSAR con VEGA en formato PDF.
- Ilustraciones del docking de las moléculas seleccionadas con su diana en formato PNG.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

En los siguientes capítulos de esta memoria se analizarán los procedimientos seguidos a la hora de encontrar fármacos a nivel computacional para los dos casos estudiados: diabetes mellitus tipo 2 y esclerosis lateral amiotrófica.

En ambos casos se ha realizado un screening basado en estructura a partir de las estructuras 3D de algunas de las dianas reconocidas para ambas enfermedades. En el caso de diabetes se han utilizado tres fármacos comúnmente utilizados en esta como modelo para generar nuevos compuestos con los que realizar nuevos screenings.

2. BÚSQUEDA COMPUTACIONAL DE FÁRMACOS PARA DIABETES TIPO 2

2.1 LA DIABETES, UNA ENFERMEDAD METABÓLICA CADA VEZ MÁS PRESENTE EN NUESTRA SOCIEDAD

Esta enfermedad, la cual consiste en tipo más común de diabetes, fue descrita por primera vez como una enfermedad metabólica en 1988 (Patlak M. et al., 2002). La diabetes tipo 2 se caracteriza por una incapacidad del cuerpo para producir y/o utilizar la insulina de forma apropiada. Su etiología es diversa y se cree que es el resultado de una interacción entre factores genéticos y ambientales (Zimmet PZ. et al., 2011). La clínica consiste en estados de hiperglicemia, fatiga, hambre y sed inusual y un mayor riesgo a infecciones, especialmente en vejiga, riñón y piel (Abbas AK. et al., 2005).

A pesar de que la diabetes tipo 2 es una de las enfermedades más antiguas conocidas, es en los últimos años donde el número de nuevos casos se ve en alarmante aumento, especialmente en la población más joven (Lee YS. et al., 2009).

2.1.2 DIANAS CONOCIDAS PARA LA ENFERMEDAD

Fatty acid-binding protein: es un transportador lipídico que actúa como proteína chaperona en estos últimos. Polimorfismos en el promotor del gen que codifica para esta proteína conducen a niveles de expresión más bajos de la proteína, y en consecuencia, a una reducción de la concentración de triglicéridos en sangre. Se ha documentado un efecto protector a este hecho a la hora de desarrollar diabetes tipo 2 (Hom X. et al., 2006).

Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A: es una enzima glicosiltransferasa involucrada en la síntesis de proteínas y lípidos de unión a oligosacáridos. Se ha encontrado que ratones deficientes en MGAT5 (gen que codifica para esta proteína) son más delgados, tienen unos niveles de glucosa en sangre más bajos y muestran cierta resistencia a dietas hipercalóricas (Dennis JW. et al., 2014).

Dipeptidyl peptidase 4: es una enzima que descompone GLP1, un tipo de hormona incretina que estimula al páncreas a producir insulina después de las comidas. Inhibidores de esta enzima están siendo utilizados en clínica para promover la síntesis de insulina.

Fatty acid synthase: es una enzima que participa en la biosíntesis de ácidos grasos. Se ha relacionado esta proteína con fenómenos de insulinoresistencia y cáncer (J.M. Fernandez-Real et al., 2009).

Insulin receptor substrate 1: es el sustrato del receptor de insulina y parece tener un rol principal en la cascada de transducción de señales estimulada por la insulina (Deeb SS. et al., 1994). Se ha documentado, además, su implicación directa en diferentes casos de diabetes mellitus tipo 2 (J. Baier et al., 2003).

Transcription factor 7-like 2: es una proteína que actúa como factor de transcripción en las vías de señalización WNT. El silenciamiento por siRNA del gen que codifica para esta proteína ha resultado en una fuerte supresión de la producción de insulina por parte de las isletas beta de páncreas humanos (Maedler K. et al., 2008).

Hepatocyte nuclear factor 4-alpha: es un factor de transcripción de localización nuclear. Se ha relacionado esta proteína con diabetes por su acción en reducir la cantidad de insulina producida por el páncreas, especialmente en los casos de manifestación temprana (Polonsky KS. et al., 1995).

Hepatocyte nuclear factor 1-beta: es un factor de transcripción expresado en el hígado que participa en diversos procesos metabólicos. Se han relacionado deleciones en el gen que codifica para esta proteína con casos de diabetes de manifestación temprana en jóvenes (Ellard S. et al., 2013).

ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11: es un receptor controlado por proteínas G. Un cambio de aminoácidos (glutamato por lisina) en la posición 23 de esta proteína está asociado a una variante neonatal de esta enfermedad (Hattersley AT. et al., 2004).

RAC-beta serine/threonine-protein kinase: es una quinasa que controla diversos procesos relacionados con el metabolismo, proliferación, supervivencia celular y angiogénesis. Esta enzima es responsable de la captación de glucosa por las células mediante la translocación de los complejos SLC2A4/GLUT4 del transportador de glucosa en la superficie celular.

Interleukin-6: es una citoquina que actúa en la fase aguda de la respuesta inmunológica. En la última década se ha empezado a relacionar un posible mecanismo inmunológico relacionado con casos de diabetes mellitus tipo 2 y la interleucina 6 parece tener un principal en estos (Pickup JC. et al., 2004).

Thymocyte nuclear protein 1: es una proteína muy conservada en vertebrados y su función está relacionada con la inducción a apoptosis. Esta proteína ha sido relacionada con diabetes por su relación con procesos en los que existe una excesiva apoptosis en las células beta del páncreas.

2.2 MOLÉCULAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO COMO ESTRUCTURA 3D PARA CADA UNA DE LAS DIANAS

Una vez definidas las dianas con las que trabajar, se han obtenido sus estructuras 3D para el posterior screening. Se ha intentado elegir, a pesar de que no siempre ha sido posible, moléculas por debajo de 3A de resolución y también cubrir el máximo de proteína posible (tanto a nivel de cadenas como

aminoácidos en cada una de ellas). Las proteínas elegidas para cada una de las proteínas diana se muestran en la Figura 1.

DIABETES TIPO II					
NOMBRE DE LA PROTEINA	NOMBRE ESTRUCTURA	TÉCNICA	AMINOÁCIDOS	RESOLUCIÓN	CADENA
Fatty acid-binding protein http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2HNX	2HNX	RAYOS X	1-132	2A	A
Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferasa A http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureid=1olm	1OLM	HOMOLOGÍA (23%)	211-374	1.95A	A
Dipeptidyl peptidase 4 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2QT9 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1R9M	2QT9 1R9M	RAYOS X RAYOS X	1-766 39-766	2.1A 2.1A	A/B A/B/C/D
Fatty acid synthase http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3HHD http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4PIV http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2CG5 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4Z49 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4W9N	3HHD 4PIV 2CG5 4Z49 4W9N	RAYOS X RAYOS X RAYOS X RAYOS X RAYOS X	2-963 1110-2114 2119-2207 2221-2502 1529-1867	2.15A 2.3A 2.7A 1.7A 1.7A	A/B/C/D A/B B A/B A/B/C/D
Insulin receptor substrate 1 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1QQG http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2Z8C http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1K3A	1QQG 2Z8C 1K3A	RAYOS X RAYOS X RAYOS X	4-267 731-736 891-902	2.3A 3.25 2.10	A/B B B
Transcription factor 7-like 2 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2GL7 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1JPW	2GL7 1JPW	RAYOS X RAYOS X	1-53 6-54	2.6A 2.5A	B/E D/E/F
Hepatocyte nuclear factor 4-alpha http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4AIQR http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4B7W	4AIQR 4B7W	RAYOS X RAYOS X	55-377 142-377	2.9A 4A	A/B/E/F A/B/C/D
Hepatocyte nuclear factor 1-beta http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2H8R http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2DA6	2H8R 2DA6	RAYOS X NMR	91-310 233-321	3.20A	A/B A
ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11 http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureid=3spc	3SPC	HOMOLOGÍA (51%)	32-358	2.45 A	A
RAC-beta serine/threonine-protein kinase http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1P6S http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1MRV http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3DOE	1P6S 1MRV 3DOE	NMR RAYOS X RAYOS X	1-111 143-481 146-480		A A A/B
Interleukin-6 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1ALU http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1P9M http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4CNI	1ALU 1P9M 4CNI	RAYOS X RAYOS X RAYOS X	28-212 29-212 42-212	1.9A 3.65 2.2	A B C/D
Thymocyte nuclear protein 1 http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3EOP	3OP	RAYOS X	55-221	2.30A	A/B

Figura 1. Cuadro resumen de las dianas con las equivalentes estructuras 3D utilizadas en diabetes mellitus II

2.3 RESULTADOS DEL SCREENING BASADO EN ESTRUCTURA PARA CADA UNA DE LAS DIANAS CON LAS LIBRERÍAS DIVERSE Y iPPi

Se ha realizado un screening basado en estructura con cada una de las moléculas anteriores, a excepción de 2HNX por problemas de reconocimiento de la estructura por parte del servidor. Para ello, se ha utilizado el portal gratuito MTiOPenScreen como herramienta de screening (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/MTiOpenScreen/>).

2.3.1 ALPHA-1,6-MANNOSYLGLYCOPROTEIN 6-BETA-N
ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE A

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.1.1 OLM

10LM												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
3711514_Intermediate										X		2.03
 124948291_Accepted		X		X		X	X			X		4.21
24297623_Intermediate										X		3.4
4254804_Intermediate										X		3.21
 144098226_Intermediate		X		X	X			X		X		3.74
24386664_Intermediate											X	4.93
17433263_Intermediate											X	4.73
3711514_Intermediate											X	2.03
 24291193_Intermediate		X		X	X			X			X	5.18
 24387925_Intermediate	X			X	X			X			X	4.54

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto.

2.3.2 DIPEPTIDYL PEPTIDASE 4

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.2.1 2QT9

2QT9												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
 24353691_Intermediate	X			X	X		X			X		5.66
 24393894_Intermediate		X		X	X		X			X		5.08
 104224040_Intermediate		X		X	X			X		X		5.68
 57269218_Intermediate		X		X	X			X		X		1
26536261_Accepted										X		2.95
24835024_Intermediate											X	3.89
24377524_Intermediate											X	4.73
 24290562_Intermediate	X			X	X		X				X	5.52
24352057_Intermediate											X	5.23
 24397071_Intermediate	X			X		X		X			X	5.23

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.2.2 1R9M

1R9M												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
49822553_Intermediate									X		4.48	
24824222_Accepted									X		2.02	
 124950699_Accepted	X			X	X			X	X		2.61	
 87336297_Intermediate		X		X	X		X		X		2.12	
 99454013_Intermediate		X		X	X			X	X		5.87	
89850430_Intermediate										X	4.88	
 124398543_Intermediate		X	X		X			X		X	5.4	
 24387853_Accepted		X		X	X			X		X	4.06	
17472411_Intermediate										X	3.87	
24787055_Intermediate										X	2.39	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto.

2.3.3 FATTY ACID SYNTHASE

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 2CG5. No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.3.1 2CG5

2CG5												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
24392109_Intermediate									X		3.86	
 137276032_Intermediate	X			X	X			X	X		3.57	
 124948894_Accepted		X		X	X			X	X		3.79	
 29216949_Intermediate		X		X		X	X		X		5.85	
 26618367_Intermediate		X		X	X		X		X		3.57	
24829380_Intermediate										X	3.56	
57263673_Intermediate										X	3.67	
17472659_Intermediate										X	1.61	
 24393329_Intermediate		X		X	X			X		X	5.93	
26649722_Accepted										X	2.28	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto.

2.4.1 INSULIN RECEPTOR SUBSTRATE 1

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 1QQG e IK3A.

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.4.1 1QQG

1QQG												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 24393894_Intermediate		X		X	X		X		X		5.08	
 161004143_Intermediate		X		X	X			X	X		4.72	
 17436649_Intermediate		X		X	X		X		X		4.12	
 144116902_Accepted		X		X	X			X	X		5.8	
 24799695_Intermediate		X		X	X		X		X		3.55	
 26725109_Intermediate		X		X	X			X		X	5.23	
26649165_Intermediate										X	2.74	
99494727_Intermediate										X	4.71	
 4249804_Accepted		X		X	X			X		X	2.75	
 49828506_Intermediate	X		X			X	X			X	1.72	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto.

2.3.4.2 1K3A

1K3A												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 26728288_Accepted		X	X			X		X		X		5.56
 24373231_Intermediate	X		X		X		X	X		X		5.4
 24384915_Intermediate										X		4.58
 24417022_Intermediate		X		X	X				X	X		4.3
 17504677_Intermediate		X		X		X		X		X		2.86
 89855927_Accepted	X			X	X				X		X	5.98
 24805332_Intermediate	X			X	X			X			X	4.54
 24406301_Intermediate		X		X	X			X			X	4.86
 49817438_Intermediate		X		X	X			X			X	3.27
 24314197_Intermediate		X		X	X				X		X	5.78

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto.

2.3.5 TRANSCRIPTION FACTOR 7-LIKE 2

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.5.1 2GL7

2GL7												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 57268595_Intermediate		X		X		X	X		X			3.29
 14723459_Intermediate		X		X	X		X		X			2.73
 121283134_Intermediate									X			4.77
 125305565_Accepted		X		X	X			X	X			5.17
 57256995_Accepted	X			X	X			X		X		3.8
 136947682_Intermediate	X			X		X		X			X	3.8
 136947627_Intermediate		X		X	X			X			X	4.31
 24359629_Intermediate		X		X		X		X			X	3.69
 29215783_Intermediate											X	5.41
 17453125_Intermediate											X	3.38

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.5.2 1JPW

1JPW												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 57268595_Intermediate		X		X		X	X		X		3.29	
87342571_Intermediate									X		2.57	
17387704_Intermediate									X		2.78	
 26533698_Intermediate		X		X		X	X		X		4.8	
 85268603_Intermediate		X		X	X		X		X		2.51	
 17504677_Intermediate		X		X		X	X			X	2.86	
 74374017_Accepted		X		X	X			X		X	4.5	
 103159697_Accepted		X		X		X		X		X	4.3	
17441309_Intermediate										X	4.69	
24390708_Intermediate										X	3.35	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.6 HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4-ALPHA

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.6.1 4AIQR

4AIQR												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 92763935_Accepted		X		X	X			X	X		4.86	
 124949859_Intermediate	X			X	X		X		X		2.9	
 24296549_Intermediate		X		X	X		X		X		5.73	
 26616338_Intermediate		X		X	X		X		X		5.48	
26660722_Intermediate									X		1.99	
 89855027_Intermediate		X	X		X		X			X	5.41	
 14728895_Accepted	X			X	X		X			X	5.7	
7971070_Intermediate										X	4.87	
 24372231_Accepted		X		X	X		X			X	3.34	
11537859_Intermediate										X	4.15	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.6.2 4B7W

4B7W												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
24428847_Intermediate										X		4.61
24793844_Intermediate										X		4.44
 85269721_Intermediate		X		X	X			X		X		3.12
 24396157_Intermediate		X		X		X		X		X		5.41
 124948081_Accepted		X		X	X			X		X		3.62
29215783_Intermediate											X	5.41
17407330_Accepted											X	4.3
17513675_Intermediate											X	1.76
 24290555_Accepted		X	X		X				X		X	4.12
 26534472_Accepted		X		X	X			X			X	4.67

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.7 HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 1-BETA

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 2DA6. No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.7.1 2DA6

2DA6												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
17514921_Intermediate										X		3.76
14743184_Intermediate										X		3.68
26629520_Intermediate										X		2.98
51089590_Accepted		X		X	X			X		X		1.12
17449452_Intermediate	X			X	X			X		X		0.91
17458772_Accepted											X	3.81
49680644_Intermediate											X	2.85
14723885_Accepted											X	3.29
26531248_Intermediate											X	0.71
26653108_Intermediate											X	3.44

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.8 ATP-SENSITIVE INWARD RECTIFIER POTASSIUM CHANNEL 11

En este caso, al no disponer de la estructura 3D de esta proteína, se ha recurrido a una proteína homóloga con una identidad del 51%. No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.8.1 3SPC

3SPC												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
865653_Intermediate										X		2.34
 26665891_Intermediate	X		X			X		X		X		4.39
57288005_Accepted										X		2.84
26653030_Intermediate										X		4.37
 24267912_Intermediate		X		X	X			X		X		4.96
 3715356_Intermediate	X			X	X			X			X	2.49
 57256729_Intermediate		X	X		X			X			X	3.14
 24325824_Intermediate		X		X	X			X			X	5.19
24344605_Intermediate											X	3.57
22415330_Intermediate											X	3.35

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.9 RAC-BETA SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 3DOE. Se ha seleccionado el compuesto 24367874_Accepted como candidato a futuros estudios. Esta molécula pertenece a la librería diverse, tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -10.5J/mol , un peso molecular de 480.79 Da y un valor LOGP de 4.24.

2.3.9.1 3DOE

3DOE												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
14734489_Intermediate										X		3.76
 24287513_Intermediate		X		X	X			X		X		5.93
 26634773_Intermediate	X			X	X			X		X		5.8
 24367874_Accepted		X		X		X		X		X		4.24
24364325_Intermediate										X		4.65
24387362_Intermediate											X	5.7
24840422_Accepted											X	2.81
99355996_Intermediate											X	3.83
24410274_Intermediate											X	4.65
 124948271_Accepted	X			X		X		X			X	3.69

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.10 INTERLEUKIN-6

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 1P9M. No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

2.3.10.1 1P9M

1P9M												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 24376956_Intermediate		X		X		X	X		X		2.8	
 26532592_Accepted		X		X	X			X	X		1.53	
 22406678_Intermediate		X		X		X	X		X		1.84	
 49733789_Intermediate		X		X	X			X	X		3.1	
 24798743_Accepted		X		X	X		X		X		2.31	
 124948577_Accepted		X		X	X		X			X	3.81	
 57268595_Intermediate		X		X		X	X			X	3.29	
 24836306_Intermediate		X		X	X		X			X	1.47	
 24310872_Intermediate										X	0.71	
 51087459_Intermediate		X		X	X		X			X	2.52	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.3.11 THYMOCYTE NUCLEAR PROTEIN 1

Se han seleccionado los compuesto 843300_Intermediate y 24301892_Intermediate de la librería iPPI como candidato a futuros estudios. 843300_Intermediate tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -7.7J/mol, un peso molecular de 430.33 Da y un valor LOGP de 2.93.

24301892_Intermediate tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -7.7J/mol, un peso molecular de 454.40 Da y un valor LOGP de 4.62

. 2.3.11.1 3EOP

3EOP												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
 49665925_Intermediate	X		X		X		X		X		3.19	
 24299280_Intermediate		X	X		X			X	X		5.22	
24840422_Accepted									X		2.81	
26614441_Accepted									X		-0.36	
26649219_Intermediate									X		3.51	
49822553_Intermediate										X	4.48	
 843300_Intermediate		X		X		X		X		X	2.93	
 49722243_Intermediate	X			X	X			X		X	2.43	
 24301892_Intermediate		X		X		X		X		X	4.62	
17459615_Intermediate										X	3.58	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

2.4 DOCKING Y PROPIEDADES DE LAS MOLÉCULAS SELECCIONADAS DEL SCREENING

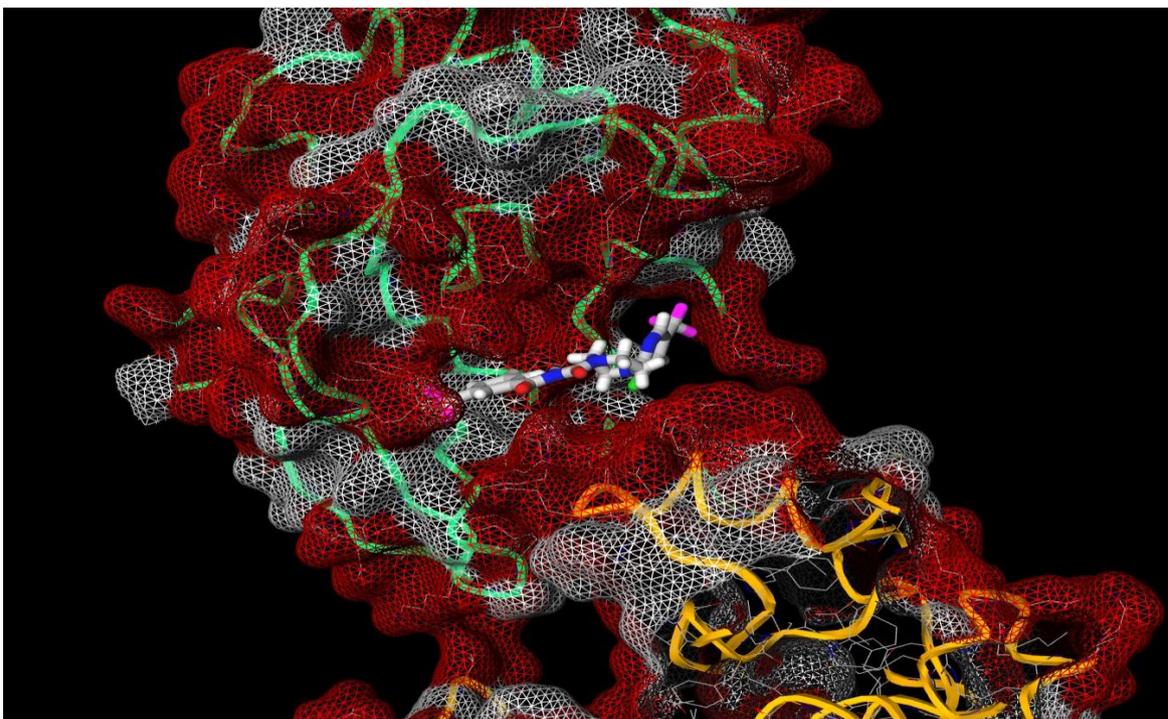
Como resultado del screening se han obtenido las siguientes moléculas:

- 24367874_Accepted
- 24301892_Intermediate
- 843300_Intermediate

Estos tres compuestos cumplen con los requisitos de seguridad en el test CAESAR, siendo negativos para las cuatro pruebas realizadas (mutagenicidad, carcinogenicidad y sensibilidad al contacto). Además, tienen un LOGP por debajo de 5 y por encima de 0, valores apropiados para una buena absorción y distribución del compuesto en el organismo. Sus pesos moleculares no son elevados, por lo que son apropiados para una buena absorción. También han mostrado una buena interacción con la proteína diana.

2.4.1 24367874 Accepted

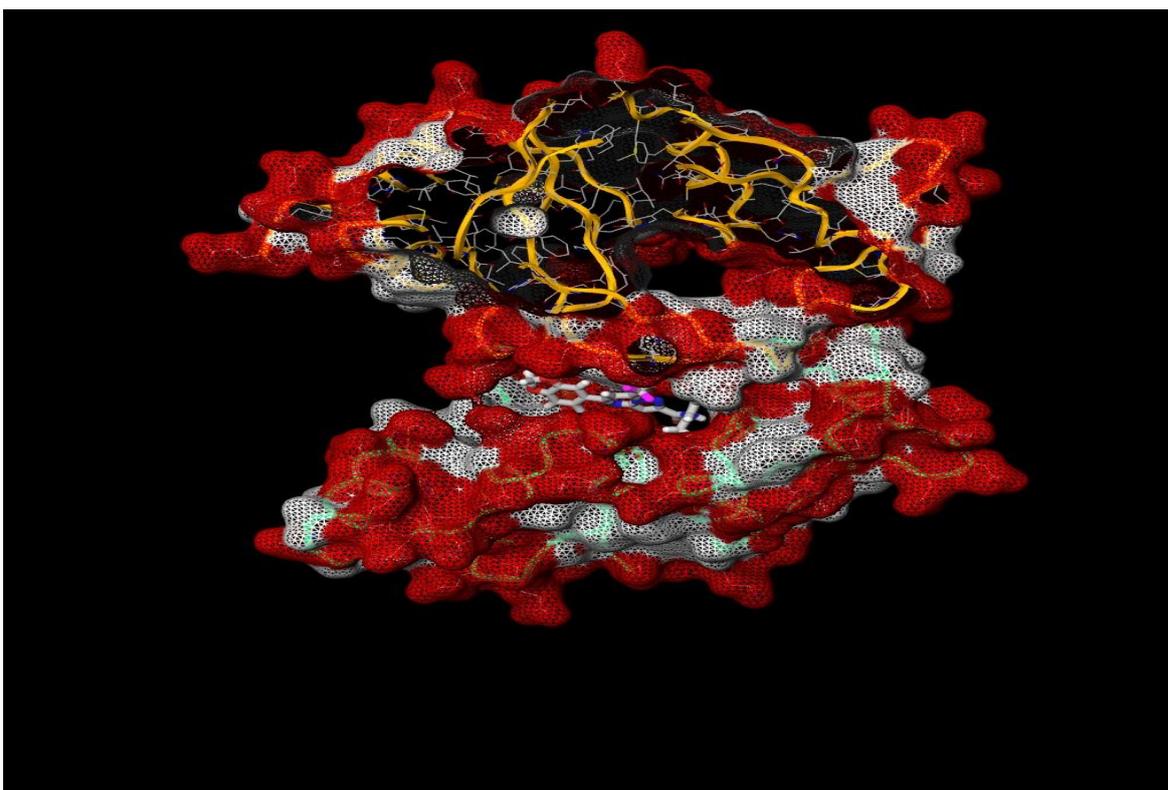
Esta molécula ha sido obtenida de la librería diverse y tiene interacción con la proteína "RAC-beta serine/threonine-protein kinase" (residuos 146-480, cadenas A y B). El centro de unión a ella está situado en los ejes (17.615, -45.735, -0.09).



Unión de 24367874_Accepted con 3D0E

2.4.2 24301892 Intermediate

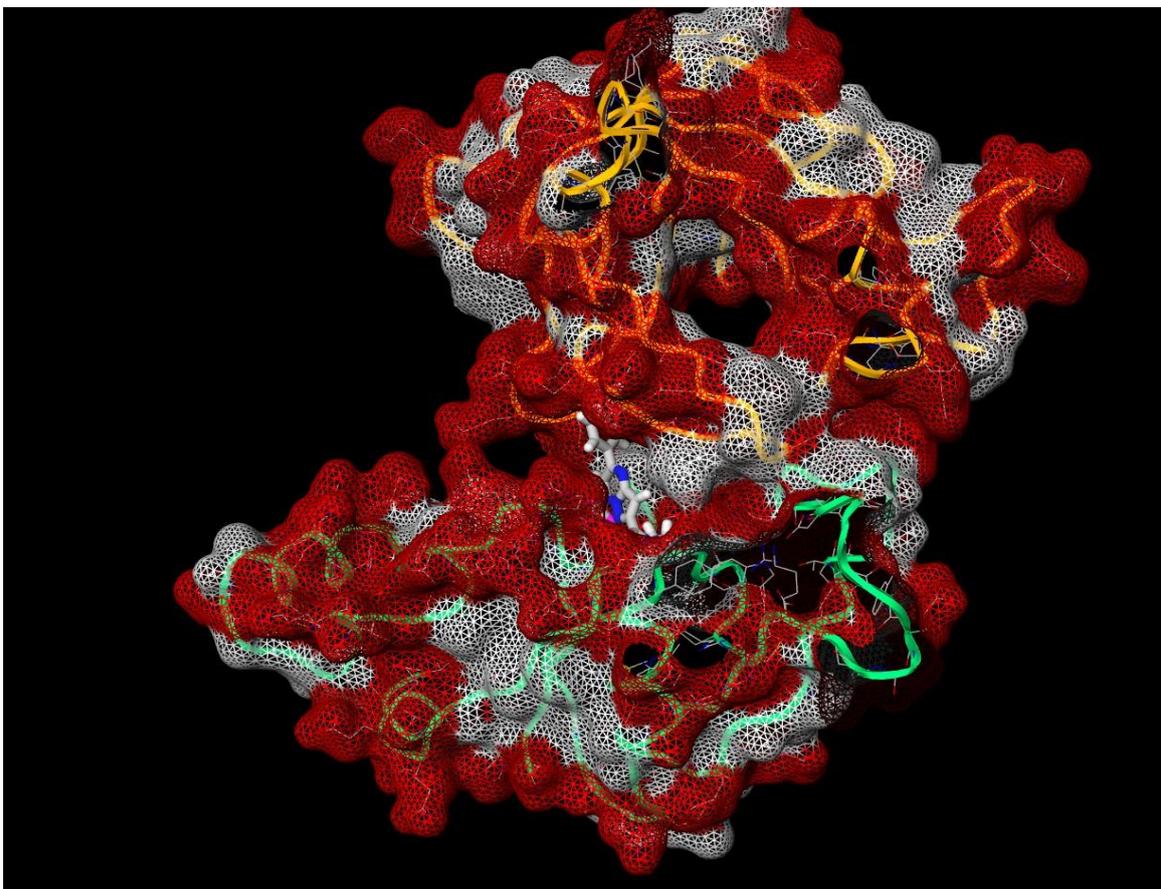
Esta molécula ha sido obtenida de la librería iPPI y tiene interacción con la proteína “Thymocyte nuclear protein 1”. El centro de unión a ella está situado en los ejes (-2.35, 13.66, 74.50).



Unión de 24301892_Intermediate con 3EOP

2.4.3 843300 Intermediate

Esta molécula ha sido obtenida de la librería iPPI y tiene interacción con la proteína “Thymocyte nuclear protein 1”. El centro de unión a ella está situado en los ejes (-2.35, 13.66, 74.50).



Unión de 843300_Intermediate con 3EOP

2.5 RESULTADO DEL SCREENING BASADO EN ESTRUCTURA CON DERIVADOS DE LOS FÁRMACOS DAPAGLIFLOZINA, GLIQUIDONA Y MITIGLINIDA COMO MOLÉCULAS DE UNIÓN

Debido a que no se obtuvieron resultados de screening en la proteína “Fatty acid-binding protein”, y por su creciente importancia como diana terapéutica de la enfermedad, se decidió probar con otra librería de moléculas. Esta librería se creó a partir de los siguientes tres fármacos conocidos para la enfermedad:

- Dapagliflozina: pertenece a la clase de medicamentos inhibidores del co-transportador 2 de sodio y glucosa (SGLT2). Actúa en los riñones haciendo que liberen más glucosa en la orina, reduciendo así los niveles de glucosa en sangre.
- Gliquidona: es un bloqueante de los canales de potasio que funciona como estimulador de la producción de insulina en las células beta pancreáticas de los islotes de Langerhans.

- Mitiglinida: estimula la secreción de insulina mediante el cierre de los canales de potasio ATP sensibles, produciendo una liberación de insulina temprana y de corta duración.

A partir de estos fármacos se generaron tres bibliotecas de moléculas formadas por variantes de estas últimas. Se utilizó la molécula 2HNX como estructura 3D de la proteína "Fatty acid-binding protein". Debido al gran número de moléculas generadas, únicamente se analizaron las tres moléculas con mejor energía de unión para cada librería.

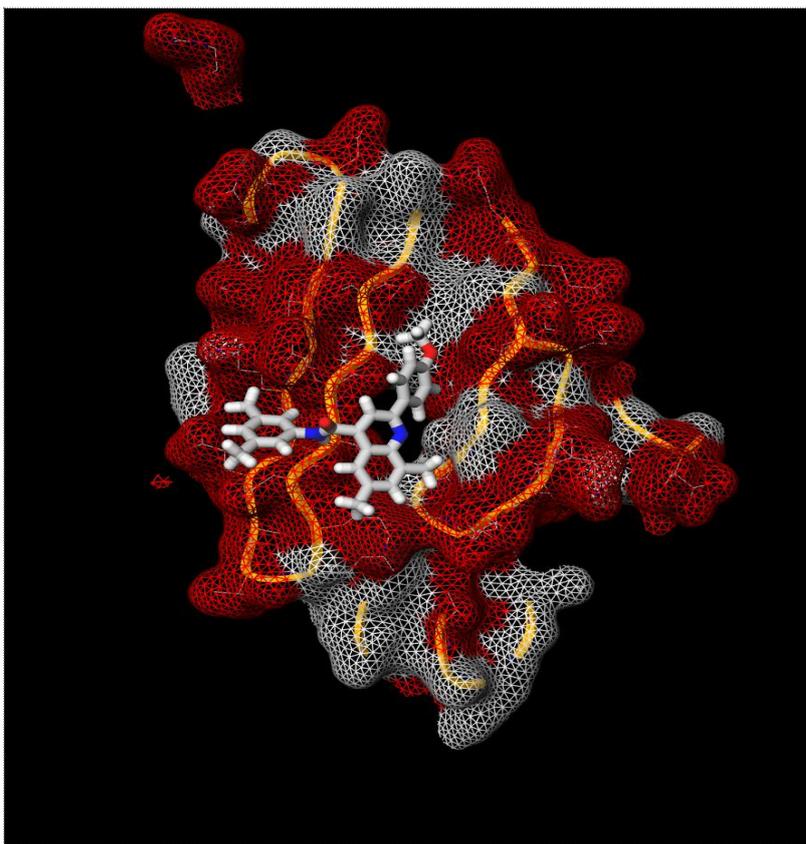
A continuación se muestran los resultados obtenidos:

2HNX													
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		MOLÉCULA			LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	Dapagliflozina	Gliquidona	Mitiglinida		
 C-329060413		X	X			X		X		X			2.80
 C-329060415		X		X		X		X		X			6.14
 C-329061310		X		X		X		X		X			5.16
 C-329078732		X		X	X			X			X		2.75
 C-329078735		X		X		X		X		X			3.20
 C-329080739	X			X		X		X			X		3.89
 C-329071712		X		X		X		X				X	3.27
 C-329072847	X			X	X			X				X	4.03
 C-329072852		X		X	X			X				X	3.68

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

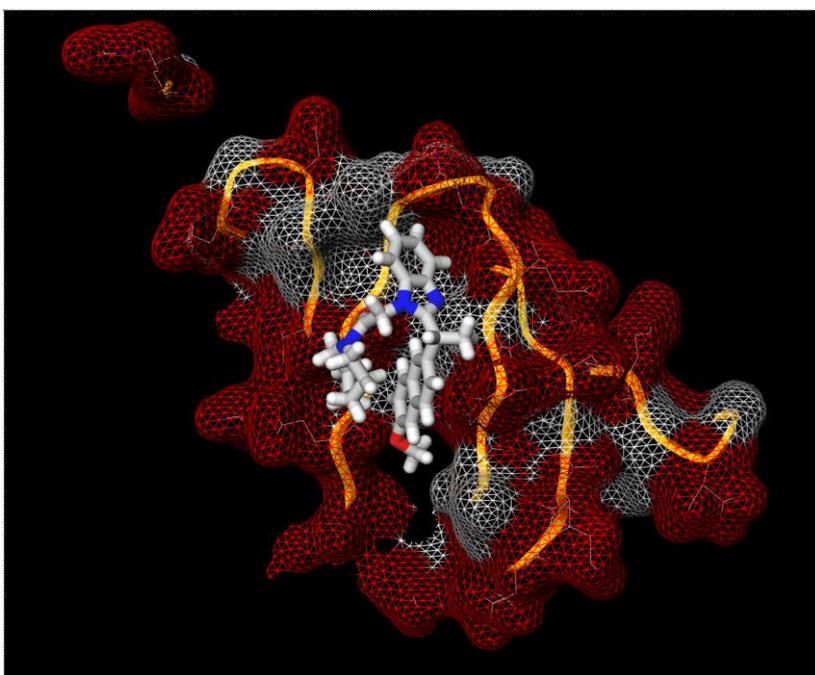
Se han seleccionado las moléculas C-329060415 y C-329061310 derivadas del fármaco dapagliflozina y C-329078735 derivada de gliquidona. Aunque dos de ellas no muestran un LOGP entre 0 y 5 se han seleccionado por sus resultados en el test CAESAR. El centro de unión a 2HNX está situado en los ejes (35.75, 31.52, 12.12).

C-329060415



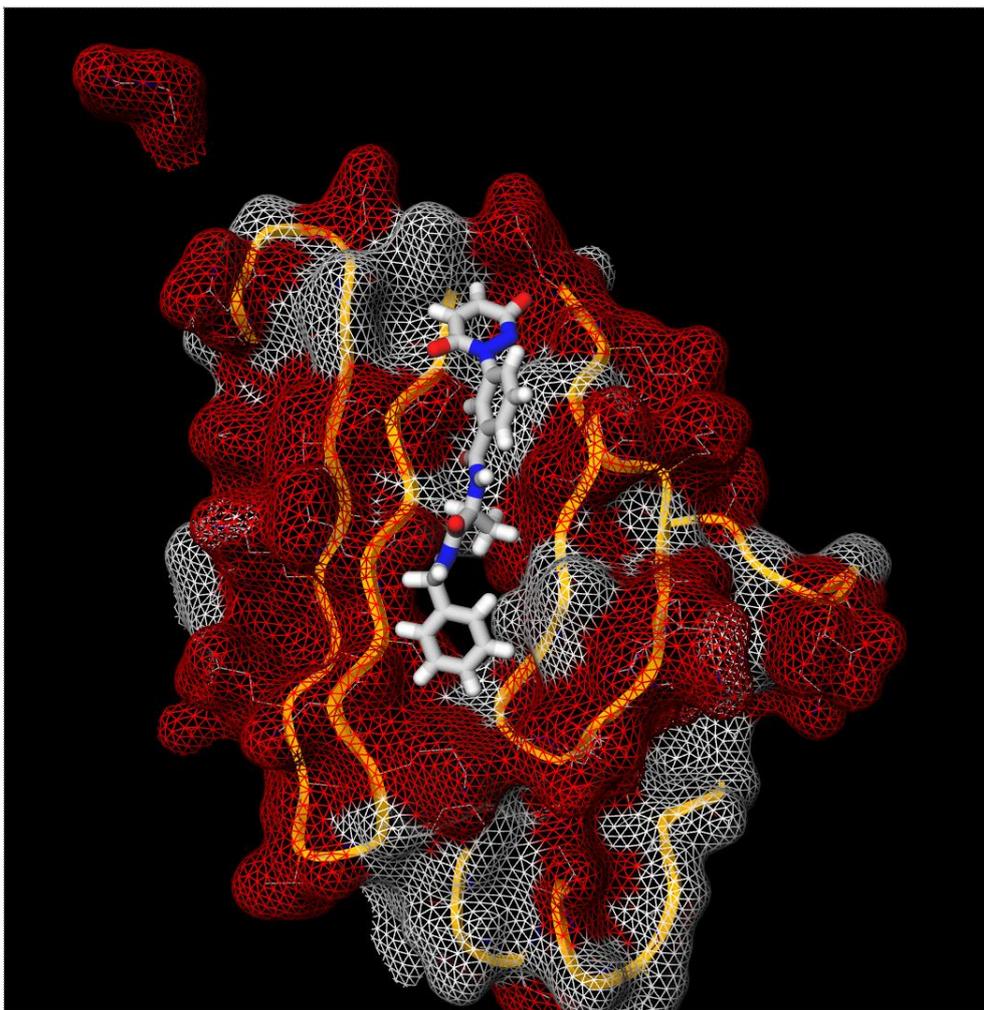
Unión de C-329060415 a 2HNX

C-329061310



Unión de C-329061310 a 2HNX

C-329078735



Unión de C-329078735 a 2HNX

3. BÚSQUEDA COMPUTACIONAL DE FÁRMACOS PARA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

3.1 LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA, UNA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA DE TIPO NEUROMUSCULAR

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una anomalía degenerativa en la que las células nerviosas encargadas del movimiento, motoneuronas, disminuyen gradualmente su funcionamiento y mueren. Existen dos variantes de esta: la esporádica, que comprende del 90% al 95% de los casos, y la familiar, donde hay un componente genético importante (Al-Chalabi A. et al., 2007). Los síntomas más comunes de esta enfermedad se componen de una progresiva parálisis seguida de debilidad muscular, temblores y contracciones súbitas (Goetz CG. et al., 2000).

3.1.2 DIANAS CONOCIDAS PARA LA ENFERMEDAD

Ataxin-2-like protein: está localizada en el citoplasma celular, donde interacciona con el retículo endoplasmático implicándose así en la síntesis, procesamiento y transporte intracelular de las proteínas. Se ha encontrado que el gen que codifica para esta proteína (ATXN2) se encuentra deslocalizado en algunos pacientes con esclerosis lateral amiotrófica y representa uno de los genes de susceptibilidad a la enfermedad (Pasterkamp RJ. et al., 2014).

Sortilin: es una proteína perteneciente al grupo de glicoproteínas de membrana tipo 1. Funciona como proteína de transporte y participa en múltiples procesos biológicos incluido el desarrollo neuronal. Se han relacionado mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (SORT1) con procesos de neurodegeneración en los que se incluye la esclerosis lateral amiotrófica (Rouleau GA. et al., 2012).

RNA-binding protein FUS: es una proteína de unión al DNA tanto de doble como de cadena simple y una de sus funciones consiste en mantener la integridad genómica. Mutaciones en su gen codificante (FUS) es causante de una de las variantes de la enfermedad más tempranas y agresivas (Al-Chalabi A. et al., 2011).

TAR DNA-binding protein 43: es una proteína de unión tanto a DNA como RNA que funciona como represor transcripcional y regulador de splicing alternativo. Se han identificado inclusiones anormales de esta proteína en el citoplasma de las células de algunos pacientes con ELA (Neuman M. et al., 2011).

Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6: es una serin peptidasa con motivo de unión a los canales de potasio neuronales controlados por voltaje. Variaciones genéticas en el gen que codifica para esta proteína (DPP6) han sido asociados con susceptibilidad a padecer la enfermedad (Van den Berg LH. et al., 2008).

Charged multivesicular body protein 2b: es una proteína que forma parte del complejo ESCRT-III, involucrado en la formación de cuerpos multivesiculares y su tráfico entre la membrana celular, redes trans-Golgi y lisosomas. En los últimos años se ha estimado su implicación en determinados casos de esclerosis lateral amiotrófica (J. Shaw et al., 2010).

C9orf72: es una proteína que se encuentra en distintas regiones del cerebro, tanto en el citoplasma neuronal como en terminaciones pre sinápticas. Posibles repeticiones de los nucleótidos GGGGCC en el gen que codifica para esta proteína han sido ligados a casos de ELA (Rademakers et al., 2012).

Sequestosome-1: es un receptor que interacciona con los compuestos destinados a ser eliminados o autofagocitados. Se ha relacionado esta proteína en distintos procesos neurodegenerativos incluyendo esclerosis lateral amiotrófica. Estos estudios sugieren que la regulación de la degradación proteica podría ser una importante diana terapéutica en neuronas motoras (Siddique T. et al., 2011).

Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4: es una tirosin quinasa que funciona como receptor celular y está implicada en el proceso de desarrollo del sistema nervioso central. Desregulaciones en este proceso a causa de mutaciones en el gen que codifica para esta proteína están relacionadas con la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica, por lo que se ha catalogado a esta proteína como una prometedora diana terapéutica para futuros tratamientos (Shoji Tsuji et al., 2013).

Serum paraoxonase/arylesterase 1: es una enzima capaz de hidrolizar un amplio espectro de sustancias incluyendo pesticidas. Es conocida por actuar en contra de la formación de placas de ateroma en los vasos sanguíneos. Una variante del promotor del gen que codifica para esta proteína ha sido asociada a casos de ELA esporádicos (H. Brown Jr. et al., 2009).

3.2 MOLÉCULAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO COMO ESTRUCTURA 3D PARA CADA UNA DE LAS DIANAS

Una vez definidas las dianas con las que trabajar, se han obtenido sus estructuras 3D para la búsqueda posterior de moléculas en las que haya una interacción con estas. Se ha intentado elegir, a pesar de que no siempre ha sido posible, moléculas por debajo de 3A de resolución y también cubrir el máximo de proteína posible (tanto a nivel de cadenas como aminoácidos en cada una de ellas). Las proteínas elegidas para cada una de las proteínas diana se muestran en la Figura 2.

ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA					
NOMBRE DE LA PROTEINA	NOMBRE ESTRUCTURA	TÉCNICA	AMINOÁCIDOS	RESOLUCIÓN	CADENA
Ataxin-2-like protein					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3KTR	3KTR	RAYOS X	912-928	1.7A	B
Sortilin					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3F6K	3F6K	RAYOS X	78-756	2A	A
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3G2U	3G2U	RAYOS X	819-831	2.1A	C/D
RNA-binding protein FUS					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2LCW	2LCW	NMR	278-385		A
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4FDD	4FDD	RAYOS X	498-526	2.3A	B
TAR DNA-binding protein 43					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2N4P	2N4P	NMR	1-77		A
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4Y00	4Y00	RAYOS X	101-191	3A	A/B/C/D
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1WFO	1WFO	NMR	193-267		A
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2N2C	2N2C	NMR	307-349		A
Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1XFD	1XFD	RAYOS X	127-849	3A	A/B/C/D
Charged multivesicular body protein 2b					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2JQK	2JQK	NMR	195-213		B
C9orf72					
http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3lns	3LNS	HOMOLOGÍA (23%)	48-228	2.5A	A
Sequestosome-1					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4MJS	4MJS	RAYOS X	3-102	2.5A	B/D/F/H/J/L/N/P/R/T/V/X
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4UF8	4UF8	Microscopía electrónica	3-102	10.9A	A/B/C/I
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2KNV	2KNV	NMR	387-436		A/B
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2K0B	2K0B	NMR	387-436		X
Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2AHX	2AHX	RAYOS X	26-641	2.4A	A/B
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2LCX	2LCX	NMR	642-685		A/B
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2R4B	2R4B	RAYOS X	690-999	2.4A	A/B
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3BBW	3BBW	RAYOS X	702-1029	4A	A/B
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3U7U	3U7U	RAYOS X	26-640	3.03A	A/B/C/D/E/F
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3BBT	3BBT	RAYOS X	702-1029	2.8A	B/D
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3BCE	3BCE	RAYOS X	702-1030	2.5A	A/B/C
Serum paraoxonase/arylesterase 1					
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1V04	1V04	X ray	1-353	2.2A	A

Figura 2. Cuadro resumen de las dianas con las equivalentes estructuras 3D utilizadas en esclerosis lateral amiotrófica

3.3 RESULTADOS DEL SCREENING BASADO EN ESTRUCTURA PARA CADA UNA DE LAS DIANAS CON LAS LIBRERÍAS DIVERSE Y IPPI

Para este screening se ha utilizado como herramienta el portal gratuito MTiOpenScreen como herramienta de screening (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/MTiOpenScreen/>).

3.3.1 ATAXIN-2-LIKE PROTEIN

Se ha seleccionado el compuesto 124948531_Intermediate de la librería diverse y 57264156_Intermediate de la librería iPPI como candidatos a futuros estudios.

124948531_Intermediate tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -6.3J/mol , un peso molecular de 446.45 Da y un valor LOGP de 1.84. 57264156_Intermediate tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -6.3J/mol , un peso molecular de 454.40 Da y un valor LOGP de 2.68.

3.3.1.1 3KTR

3KTR												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 124948531_Intermediate		X		X		X		X	X		1.84	
 99456539_Accepted		X		X	X			X	X		3.88	
 24800368_Intermediate		X		X	X		X		X		2.95	
 24392627_Intermediate		X		X	X		X		X		5.33	
 49720355_Intermediate		X		X	X			X	X		4.29	
 49672589_Intermediate		X	X		X		X			X	3.4	
 24375143_Intermediate		X		X	X		X			X	5.1	
 49735783_Intermediate		X		X		X	X			X	2.96	
 144116908_Accepted										X	5.26	
 57264156_Intermediate		X		X		X		X		X	2.68	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.2 SORTILIN

Se ha seleccionado el compuesto 22405943_Intermediate de la librería diverse y 26668244_Intermediate de la librería ipPI como candidatos a futuros estudios.

22405943_Intermediate tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -10.3J/mol , un peso molecular de 496.52 Da y un valor LOGP de 5.23. 26668244_Intermediate tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -10.4J/mol , un peso molecular de 459.50 Da y un valor LOGP de 3.35.

3.3.2.1 3F6K

3F6K												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
									X			
									X			
									X			
									X			
									X			
 24384915_Intermediate		X		X	X		X			X	4.58	
 124948065_Intermediate		X		X	X			X		X	3.39	
 125269075_Intermediate										X	5.94	
 24838027_Intermediate										X	2.41	
 24386880_Intermediate										X	4.66	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.2.2 3G2U

3G2U											
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI	
 22405943_Intermediate		X		X		X		X	X		5.23
 26732385_Accepted		X	X		X		X		X		4.44
 26724445_Intermediate		X		X	X		X		X		1.81
 17454044_Intermediate		X		X	X		X		X		4.98
 4240557_Intermediate		X		X		X	X		X		4.62
 124892234_Intermediate		X		X	X		X			X	5.14
 24323741_Intermediate										X	3.4
 24308266_Intermediate		X		X	X		X			X	4.17
 26668244_Intermediate		X		X		X		X	X	X	3.35
 17507141_Intermediate		X	X		X		X			X	2.59

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.3 RNA-BINDING PROTEIN FUS

Se ha seleccionado los compuestos 57267229_Intermediate y 57263598_Accepted de la librería diverse como candidatos a futuros estudios. El primero de ellos se une a la estructura 3D 2LCW y el segundo a 4FDD. 57267229_Intermediate tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -6.8J/mol , un peso molecular de 464.55 Da y un valor LOGP de 1.67. 57263598_Accepted tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -6.6J/mol , un peso molecular de 417.88 Da y un valor LOGP de 4.02.

3.3.3.1 2LCW

2LCW											
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI	
 57267229_Intermediate		X		X		X		X	X		1.67
 17401205_Intermediate									X		3.75
 24838779_Accepted	X			X	X			X	X		1.3
 49721413_Accepted	X			X		X		X	X		2.47
 137275840_Intermediate	X		X		X		X		X		0.7
 24829552_Intermediate	X			X	X		X			X	1.94
 96021324_Intermediate		X		X	X		X			X	4.28
 143472208_Accepted		X		X	X		X			X	3.36
 24378668_Intermediate										X	4.26
 17471562_Accepted	X			X	X		X			X	4.16

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.1.1 4FDD

4FDD												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGÉNICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
14745686_Intermediate										X		3.65
 57263598_Accepted		X		X		X		X		X		4.02
103158922_Intermediate		X		X	X		X		X			2.96
 57266221_Intermediate	X		X			X	X		X			1.87
87334306_Intermediate										X		4.29
 3716090_Intermediate		X	X		X		X				X	3.46
24800127_Intermediate		X		X	X		X				X	2.44
57263950_Intermediate											X	0.99
 49713954_Accepted		X	X		X		X				X	4.48
 24792190_Intermediate		X		X	X		X				X	4.45

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.4 TAR DNA-BINDING PROTEIN 43

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 4Y00 y 1WF0.

Se ha seleccionado el compuesto 24340811_Intermediate como candidato a futuros estudios. Esta molécula pertenece a la librería diverse, tiene una energía libre de Gibbs respecto a la unión con su proteína de -9.5J/mol , un peso molecular de 452.50 Da y un valor LOGP de 5.63.

3.3.4.1 4Y00

4Y00												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGÉNICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 24340811_Intermediate		X		X		X		X	X			5.63
85756536_Intermediate		X		X	X			X	X			3.52
 850146_Intermediate		X		X	X		X		X			3.61
85240385_Intermediate										X		2.54
 24351478_Intermediate		X		X	X		X		X			5.39
22416728_Intermediate											X	5.43
17387410_Intermediate											X	4.39
24375539_Intermediate											X	5.13
4252352_Accepted											X	1.68
 125305267_Intermediate		X	X		X		X		X		X	2.59

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.4.2 1WFO

1WFO												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
24280961_Intermediate										X		3.04
 17463025_Intermediate	X			X		X	X			X		1.97
26538804_Intermediate										X		0.79
 22416779_Intermediate		X	X			X		X		X		3.49
 24406303_Intermediate		X	X				X	X		X		3.14
 17401922_Intermediate	X		X			X		X			X	2.63
 24391012_Intermediate		X		X		X		X			X	3.43
26724216_Intermediate											X	1.96
 104224012_Accepted		X	X			X			X		X	2.31
 4246793_Intermediate		X		X		X		X			X	3.55

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.5 DIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE-LIKE PROTEIN 6

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

3.3.5.1 1XFD

1XFD												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
49826869_Intermediate										X		3.05
 26614187_Accepted		X		X	X		X		X			3.78
17454984_Intermediate										X		2.64
 99494591_Accepted		X		X	X		X		X			2.04
 17505342_Intermediate		X		X		X	X		X			3.97
 49816770_Intermediate	X			X	X			X			X	2.94
26618070_Intermediate											X	3.68
864236_Intermediate											X	3.51
 24300932_Intermediate	X			X	X			X			X	4.05
24779093_Intermediate											X	1.96

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.6 CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN 2B

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

3.3.6.1 2JQK

2JQK												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
 56315566_Accepted		X	X		X		X		X		2.84	
 22407288_Intermediate	X			X	X		X		X		5.17	
 49676185_Accepted	X			X	X		X		X		2	
 24839845_Intermediate		X		X		X	X		X		4.74	
 7965646_Accepted		X		X		X	X		X		4.16	
										X		
										X		
										X		
										X		
										X		

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto. En este caso no se han obtenido resultado de la librería iPPI.

3.3.7 C9ORF72

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

3.3.7.1 3LNS

3LNS												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
										X		
										X		
										X		
										X		
										X		
										X		
 26537276_Intermediate										X	4.99	
 24293621_Intermediate		X	X		X		X			X	2.79	
 22400623_Intermediate										X	4.83	
 24280957_Intermediate		X	X		X		X			X	5.78	
 26647132_Accepted										X	1.9	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.8 SEQUESTOSOME-1

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 2KNV y 2K0B. No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

3.3.8.1 2KNV

2KNV												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 26667417_Accepted		X		X	X			X	X		3.81	
 24784239_Accepted	X		X			X		X	X		2.75	
 22406946_Intermediate	X			X	X			X	X		5.04	
 24378337_Intermediate		X	X		X			X	X		3.06	
 7977380_Accepted	X		X		X			X	X		2.6	
 17386150_Intermediate		X		X	X			X		X	4.61	
 24791728_Intermediate										X	2.97	
 49817764_Intermediate		X	X		X			X		X	3.39	
 852133_Intermediate		X		X		X		X		X	2.58	
 22411121_Intermediate	X			X	X			X		X	5.05	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.8.2 2K0B

2K0B												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 14726379_Accepted										X	3.39	
 144095490_Intermediate	X			X	X			X	X		2.66	
 26543383_Intermediate		X		X	X			X	X		3.08	
 56373743_Intermediate		X	X		X			X	X		4.45	
 22405198_Intermediate										X	-0.28	
 24836808_Intermediate		X	X		X			X		X	3.77	
 47195781_Accepted		X		X	X			X		X	4.29	
 49665941_Accepted		X		X	X			X		X	2.44	
 7972598_Intermediate	X		X		X			X		X	2.53	
 24325430_Intermediate	X			X	X			X		X	3.51	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.9 RECEPTOR TYROSINE-PROTEIN KINASE ERBB-4

En esta proteína únicamente se encontró resultado de screening en 2AHX, 2LCX, 3U7U y 3BB7. No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

3.3.9.1 2AHX

2AHX												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 49721799_Intermediate		X		X	X			X	X		4.23	
 24280440_Accepted		X		X	X		X	X			2.63	
 26626892_Intermediate	X			X	X		X	X	X		3.48	
 858641_Intermediate		X		X	X		X	X	X		3.85	
 24332913_Intermediate	X			X	X		X	X	X		4.35	
 24386666_Intermediate										X	5.42	
 24404525_Accepted	X			X	X			X		X	3.61	
 24375539_Intermediate										X	5.13	
 49737376_Intermediate		X		X	X			X		X	3.21	
 17450298_Intermediate		X		X	X		X			X	4.71	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.9.2 2LCX

2LCX												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	IPPI		
 87349205_Intermediate		X		X	X			X	X		4.44	
 24372710_Intermediate		X		X	X		X	X	X		4.66	
 56320605_Intermediate		X		X		X	X	X	X		2.64	
 125269178_Intermediate									X		2.99	
 56322248_Intermediate		X		X	X			X	X		3.49	
 26661590_Intermediate	X		X		X		X			X	5.29	
 24800660_Accepted										X	2.12	
 124949837_Intermediate		X		X	X		X			X	3.84	
 17408752_Accepted		X	X		X		X		X		3.76	
 24827386_Intermediate		X		X	X			X		X	4.19	

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.9.3 3U7U

3U7U												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
										X		
										X		
										X		
										X		
										X		
 49718269_Intermediate		X	X			X			X		X	0.79
 85269730_Intermediate		X		X		X		X			X	3.43
 124949588_Accepted	X		X				X	X			X	3.57
 14721267_Intermediate		X		X		X			X		X	4.51
 14745133_Intermediate		X		X		X		X			X	4.94

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.9.4 3BB7

3BB7												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
 104223052_Intermediate		X		X		X		X		X		3.64
 57255660_Accepted	X			X		X			X	X		3.46
 90341546_Intermediate		X	X				X	X		X		3.82
 124948790_Intermediate	X			X			X	X		X		3.65
 24392101_Intermediate										X		4.87
 7968970_Intermediate		X		X		X			X		X	3.5
 24321313_Intermediate											X	2.4
 24351429_Intermediate											X	2.21
 17460498_Intermediate		X		X		X		X			X	4.35
 17516830_Intermediate		X		X		X			X		X	4.97

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.3.10 SERUM PARAOXONASE/ARYLESTERASE 1

No se ha seleccionado ningún compuesto por no cumplir con las condiciones establecidas de seguridad (mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad y sensibilidad al contacto).

3.3.10.1 1V04

1V04												
NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGENICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		LIBRERÍA		LOGP	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	DIVERSE	iPPI		
 22413906_Intermediate										X		2.14
 4248364_Intermediate		X	X			X		X		X		2.1
 124897793_Intermediate	X			X	X			X		X		1.9
 24304068_Intermediate										X		2.87
 49673407_Accepted		X		X	X				X	X		1.97
 51087985_Intermediate		X	X		X			X			X	3.99
 4257586_Accepted											X	3.11
 89854106_Accepted		X	X		X			X			X	2.22
 99357601_Intermediate											X	4.32
 24360187_Intermediate	X			X	X			X			X	4.68

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto

3.4 DOCKING Y PROPIEDADES DE LAS MOLÉCULAS SELECCIONADAS DEL SCREENING

Como resultado del screening se han obtenido las siguientes moléculas:

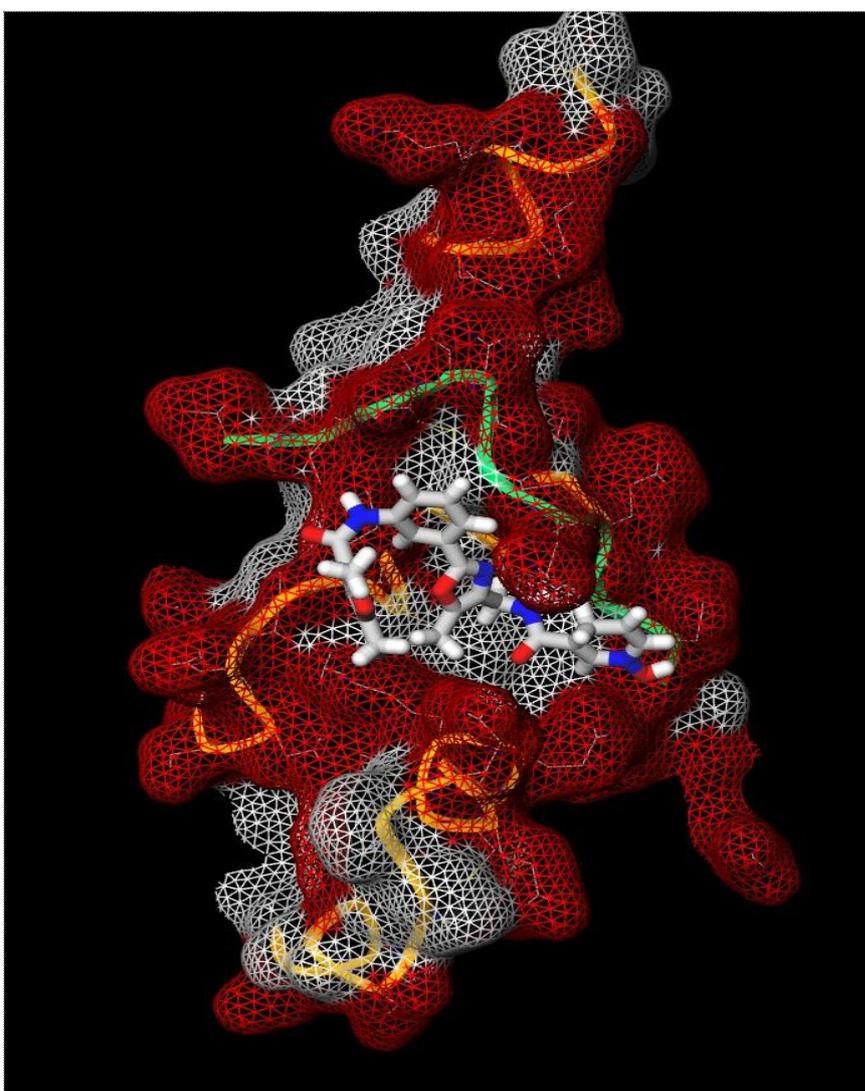
- 124948531_Intermediate
- 57264156_Intermediate
- 22405943_Intermediate
- 26668244_Intermediate
- 57267229_Intermediate
- 57263598_Accepted
- 24340811_Intermediate

Una vez realizado el docking posterior para comprobar los resultados, hubo problemas de reconocimiento con los compuestos 57264156_Intermediate y 57267229_Intermediate, por lo que fueron descartados.

Las cinco moléculas restantes cumplen con los requisitos de seguridad en el test CAESAR, siendo negativos para las cuatro pruebas realizadas (mutagenicidad, carcinogenicidad y sensibilidad al contacto). Además, tienen un LOGP por debajo de 5 y por encima de 0 (a excepción de 22405943_Intermediate y 24340811_Intermediate), valores apropiados para una buena absorción y distribución del compuesto en el organismo. Sus pesos moleculares también son apropiados para una buena absorción y han mostrado una buena interacción con la proteína diana.

3.4.1 124948531 Intermediate

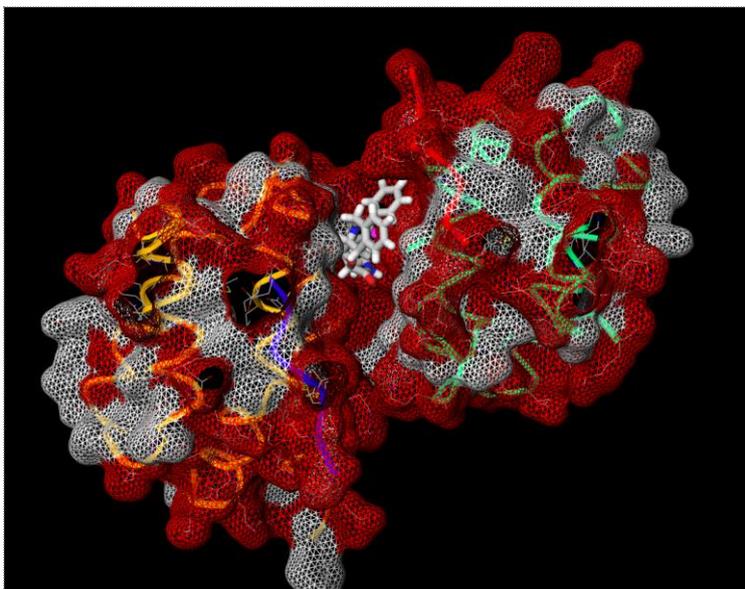
Esta molécula ha sido obtenida de la librería diverse y tiene interacción con la proteína "Ataxin-2-like protein" (residuos 912-928, cadena B). El centro de unión a ella está situado en los ejes (-9.56, 7.99, -2.05).



Unión de 124948531_Intermediate con 3KTR

3.4.2 22405943 Intermediate

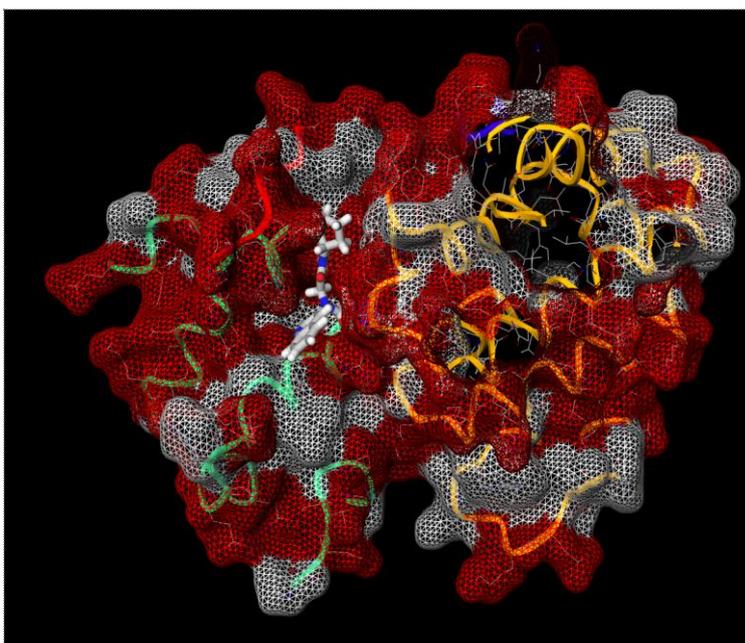
Esta molécula ha sido obtenida de la librería diverse y tiene interacción con la proteína "Sortilin" (residuos 819-831, cadenas C y D). El centro de unión a ella está situado en los ejes (8.68, -6.05, -19.91).



Unión de 22405943_Intermediate con 3G2U

3.4.3 26668244 Intermediate

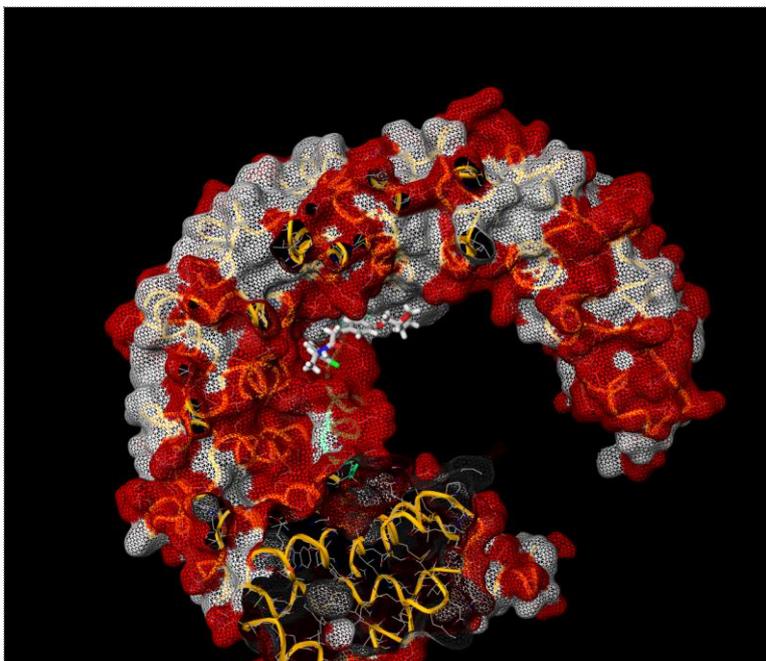
Esta molécula ha sido obtenida de la librería iPPI y tiene interacción con la proteína "Sortilin" (residuos 819-831, cadenas C y D). El centro de unión a ella está situado en los ejes (8.68, -6.05, -19.91).



Unión de 26668244_Intermediate con 3G2U

3.4.4 57263598 Accepted

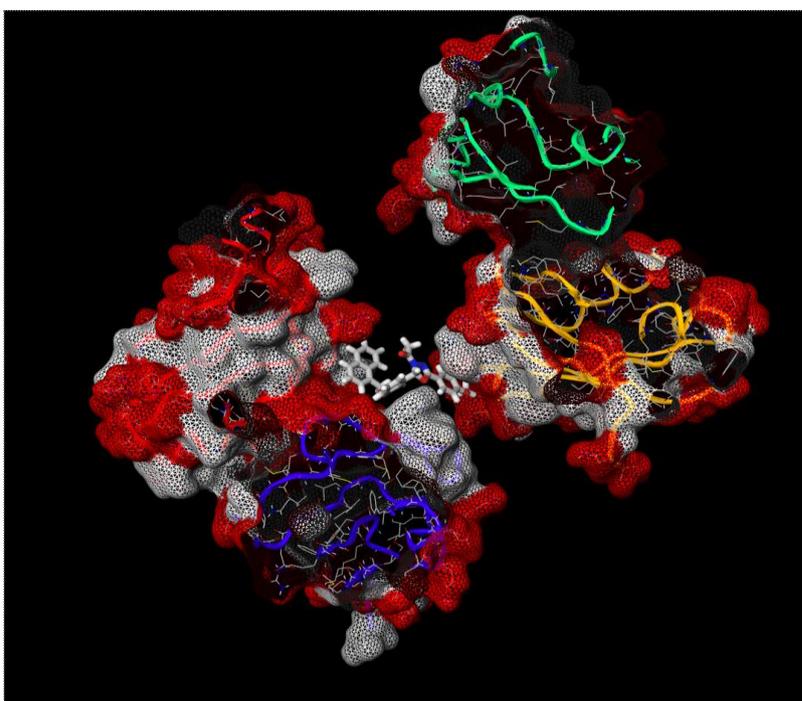
Esta molécula ha sido obtenida de la librería diverse y tiene interacción con la proteína “RNA-binding protein FUS” (residuos 498-526, cadena B). El centro de unión a ella está situado en los ejes (33.79, 42.22, -3.48).



Unión de 57263598_Accepted con 4FDD

3.4.5 24340811 Intermediate

Esta molécula ha sido obtenida de la librería diverse y tiene interacción con la proteína “TAR DNA-binding protein 43” (residuos 101-191, cadenas A, B, C y D). El centro de unión a ella está situado en los ejes (-94.40, 32.24, -196.41).



Unión de 24340811_Intermediate con 4Y00

4. GENERACIÓN DE MOLECULAS ADICIONALES A PARTIR DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS EN EL SCREENING INICIAL

Se utilizaron los compuestos seleccionados en el primer screening (843300, 24301892, 2436787, 22405943, 24340811, 26668244, 57263598, 124948531) como plantilla para generar nuevas librerías de productos similares a estos. Después, se repitió el screening basado en estructura, utilizando las nuevas librerías en lugar de las diverse e iPPI. Los resultados del screening se muestran a continuación:

	NOMBRE	MUTAGÉNICO		CARCINOGÉNICO		TÓXICO		SENSIBILIZANTE		MOLECULA								LOGP
		SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	843300	24301892	2436787	22405943	24340811	26668244	57263598	124948531	
	C-329084646		X		X		X		X	X								2.74
	C-329084656		X		X	X			X	X								3.97
	C-329085609		X		X	X			X	X								6.31
	C-329085122		X		X	X			X		X							4.43
	C-329085869		X		X	X			X		X							3.92
	C-329085874		X		X	X		X			X							2.92
	C-329086105		X		X	X		X			X							4.68
	C-329093398		X	X			X	X			X							2.93
	C-329093411		X		X	X			X		X							3.62
	C-329094774		X	X		X			X			X						4.96
	C-329094777	X			X		X		X			X						4.65
	C-329096606		X		X		X		X			X						6.24
	C-329096573	X			X		X		X					X				4.12
	C-329096590		X		X	X			X					X				3.11
	C-329098608	X			X	X			X					X				4.39
	C-329098391		X		X	X			X						X			5.32
	C-329100222		X		X	X			X						X			4.87
	C-329101605		X		X	X			X						X			4.21
	C-329100919		X		X	X			X							X		3.17
	C-329109561	X			X	X		X								X		2.36
	C-329109563		X		X		X	X								X		3.59
	C-329109312		X		X	X			X								X	4.12
	C-329109325		X		X		X		X								X	2.93
	C-329109329		X		X	X			X								X	4.75

Resultados del screening y del test CAESAR. Los compuestos seleccionados se muestran en de color amarillo, el color rojo indica el fallo en el programa VEGA al reconocer el compuesto. Se han analizado únicamente los tres mejores resultados para cada librería.

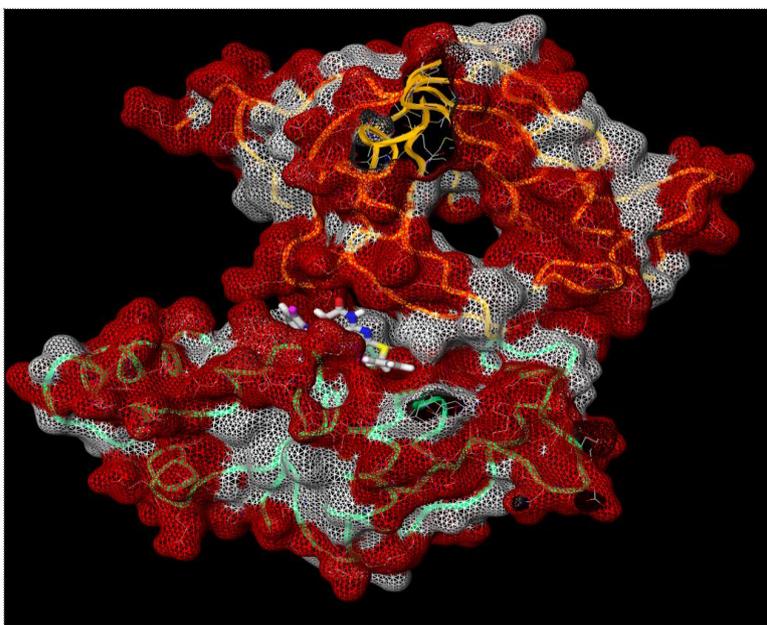
Para hacer este screening se ha mantenido el mismo “target” que se utilizó inicialmente en cada caso para la proteína que funciona como plantilla. Es decir, las moléculas generadas a partir de:

- 843300: unión a la estructura 3D 3EOP.
- 24301892: unión a la estructura 3D 3EOP.
- 24367874: unión a la estructura 3D AKT2.
- 22405943: unión a la estructura 3D 3G2U.
- 24340811: unión a la estructura 3D 4Y00.
- 26668244: unión a la estructura 3D 3G2U.
- 57263598: unión a la estructura 3D 4FDD.
- 124948531: unión a la estructura 3D 3KTR.

De los 24 compuestos analizados (los tres con mejor energía de unión al ligando de cada librería), únicamente hemos seleccionado C-329084646 (obtenido a partir de 843300), C-329096606 (generado a partir de 22405943) y C-329109325 (generado a partir de 124948531) en base a los resultados del test CAESAR.

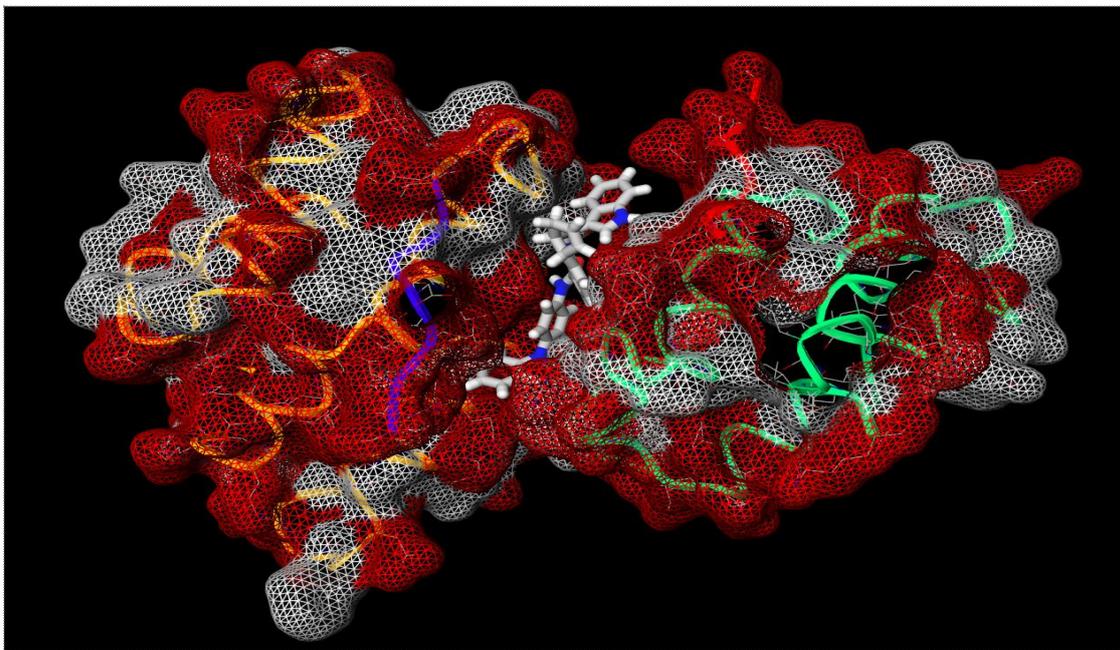
A excepción de C-329096606, los LOGP obtenidos se mantienen entre 0 y 5, valores que favorecen una correcta absorción y distribución posterior del compuesto.

C-329084646-843300



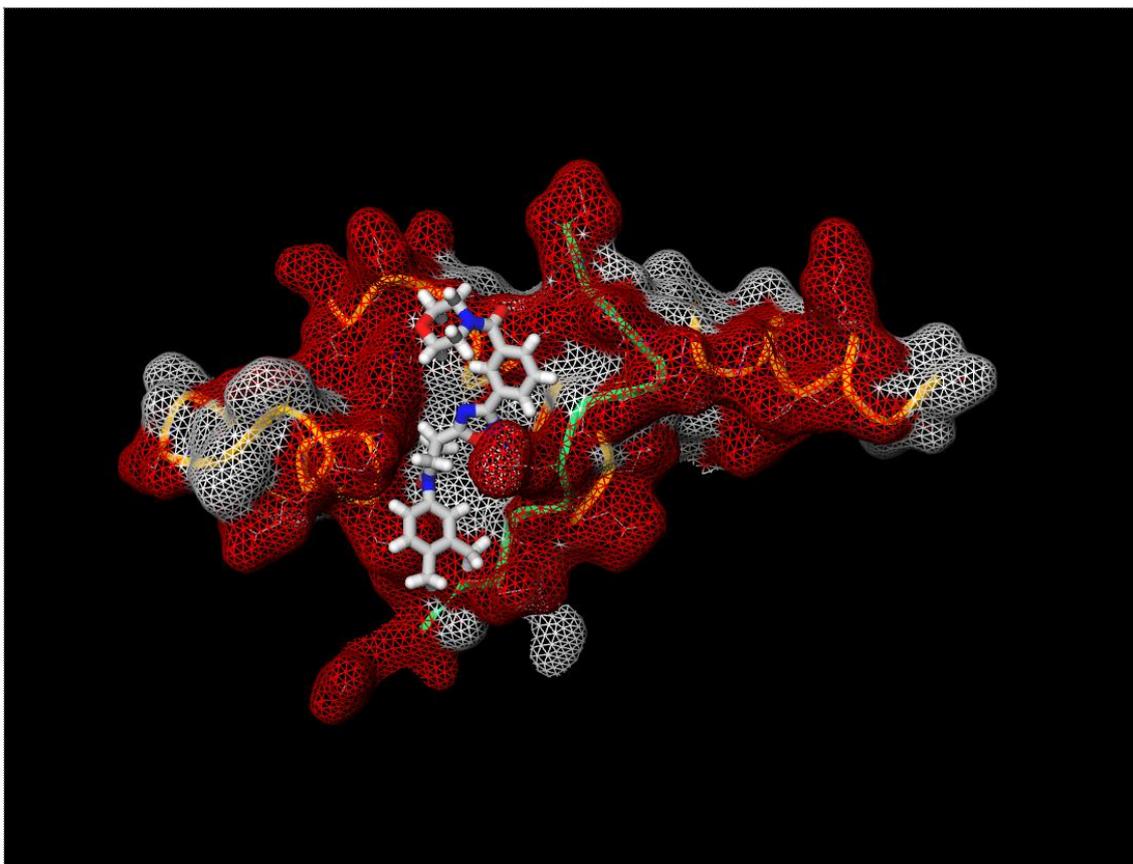
Unión de C-329084646-843300 con EOP

C-329096606-22405943



Unión de C-329096606-22405943 a 3G2U

C-329109325-124948531



Unión de C-329109325-124948531 a 3KTR

5. CONCLUSIONES

La realización de este trabajo ha cubierto varios objetivos claros. En primer lugar, ha servido como vehículo de entrada al área de la bioinformática aplicada a la industria farmacéutica, un terreno con mucho potencial y futuras expectativas laborales. A pesar de que este trabajo es solo una pincelada de lo que sería un estudio bioinformático real, una vez conocidas y elegidas las herramientas apropiadas, ha sido relativamente cómodo encontrar moléculas con buena interacción con nuestras proteínas de interés (a pesar de que la gran mayoría de ellas no cumplieran con los requisitos necesarios para utilizarlas en futuros estudios). Además, al realizar todas estas pruebas *in silico*, no han sido necesaria la gran inversión de capital propia de los estudios *in vitro*. Hay que tener en cuenta también que en este trabajo se han utilizado únicamente portales libres de coste, por lo que no es posible comparar su efectividad con los de pago.

En segundo lugar, y sin quitar importancia al punto anterior, este proyecto ha servido en mayor medida como aprendizaje al trabajo de forma autónoma. Ha sido necesaria la organización del tiempo disponible para la realización del trabajo y también la capacidad de análisis y constancia para la resolución de los problemas encontrados.

Respecto a los logros planteados inicialmente, aunque la mayoría de ellos han sido cubiertos, también han quedado temas pendientes por problemas de tiempo. Un claro ejemplo de esto son las pruebas de dinámica molecular en los compuestos obtenidos. A pesar de que una vez conocidas las herramientas apropiadas ha sido relativamente rápido encontrar las moléculas candidatas a interaccionar con las dianas elegidas, poner a punto y encontrar estas herramientas no ha sido fácil. Como se ha dicho anteriormente, en este trabajo solo se analizan los portales libres de coste, y en la amplia mayoría de estas se han encontrado problemas de incompatibilidad de ficheros o de funcionamiento. Es por esto, por lo que se ha dedicado gran parte del tiempo en hacer funcionar correctamente estas herramientas. Además, al tener que trabajar con un número muy elevado de muestras, se han tenido que replicar los mismos procedimientos para cada una de ellas y esto ha consumido gran parte del tiempo disponible.

Es muy complicado prever el tiempo que es necesario dedicar a cada uno de los procedimientos de los que se compone este trabajo, más aún sin estar previamente familiarizado con ellos. Es por ello, por lo que ha sido necesaria la variación continua de la planificación temporal inicialmente establecida. A pesar de esto, la gran mayoría de los objetivos inicialmente establecidos han sido cubiertos y las desviaciones han sido en su gran mayoría de nivel temporal.

Este trabajo es solo el inicio de lo que sería un estudio bioinformático real orientado al área farmacéutica. Como perspectivas de futuro sería necesario, en primer lugar obtener resultados de otras librerías de moléculas, como por ejemplo “approved drugs” de la base de datos DrugBank. A pesar de que los

resultados obtenidos se han constatado posteriormente mediante estudios de docking, sería interesante replicar los resultados de screening en cada servidor. También sería necesario constatar los resultados de toxicidad obtenidos por el test CAESAR QSAR mediante procesos y pruebas alternativas.

6. GLOSARIO

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

DM II: Diabetes mellitus tipo II

QSAR: Quantitative structure-activity relationship

PDB: Protein data bank

PPI: Protein protein interactions

iPPI: inhibition of protein protein interactions

843300: 843300_Intermediate

24301892: 24301892_Intermediate

24367874: 24367874_Accepted

22405943: 22405943_Intermediate

24340811: 24340811_Intermediate

26668244: 26668244_Intermediate

57263598: 57263598_Accepted

124948531: 124948531_Intermediate

7. BIBLIOGRAFÍA

Abhinav K, Stanton B, Johnston C, Hardstaff J, Orrell RW, Howard R, Clarke J, Sakel M, Ampong MA, Shaw CE, Leigh PN, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis in South-East England: a population-based study. The South-East England register for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* 29, 44-8 (2007).

Andersen, P. M. & Al-Chalabi, A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat. Rev. Neurol.* 7, 603–615 (2011).

Byrne MM, Sturis J, Fajans SS, Ortiz FJ, Stoltz A, Stoffel M, Smith MJ, Bell GI, Halter JB, Polonsky KS: Altered insulin secretory responses to glucose in subjects with a mutation in the MODY1 gene on chromosome 20. *Diabetes* 44, 699 –704 (1995).

Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus: present and future perspectives. *Nature reviews endocrinology.* *Nat Rev Endocrinol* 8, 228-36 (2011).

Cox LE, Ferraiuolo L, Goodall EF, Heath PR, Higginbottom A, Mortiboys H, Hollinger HC, Hartley JA, Brockington A, Burness CE, Morrison KE, Wharton SB, Grierson AJ, Ince PG, Kirby J, Shaw PJ. Mutations in CHMP2B in lower motor neuron predominant amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One.* 2010 Mar 24;5(3):e9872. doi: 10.137.

Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, Howard N, Srinivasan S, Silva JMCL, Molnes J, Edghill EL, Frayling TM, Temple IK, Mackay D, Shield JPH, Sumnik Z, van Rhijn A, Wales JKH, Clark P, Gorman S, Aisenberg J, Ellard S, Njolstad PR, Ashcroft FM, Hattersley AT. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 350, 1838–1849 (2004).

Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve* 23, 336-43 (2000).

Javier A. Menendez, Alejandro Vazquez-Martin, Francisco Jose Ortega, Jose Manuel Fernandez-Real. Fatty Acid Synthase: Association with Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Cancer. *Clin Chem* 55, 425-38 (2008).

Johswich A, Longuet C, Pawling J, Abdel Rahman A, Ryczko M, Drucker DJ, Dennis JW. N-glycan remodeling on glucagon receptor is an effector of nutrient sensing by the hexosamine biosynthesis pathway. *J Bio Chem* 6, 15927-41 (2014).

Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, Kuusisto J, Deeb SS: Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 94, 1141 – 1146 (1994).

Lee YS. Consequences of Childhood Obesity. *Annals Academy of Medicine* 1, 75-81 (2009).

Maitra A, Abbas AK. Endocrine system. In: Kumar V, Fausto N, Abbas AK (eds). *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. Saunders 7, 1156-1226 (2005).

Marka van Blitterswijk, Mariely DeJesus-Hernandez, and Rosa Rademakers. How do *C9ORF72* repeat expansions cause ALS and FTD: can we learn from other non-coding repeat expansion disorders? *Curr Opin Neurol* 25, 689–700 (2012).

Moses H 3rd, Dorsey ER, Matheson DH, Thier SO. Financial anatomy of biomedical research. *JAMA* 294, 1333–42 (2005).

Myers S, Baker A. Drug discovery - an operating model for a new era. *Nat Biotechnol* 19, 727–30 (2001).

Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133 (2006).

Patlak M. New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. *FASEB J* 2002 Dec;16(14):1853.

Peter Kovacs, Robert L. Hanson, Yong-Ho Lee, Xiaolin Yang, Sayuko Kobes, Paska A. Permana, Clifton Bogardus and Leslie J. Baier. The Role of Insulin Receptor Substrate-1 Gene (*IRS1*) in Type 2 Diabetes in Pima Indians. *Diabetes*. 52, 3005-3009, (2003).

Pickup JC: Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 813–823 (2004).

Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K: Transcription factor 7-like 2 regulates β -cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes* 57, 645– 653 (2008).

Si-sheng OU-YANG, Jun-yan LU, Xiang-qian KONG, Zhong-jie LIANG, Cheng LUO, Hualiang JIANG. Computational drug Discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* 33, 1131–1140 (2012).

Song CM, Lim SJ, Tong JC. Recent advances in computer-aided drug design. *Brief Bioinform* 10, 579–91 (2009).

Strong, M., Rosenfeld, J. Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 4, 136–143 (2015).

Tan JJ, Cong XJ, Hu LM, Wang CX, Jia L, Liang XJ. Therapeutic strategies underpinning the development of novel techniques for the treatment of HIV infection. *Drug Discov Today* 15, 186–97 (2010).

Van den Heuvel DM, Harschnitz O, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Taking a risk: a therapeutic focus on ataxin-2 in amyotrophic lateral sclerosis? *Trends Mol Med.* 20, 25-35 (2014).

Van Es MA, van Vught PW, Blauw HM, Franke L, Saris CG, Van den Bosch L, de Jong SW, de Jong V, Baas F, van't Slot R, Lemmens R, Schelhaas HJ, Birve A, Slegers K, Van Broeckhoven C, Schymick JC, Traynor BJ, Wokke JH, Wijmenga C, Robberecht W, Andersen PM, Veldink JH, Ophoff RA, van den Berg LH. Genetic variation in *DPP6* is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 40, 29-31 (2008).

Wang Y, Suzek T, Zhang J, Wang J, He S, Cheng T, Shoemaker BA, Gindulyte A, Bryant SH.

PubChem BioAssay: 2014 update.

Nucleic Acids Res. 2014, 42(Database issue):D1075-82

Yuji Takahashi, Yoko Fukuda, Jun Yoshimura, Atsushi Toyoda, Kari Kurppa, Hiroyoko Moritoyo, Veronique V. Belzil, Patrick A. Dion, Koichiro Higasa, Koichiro Doi, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitsui, Hidetoshi Date, Budrul Ahsan, Takashi Matsukawa, Yaeko Ichikawa, Takashi Moritoyo, Mayumi Ikoma, Tsukasa Hashimoto, Fumiharu Kimura, Shigeo Murayama, Osamu Onodera, Masatoyo Nishizawa, Mari Yoshida, Naoki Atsuta, Gen Sobue, JaCALs, Jennifer A. Fifita, Kelly L. Williams, Ian P. Blair, Garth A. Nicholson, Paloma Gonzalez-Perez, Robert H. Brown, Jr., Masahiro Nomoto, Klaus Elenius, Guy A. Rouleau, Asao Fujiyama, Shinichi Morishita, Jun Goto, and Shoji Tsuji. *ERBB4* Mutations that Disrupt the Neuregulin-ErbB4 Pathway Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 19. *Am J Hum Genet.* 93, 900–905 (2013).

7. ANEXOS

ANEXO 1. SCRIPT DE PYTHON UTILIZADO PARA CALCULAR EL TAMAÑO Y CENTRO DE UNIÓN DE LA MOLÉCULA A SU DIANA

```
import numpy as np
import glob

def get_ligand_coords_bbox(a,b,c):
    """
    Returns the binding site of the ligand
    """
    xs = a
    ys = b
    zs = c

models=glob.glob('/home/Alberto/Downloads/1gs5_Nlg_binding_pocket.pdb,')

for model in models:
    a=[]
    b=[]
    c=[]
    read=open(model, 'r')
    for line in read:
        print line
        line = line.split()
        a.append(float(line[6]))
        b.append(float(line[7]))
        c.append(float(line[8]))
    bs = [(min(a)+max(a))/2, (min(b)+max(b))/2, (min(c)+max(c))/2]
    cavity_size = [abs(min(a)-max(a)), abs(min(b)-max(b)), abs(min(c)-max(c))]
    print "Size of the search space", cavity_size

    print "Grid center" , bs
```