

# Estudi del mecanisme molecular de la interacció fàrmac–receptor en proteïnes p38 MAPK

Estudiant: Aleix Monsonís Albanell

Grau en: Química

Correu electrònic: aleixmon@gmail.com

Tutor: Ferran Feixas Gerones

Empresa / institució:

Vistiplau tutor:

Nom del tutor:

Empresa / institució:

Correu(s) electrònic(s):

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

## Resum

En aquest treball s'estudien les proteïnes quinases p38. Aquestes estan involucrades en malalties humanes com el càncer, la artritis reumatoide, la psoriasis... Dins les proteïnes p38, n' existeixen quatre tipus, on la proteïna p38 $\alpha$  és la més estudiada i serà la base d'aquest estudi. Aquestes proteïnes presenten un alt interès farmacològic i el disseny de nous inhibidors és necessari. La seva estructura consta de dos grans dominis que estan units per la regió d'unió de la molècula d'ATP que forma el centre actiu de la proteïna. Aquest centre actiu presenta canvis conformacionals segons el tipus d'inhibidor amb el que interacciona. Existeixen tres tipus principals d'inhibidors de proteïnes quinases: Tipus I, Tipus II, Tipus I/II.

L'objectiu del treball és establir un protocol computacional per estudiar la interacció entre inhibidors de diferents tipus i la proteïna p38 $\alpha$  i poder dissenyar nous inhibidors més potents i selectius per aquesta proteïna. En primer lloc es valida quin és el software de docking molecular que millor s'ajusta a descriure les interaccions entre les diferents proteïnes i inhibidors. Per tal de respondre a aquesta pregunta es compara el software *SwissDock* amb l'*AutoDock*. S'estudien les interaccions que estableixen aquests inhibidors amb els aminoàcids del centre actiu per tal d'entendre el mecanisme molecular d'inhibició. En base a aquestes interaccions s'utilitzen eines computacionals per determinar-ne el farmacòfor i poder d'aquesta manera dissenyar un inhibidor més potent per aquesta proteïna. S'intenta dissenyar un inhibidor més potent tan per Tipus I, Tipus II, com per Tipus I/II. En base als inhibidors millorats s'estudia la interacció i selectivitat entre inhibidors de la proteïna p38 $\alpha$  i les altres tres tipus de proteïna p38 ( $\gamma$ ,  $\beta$  i  $\Delta$ ). Per finalitzar, es comparen els resultats computacionals amb resultats basats en l'IC<sub>50</sub> d'inhibidors Tipus I/II de la proteïna p38 $\alpha$ , es busca si hi ha relació entre el model d'estudi i els resultats experimentals on servirà per veure les limitacions del model. S'espera que el protocol computacional proposat sigui suficientment robust com per identificar nous inhibidors de la proteïna p38 $\alpha$ .

## Abstract

In this work p38 protein kinases are studied. These proteins are involved in human diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, or psoriasis. Among the group of p38 proteins, one can find 4 different proteins, where p38 $\alpha$  is the most studied one and will be the reference of this work. This protein is relevant from the pharmacological point of view and the design of novel inhibitors is required. The structure consists of two large domains that are connected by the ATP binding region that forms the active site of the protein. The active site presents conformational changes depending on the inhibitor that is interaction. There are three main types of inhibitors of protein kinases: Type I, Type II, and Type I/II.

The objective of this work is to establish a computational protocol to study the interaction between inhibitors of different types and p38 $\alpha$  protein in order to be able to design new, more potent and selective inhibitors for this protein. In the first place, an assessment of which molecular docking software properly describes the interactions between the different proteins and inhibitors is performed. In order to answer this question, the *SwissDock* software will be compared to *AutoDock*. The interactions established by these inhibitors with the amino acids in the active center are studied in detail to determine the molecular basis of the inhibition process. Based on these interactions, computational tools are used to determine the pharmacophore of

the drug and to use this information to design a more potent inhibitor for this protein. We have tried to design a more potent inhibitor for Type I, Type II, as for Type I / II. Based on the improved inhibitors, the interaction and selectivity between p38 $\alpha$  protein inhibitors and the other three types of p38 protein ( $\gamma$ ,  $\beta$  and  $\Delta$ ) are studied. Finally, computational results are compared with results based on the IC<sub>50</sub> inhibitor Type I / II of the p38 $\alpha$  protein, if there is a relationship between the study model and the experimental results, it will be used to see the limitations of the model. It is expected that the proposed computational protocol is sufficiently robust to identify new p38 $\alpha$  protein inhibitors.

### **Abstracto**

En este trabajo se estudian las proteínas p38. Estas están involucradas en enfermedades humanas como el cáncer, la artritis reumatoide, la psoriasis... Dentro de las proteínas p38, existen cuatro tipos, donde la proteína p38 $\alpha$  es la más estudiada y será la base de este estudio. Estas proteínas presentan un alto interés farmacológico y el diseño de nuevos inhibidores es necesario. Su estructura consta de dos grandes dominios que están unidos por la región de unión de la molécula ATP que forma el sitio activo de la proteína. Este sitio activo presenta cambios conformacionales según el tipo de inhibidor con el que interacciona. Existen tres tipos principales de inhibidores de proteínas quinasas: Tipos I, Tipos II, Tipos I/II.

El objetivo de este trabajo es establecer un protocolo computacional para estudiar la interacción entre inhibidores de diferentes tipos i la proteína p38 $\alpha$  y poder diseñar nuevos inhibidores más potentes y selectivos para esta proteína. En primer lugar, se valida cual es el software de docking molecular que mejor se ajuste a describir las interacciones entre las distintas proteínas e inhibidores. Para responder a esta pregunta se compara el software *SwissDock* con el *AutoDock*. Se estudian las interacciones que establecen estos inhibidores con los aminoácidos del sitio activo para entender el mecanismo molecular de inhibición. En base a estas interacciones se utilizan herramientas computacionales para determinar el farmacóforo y poder de esta manera diseñar un inhibidor más potente para esta proteína. Se intenta diseñar un inhibidor más potente para los Tipo I, Tipo II y Tipo I/II. En base a los inhibidores mejorados se estudia la interacción y selectividad entre inhibidores de la proteína p38 $\alpha$  y los otros tres tipos de proteína p38 ( $\gamma$ ,  $\beta$  y  $\Delta$ ). Para finalizar, se comparan los resultados computacionales con los resultados basados en el IC<sub>50</sub> de inhibidores Tipo I/II de la proteína p38 $\alpha$ , se busca si hay relación entre el modelo de estudio y los resultados experimentales donde servirá para ver las limitaciones del modelo. Se espera que el protocolo computacional propuesto sea suficientemente robusto como para identificar nuevos inhibidores de la proteína p38 $\alpha$ .

## Índex

1.	Introducció.....	5-9
1.1.	Proteïnes quinases .....	5
1.1.1.	p38 quinases.....	5
1.1.2.	Estructura de la proteïna p38 $\alpha$ .....	6
1.2.	Classificació dels inhibidors de les proteïnes quinases .....	6
1.2.1.	Tipus I .....	7
1.2.2.	Tipus I/II:.....	7
1.2.3.	Tipus II: .....	7
1.3.	Interaccions Inhibidor-Centre actiu en la proteïna p38 $\alpha$ .....	8
2.	Objectius.....	9
3.	Metodologia.....	9-11
3.1.	Docking Molecular: .....	9
3.2.	Model homologia: .....	10
3.3.	<i>SwissDock</i> .....	10
3.4.	<i>Chimera (Autodock)</i> .....	10
3.5.	Ètica i Sostenibilitat .....	10
4.	Resultats i discussió.....	11-34
4.1.	Validació de diferents softwares de docking molecular .....	11
4.2.	Estudi de la conformació de la p38 $\alpha$ de tipus II .....	14
4.3.	Interaccions entre l'inhibidor i la proteïna.....	17
4.4.	Identificador del Farmacòfor dels inhibidors .....	18
4.5.	Fragmentació dels inhibidors. ....	20
4.6.	Desenvolupament de nous inhibidors. ....	22
4.6.1.	Inhibidor B96. ....	22
4.6.2.	Inhibidor 78L. ....	27
4.7.	Comparativa amb els valors d'IC <sub>50</sub> : experiments vs prediccions computacionals. ....	30
4.8.	Interacció dels Inhibidors amb altres proteïnes p38 ( $\delta$ , $\gamma$ i $\beta$ ).....	35
5.	Conclusions.....	37
6.	Bibliografia.....	38

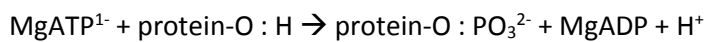
## 1. Introducció

### 1.1. Proteïnes quinases

Les quinases són enzims que tenen un rol clau en la regulació de les cèl·lules. Aquests enzims participen en el senyal de transducció que regula l'apoptosi, cicle de la progressió cel·lular, reorganització del citoesquelet, diferenciació, desenvolupament, la resposta immunitària, funció del sistema nerviós i la transcripció. Per tant, aquests enzims són focus d'atenció a nivell biològic i farmacològic<sup>1</sup>.

Les quinases són proteïnes diana d'una gran quantitat de fàrmacs, ja que la seva desregulació ocasiona a una varietat de malalties com cardiovasculars, inflamatòries, el càncer, la diabetis, i desordres nerviosos. Alguns fàrmacs dels fàrmacs aprovats que interaccionen amb proteïnes quinasa són el *Gleevec* (imatinib) o el *Sprycel* (dasatinib) utilitzats pel tractament de la leucèmia mieloide crònica entre molts altres<sup>1</sup>.

Les quinases catalitzen reaccions de fosforilació. En aquest procés, un grup fosfat és transferit des d'una molècula d'ATP unit a la proteïna quinasa a un dels aminoàcids de la proteïna receptora. Fosforilar una proteïna, implica en la majoria dels casos, un canvi funcional a la proteïna fosforilada que pot estar relacionat amb certes malalties. La reacció general que catalitzen les proteïnes quinases és la següent<sup>1</sup>:



En base a la naturalesa de la fosforització del grup OH, aquests enzims estan classificats com a quinases *protein-serine/threonine* i quinases *protein-tyrosine*. En total existeixen 518 quinases essent una de les famílies d'enzims més importants per la regulació de l'organisme<sup>1</sup>.

#### 1.1.1. p38 quinases

Dins el grup de les proteïnes quinases, trobem les anomenades p38. Aquestes proteïnes regulen l'expressió de citocines. S'activen dins la cèl·lules per citocines inflamatòries i tenen un rol important en l'activació de la resposta immunològica. Estan involucrades en malalties humanes com l'asma i malalties autoimmunitàries<sup>2</sup>.

Actualment es coneixen quatre quinases de tipus p38:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ . La p38 $\alpha$  és la proteïna més ben caracteritzada del grup i està present en molts tipus de cèl·lula. Té un paper clau en la regulació de la biosíntesi de citocines proinflamatòries, la necrosis tumoral i la transcripció activadora oncogènica, que es desenvolupen en malalties com, el càncer, l'artritis reumatoide (*Tofacitinib*), la psoriasis, la leucèmia mieloide crònica (*Imatinib*), la mielofibrosi (*Ruxolitinib*)... així doncs, la p38 $\alpha$  és una important proteïna diana en el camp de la química medicinal. Els inhibidors coneguts de la p38 $\alpha$  són molècules petites que es basen en la inhibició de la fosforilació per part d'aquesta proteïna. Actualment, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprovat 32 fàrmacs per la proteïna p38 $\alpha$ . Tot i això, existeixen una gran quantitat d'inhibidors que no han sortit al mercat degut a la seva toxicitat o la pèrdua de la seva eficiència *in vivo*<sup>2</sup>.

### 1.1.2. Estructura de la proteïna p38 $\alpha$

La proteïna p38 $\alpha$  està composta per dos lòbuls, el lòbul petit N-terminal on hi ha cinc làmines  $\beta$  antiparal·leles, i el lòbul gran C-terminal compost per hèlix  $\alpha$  que conté un glutamat. Aquests lòbuls estan enllaçats per la zona flexible (*hinge*) que conforma el lloc de la proteïna a on s'uneix la molècula d'ATP (*ATP-binding site*) juntament amb elements estructurals dels dos lòbuls<sup>1</sup> (Figura 1a). Les proteïnes quinases es caracteritzen per la presència al centre actiu del motiu DFG format per tres aminoàcids consecutius: aspartat (D), fenilalanina (F) i glicina (G) (veure Figura 1).

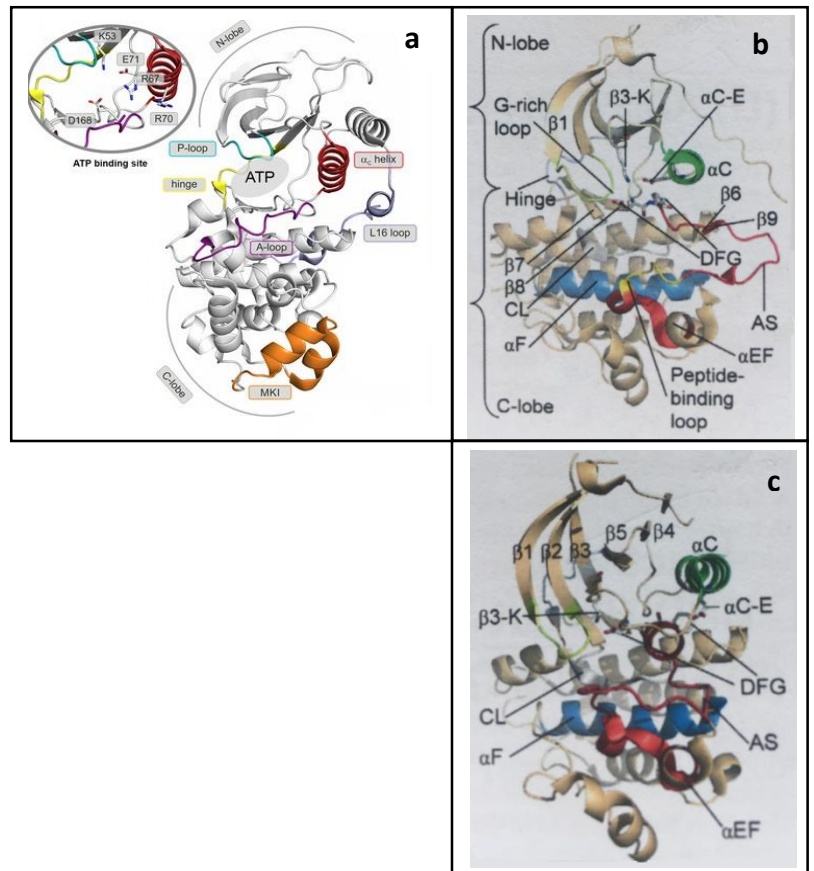
El motiu DFG pot adoptar dues conformacions, *in* i *out*. La presència d'un pont salí entre la làmina  $\beta 3$  del lòbul N-terminal i el glutamat que es troba a  $\alpha C$  del lòbul C-terminal, és un requisit per la formació activa del centre actiu amb conformació *DFG-Asp in* (Figura 1b). Pel contrari, la conformació *DFG-ASP out* és quan no hi ha interacció entre  $\beta 3$  i  $\alpha C$  formant la forma inactiva del DFG<sup>1</sup> (Figura 1c).

El lòbul principal (*C-lobe* Figura 1) està format principalment de  $\alpha$  hèlixs, amb sis segments ( $\alpha D$ - $\alpha I$ ) i quatre làmines  $\beta$  petites ( $\beta 6$ - $\beta 9$ ), que conté la majoria dels residus catalítics associats a la transferència de grups fosforils cap als substrats de l'ATP. La hèlix  $\alpha E$  està seguida de la làmina  $\beta 6$ , el *loop* catalític és el que connecta les làmines  $\beta 7$  i  $\beta 8$ , i la làmina  $\beta 9$  conté el segment activador. Aquest segment en la forma activa del centre actiu obre l'estructura estenent-se lluny del *loop* catalític permetent la interacció entre la proteïna i l'inhibidor<sup>1</sup> (Figura 1b).

En el centre actiu de la proteïna es troba l'aminoàcid metionina 109 que té un paper important a l'hora de determinar la interacció entre l'inhibidor i la proteïna, establint un enllaç d'hidrogen entre les dues molècules. Es creu que aquesta interacció és determinant per a l'estabilitat del complex proteïna-inhibidor.

### 1.2. Classificació dels inhibidors de les proteïnes quinases

Fins el moment, s'han dissenyat molts inhibidors de proteïnes quinasa. Dar i Shokat van definir tres classes d'inhibidors en funció de la zona d'interacció, anomenant-los Tipus I, II i III<sup>1</sup>.



**Figura 1.** Estructura de la proteïna p38 $\alpha$ . (a) Estructura del *ATP-binding site* i dels lòbuls. (b) Conformació activa del centre actiu amb conformació *DFG-Asp in*. (c) Conformació inactiva del centre actiu amb conformació *DFG-Asp out*.

Els van definir els inhibidors Tipus I com a “molècules que s’uneixen a la conformació activa (DFG-in) de la quinasa a la regió de “l’ATP pocket” (lloc d’unió de l’ATP). Els inhibidors Tipus II com a “molècules que s’uneixen a la conformació inactiva (normalment DFG-OUT) de les quinases”. Finalment, els inhibidors Tipus III com a “inhibidors no-ATP competitiu” o inhibidors al·lostèrics. Els lligands al·lostèrics s’uneixen a una regió diferent de la zona activa, i en el cas de les quinases, es refereixen a compostos que s’uneixen fora de la zona *ATP-binding pocket*<sup>1</sup>.

Tot i això, existeixen més classes d’inhibidors. Zuccotto va introduir els inhibidors Tipus I/II, com a compostos que “estableixen enllaços d’hidrogen a la regió *hinge* com en el cas dels inhibidors de Tipus I però que s’estenen cap a la cavitat hidrofòbica característica dels inhibidors Tipus II”<sup>1</sup>.

### 1.2.1. Tipus I

Molècules que s’enllacen a la conformació activa de la proteïna (*DFG-Asp in*) en el *ATP pocket*. Normalment aquests inhibidors a la seva estructura contenen heterocicles que es posicionen en el *binding pocket*. Forma entre un i tres enllaços d’hidrogen a la regió del *hinge* de la proteïna quinasa que serveix per connectar els lòbuls N-terminal i C-terminal (exemple d’inhibidor Figura 2a)<sup>3</sup>. Aquests inhibidors bàsicament impedeixen que la molècula d’ATP es pugui unir.

### 1.2.2. Tipus I/II:

Els inhibidors de Tipus I/II, s’enllacen reversiblement dins l’*ATP-binding pocket* de la conformació activa de la proteïna pel *DFG-Asp in*<sup>1</sup>.

Ocupen la regió corresponent als inhibidors de Tipus I ocupant part de la cavitat hidrofòbica situada entre els dos lòbuls, similar al Tipus II (Figura 2b)<sup>1</sup>.

### 1.2.3. Tipus II:

Els inhibidors de Tipus II, s’enllacen a la conformació inactiva de la proteïna (*DFG-Asp out*). Interaccionen directament amb la regió DFG. Ocupen la cavitat hidrofòbica de la proteïna, estabilitzant la conformació inactiva (Figura 2c)<sup>1</sup>. Al estabilitzar la conformació inactiva el procés de fosforilació no es pot portar a terme.

Els inhibidors de Tipus II haurien de ser més selectius i potents que els inhibidors de Tipus I o I/II que s’uneixen en una conformació estàndard activa. Tot i això, estudis han demostrat que els inhibidors de Tipus I i Tipus II presenten una similar selectivitat. De manera que els avantatges

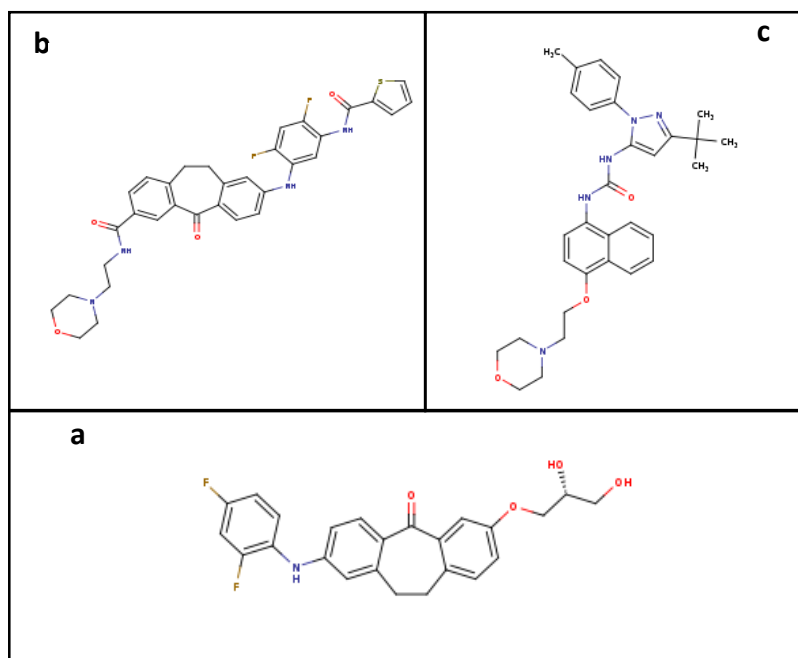


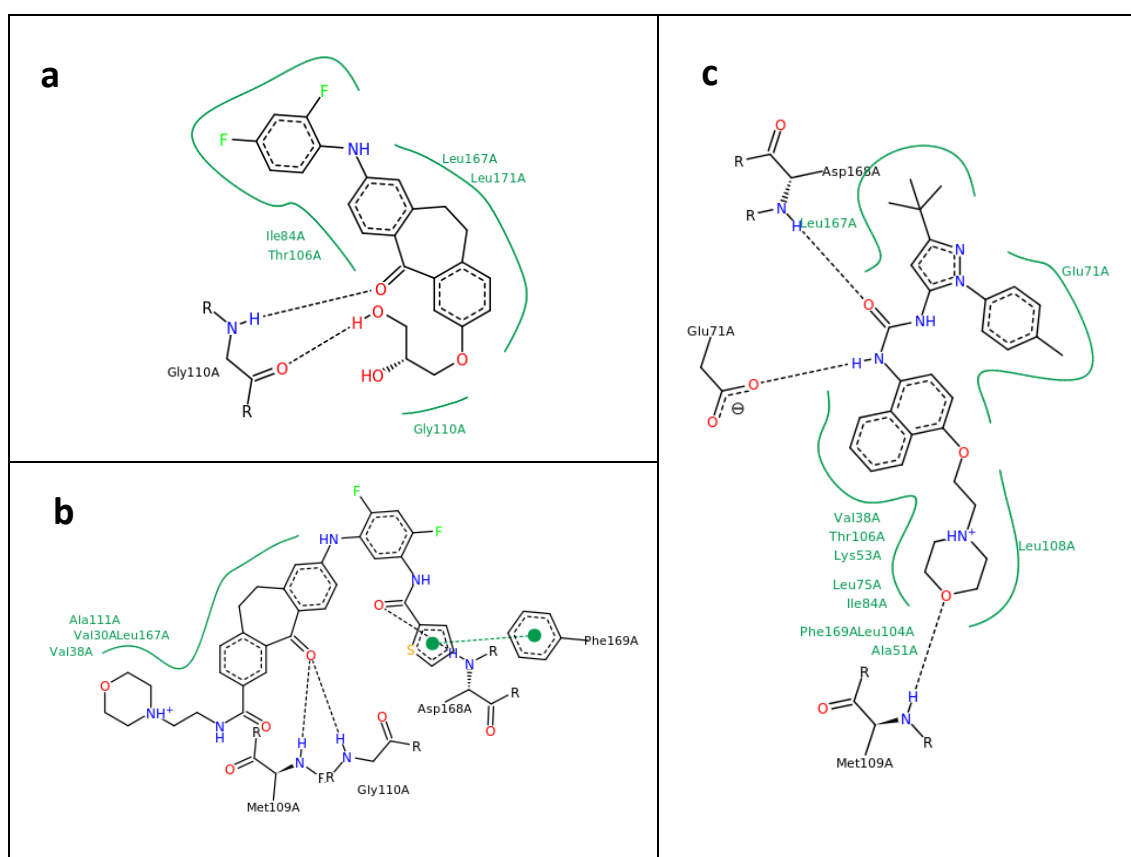
Figura 2. Inhibidors de diferents tipus de la proteïna p38α (a) Representació de l’inhibidor 3FF de tipus I. (b) Representació de l’inhibidor 78L de tipus I/II. (c) Representació de l’inhibidor B96 de tipus II

percebuts d'estabilitzar conformacions inactives, no s'han observat i suggereix que els inhibidors de Tipus II no mostren l'avantatge intrínsec de la selectivitat sobre els inhibidors de Tipus I<sup>1</sup>.

Actualment es coneixen inhibidors del Tipus I, II, i I/II per a la proteïna p38 $\alpha$ .

### 1.3. Interaccions Inhibidor-Centre actiu en la proteïna p38 $\alpha$

El centre actiu de la proteïna p38 $\alpha$  és el lloc on la molècula d'ATP s'uneix. Els inhibidors de diferents tipus s'uneixen a diferents regions d'aquesta cavitat. Tot seguit es passarà a discutir quins són els aminoàcids més importants per determinar la interacció entre la p38 $\alpha$  i els diferents tipus d'inhibidor. És important determinar quins són els aminoàcids que estableixen interaccions amb l'inhibidor per tan de poder-ne entendre la seva activitat.



**Figura 3.** Centres actius de la proteïna p38 $\alpha$ . (a) Centre actiu amb alguns dels aminoàcids de la proteïna p38 $\alpha$  (PDB 3QUE cristal·litzat amb un inhibidor de Tipus I). (b) Centre actiu amb alguns dels aminoàcids de la proteïna p38 $\alpha$  (PDB 5TBE cristal·litzat amb un inhibidor de Tipus I/II). (c) Centre actiu amb alguns dels aminoàcids de la proteïna p38 $\alpha$  (PDB 1KV2 cristal·litzat amb un inhibidor de Tipus II)

A la Figura 3a es pot veure al centre actiu de la proteïna p38 $\alpha$  interaccionant amb un inhibidor de Tipus I. Com es pot veure la interacció està dominada per aminoàcids amb cadena hidrofòbica. L'aminoàcid glicina 110 és important per la interacció de tipus enllaç d'hidrogen que fa amb l'inhibidor. La metionina 109 també estableix enllaç d'hidrogen tot i no està representada a la Figura 3a.



La zona d'interacció de la proteïna p38 $\alpha$  cristal·litzada amb un inhibidor de Tipus I/II consta bàsicament d'aminoàcids polars. Com es pot veure a la Figura 3b, la metionina 109 i la glicina 110 interaccionen amb l'inhibidor a través d'enllaços d'hidrogen. A diferència dels inhibidors de Tipus I, la fenilalanina 168 estableix una interacció de tipus  $\pi$  stacking amb l'inhibidor de Tipus I/II.

Pel que fa a la p38 $\alpha$  cristal·litzada amb un inhibidor de Tipus II, les interaccions s'estableixen tan amb aminoàcids polars com hidrofòbics, com es pot veure a la Figura 3c. En aquest cas, hi ha tres interaccions de tipus enllaç d'hidrogen entre l'inhibidor i els aminoàcids metionina 109, glutamat 71 i aspartat 168. L'aminoàcid Glu71 es troba al fons de la cavitat formada entre els dos lòbuls de la p38 $\alpha$  i juga un paper fonamental al reconeixement d'inhibidors de Tipus II.

## 2. Objectius

The main aim of this project is to design a computational protocol to understand the molecular basis of p38 $\alpha$  inhibition and to establish the basis for the design of inhibitors for p38 $\alpha$ . To accomplish with this goal simple computational tools accessible to the whole scientific community will be used. Molecular docking will be used to predict the binding pose and binding affinity of a set of inhibitors.

To achieve the main goal the achievement of the different subobjectives will be required:

1. Assessment of molecular docking software to predict binding pose and binding affinity of known inhibitors of p38 $\alpha$ . Special emphasis will be put on Type II inhibitors.
2. To study protein-inhibitor interactions for Type I, Type II, and Type I/II inhibitors.
3. Pharmacophore identification of best inhibitors
4. Design of new inhibitors based on the previous knowledge
5. Discuss inhibitor selectivity with other p38 proteins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ )
6. Analyze the limitations of the proposed protocol: experimental IC<sub>50</sub> vs docking binding affinities.

## 3. Metodologia

En el següent apartat es detallen breument les eines computacionals utilitzades en aquest treball.

### 3.1. Docking Molecular:

És un mètode que prediu l'orientació i la conformació més òptima que adopta una molècula en interaccionar amb una altre. El docking es fa servir freqüentment per predir com una molècula petita, també anomenada lligand, (normalment un fàrmac o un substrat d'un enzim) s'uneix de forma no covalent a una proteïna. El docking molecular també permet estimar l'afinitat que presenta aquest lligand per una proteïna determinada. D'aquesta manera es pot estimar l'activitat que podria presentar una determinada molècula com a fàrmac. Per aquest motiu, el docking té un paper molt important en la indústria farmacèutica com a eina per a desenvolupar un disseny racional de molècules actives.

La tècnica consta de dues parts. Primer el càlcul de conformacions tridimensionals que la molècula petita pot adoptar en la seva interacció amb el receptor (proteïna); segon, l'execució de la funció de puntuació (*scoring function*) que determina l'afinitat entre la molècula i el receptor de la conformació proposada per l'algorisme de cerca conformacional.

### 3.2. Model homologia:

S'utilitza per predir estructures 3D de proteïnes que no presenten estructura cristal·logràfica o per reconstruir parts de la proteïna que no s'han pogut cristal·litzar, normalment són parts mòbils, com *loops*. Aquesta eina es basa en comparar estructures similars de diferents proteïnes amb la proteïna d'interès per acabar de construir-la.

En aquest estudi, el *loop* catalític de la proteïna p38 $\alpha$  no està cristal·litzat en els diferents PDBs que existeixen d'aquesta proteïna. Per tant, s'utilitza el servidor gratuït *Swiss-Model* com a eina per a la modelització d'estructures 3D d'una proteïna a partir de la seva seqüència d'aminoàcids mitjançant les tècniques de modelatge d'homologia, ja que el servidor ofereix una interfície web fàcil d'usar, que permet generar models 3D de la proteïna d'interès des d'un simple navegador web. *Swiss-Model* ha estat establert fa 20 anys com el primer servidor totalment automatitzat per a la modelització d'estructures d'homologia de proteïnes. Actualment és una de les màquines més utilitzades<sup>4</sup>.

Per realitzar el docking molecular s'utilitzen dos programes diferents:

### 3.3. *SwissDock*

El *SwissDock* és un servidor web dedicat al docking molecular de petites molècules (inhibidors) a proteïnes. Està basat en el mètode *EADock DSS* combinat amb scripts per preparar la proteïna i l'inhibidor. El lloc web conté una base de dades de lligands basada en *Ligand Protein Database*. Els resultats proporcionats pel *SwissDock* donen una energia d'interacció entre la proteïna i l'inhibidor expressats en termes de l'energia de Gibbs (en kcal/mol), com més negatiu sigui el valor, millor interacció entre lligand i receptor hi haurà<sup>5</sup>.

### 3.4. *Chimera (Autodock)*

El *Chimera* és un software lliure de disseny i visualització molecular. Es segmenta en un nucli que proporciona serveis bàsics, visualització i extensions que proporcionen una bona funcionalitat<sup>6</sup>. El *ViewDock* és una extensió per a la visualització de dockings entre proteïnes i inhibidors. L'*AutoDock Vina* es troba integrat al *Chimera* i permet predir com molècules petites (inhibidors) s'uneixen a un receptor (proteïna)<sup>7</sup>. L'*Autodock* també expressa els valors en termes de l'energia de Gibbs. Tot i això, l'*scoring function* és lleugerament diferent a la utilitzada pel *SwissDock*<sup>7</sup>.

### 3.5. Ètica i Sostenibilitat

En aquest treball s'han utilitzat eines pròpies de química computacional. L'activitat dels diferents inhibidors analitzats no ha requerit realitzar assajos bioquímics. D'aquesta manera no s'ha utilitzat reactius ni dissolvents que podrien ser perjudicials pel medi ambient.

## 4. Resultats i discussió

### 4.1. Validació de diferents softwares de docking molecular

Per determinar quin software de docking molecular és més adequat per predir orientació i afinitat d'inhibidors de la p38 $\alpha$ , es realitza una validació per veure quin proporciona millors resultats. Tal i com s'ha detallat a la metodologia, s'escullen els softwares *AutoDock* i *SwissDock*, i segons els resultats obtinguts es fa l'estudi per veure quin dels dos softwares prediu millor el model d'interacció entre la proteïna p38 $\alpha$  i l'inhibidor. Els resultats es comparen amb l'orientació observada a les estructures cristal·logràfiques dels diferents inhibidors cristal·litzats a la p38 $\alpha$ .

Per triar PDBs de la p38 $\alpha$  cristal·litzat amb diferents inhibidors, es fa una recerca bibliogràfica. S'ha seleccionat un PDB per a cada tipus d'inhibidor (Tipus I, II, i I/II) on la proteïna adapta la seva conformació a l'inhibidor correspon<sup>8</sup>.

**Taula 1.** Codis PDB i codi de l'inhibidor escollit per fer la validació del software lliure.

Tipus	PDF proteïna	Codi inhibidor
I	3QUE	3FF
I/II	5TBE	78L
II	1KV2	B96

Un cop escollits els inhibidors amb les conformacions de la proteïna corresponents (Taula 1 i Figura 3 per una imatge dels inhibidors), es realitzen els dockings moleculars amb els dos softwares escollits. L'objectiu és estudiar quina és la interacció entre cada conformació (PDB) de la proteïna i els tres tipus d'inhibidors per veure com s'ajusta cada software amb el model d'estudi. En principi, s'espera que la conformació de la proteïna cristal·litzada amb inhibidor de Tipus I doni una energia de Gibbs més negativa que no amb els altres tipus d'inhibidor. I el mateix amb la resta de sistemes analitzats.

Amb al software *Chimera*, s'ha de seleccionar la posició i les dimensions de la caixa on es vol fer el docking. Per fer-ho es força que el docking només es centri sobre la posició de la Met 109, quedant de la següent manera:

**Taula 2.** Posicions i dimensions de la caixa utilitzats en el software *Chimera* per fer la validació.

Proteïna	Dimensions	Posició X	Posició Y	Posició Z
3QUE	20x20x20	4.00719	6.93456	23.8962
5TBE	20x20x20	15.5405	2.79129	-25.9390
1KV2	20x20x20	35.4767	43.2256	19.4916

Un cop es tria la posició i les dimensions de la caixa, es realitzen els dockings, i els resultats obtinguts es mostren a les taules 3 i 4.

**Taula 3.** Resultats dels dockings entre els diferents inhibidors i proteïnes amb al software *SwissDock*.

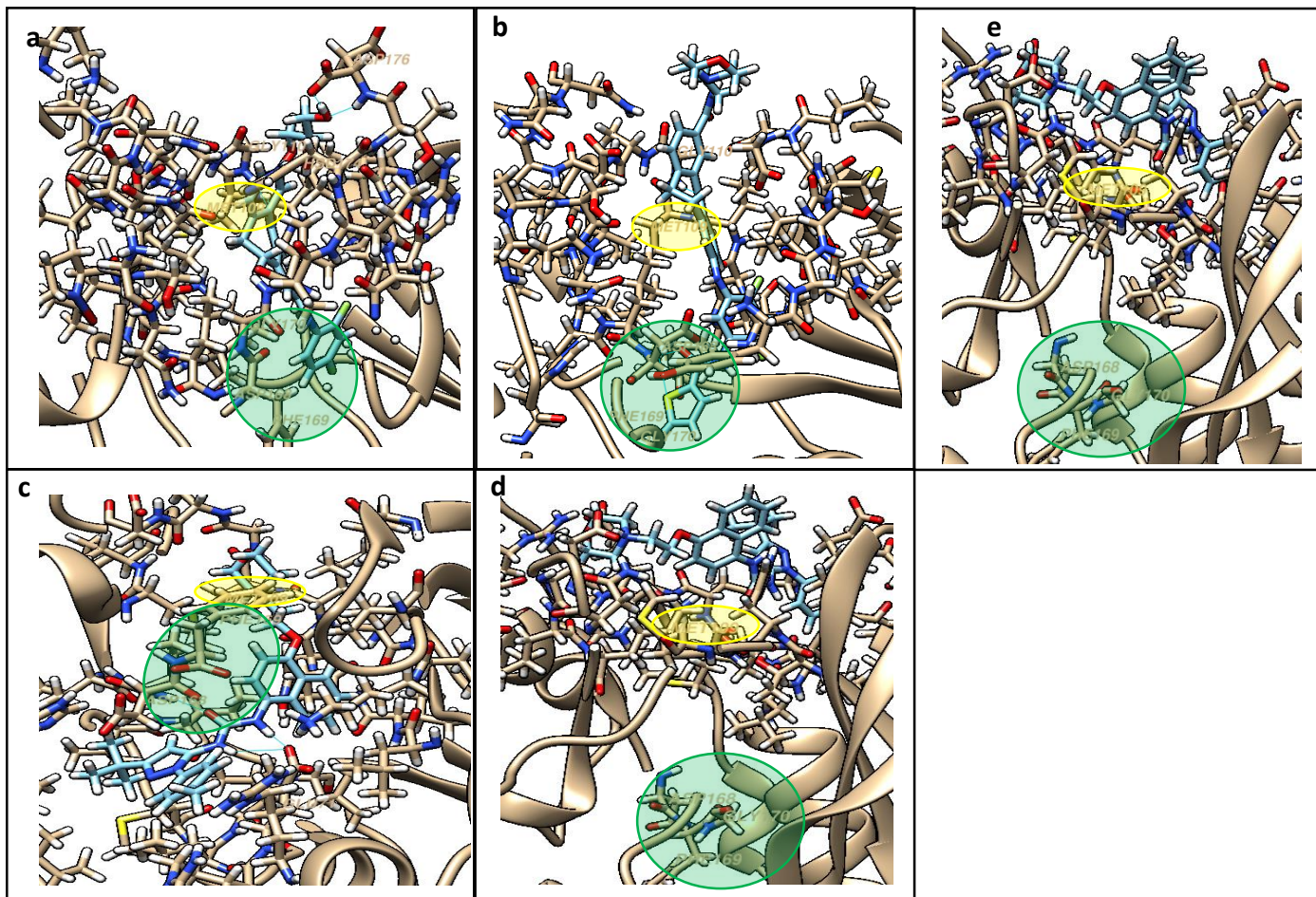
Proteïna	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] Met 109	Posició del Rànquing del Docking on es produceix Interacció amb Met 109
3QUE	3FF	-11.3025	1
	78L	-10.0835	1
	B96	-8.66410	1
5TBE	3FF	-8.36749	6
	78L	-11.7338	1
	B96	-8.91249	14
1KV2	3FF	-8.19306	53
	78L	-8.74000	56
	B96	-11.4930	1

**Taula 4.** Resultats dels dockings entre els diferents inhibidors i proteïnes amb al software *Chimera*.

Proteïna	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol]
3QUE	3FF	-11.5
	78L	-10.9
	B96	-9.80
5TBE	3FF	-10.2
	78L	-10.0
	B96	-9.00
1KV2	3FF	-8.30
	78L	-7.70
	B96	-9.00

Com es pot observar en els resultats, al software *SwissDock* prediu molt bé el model entre les diferents conformacions de la proteïna p38 $\alpha$  i els diferents tipus d'inhibidor. En tots tres casos, la interacció més forta es produeix entre el tipus d'inhibidor i la seva conformació corresponent, a més a més, l'energia en cada cas té un valor aproximat de -11 kcal/mol, per tant la interacció entre la proteïna i l'inhibidor és molt forta, indicant que és un bon inhibidor per la proteïna, com era d'esperar. Pels inhibidors de Tipus I i I/II la primera predicció (la que dóna una energia de Gibbs més negativa en el rànquing de més de 200 orientacions predites pel programa de docking molecular) situa els inhibidors el centre actiu (Figures 4a i 4b respectivament). En el cas de la conformació de la proteïna cristal·litzada amb un inhibidor de Tipus II, a més a més és converteix amb un model selectiu, ja que l'inhibidor B96 es posiciona al centre actiu a la primera predicció (Figura 4c) mentre que els tipus d'inhibidor de Tipus I i I/II no situa l'inhibidor a la zona que li pertoca fins a la predicció número 50. És a dir, el docking molecular no assigna correctament la interacció amb la Met 109 (Taula 3). Per tant, el PDB 1KV2 presenta una conformació de la p38 $\alpha$  molt específica pel disseny d'inhibidors de Tipus II.

En el cas del software *AutoDock*, per la conformació de proteïna associada a l'inhibidor de Tipus I, segueix un bon model, ja que l'energia amb un valor aproximat de -11 kcal/mol és amb l'inhibidor de Tipus I (Taula 4). Però pels altres dos casos, i sobretot per la conformació de Tipus II, aquest model no s'ajusta bé, ja que primerament dona energies de l'ordre de -8.5 kcal/mol, i l'inhibidor no es posiciona en el centre actiu de la proteïna (Figura 4d). En el cas de la conformació de Tipus I/II (PDB 5TBE), la millor interacció és amb l'inhibidor de Tipus I amb una energia de -10.2 kcal/mol (contràriament a lo esperat), mentre que amb l'inhibidor corresponent té un valor de -10 kcal/mol (Taula 4).



**Figura 4.** Docking entre les diferents conformacions de proteïna p38 $\alpha$  i diferents inhibidors. De color groc es senyala l'aminoàcid metionina 109, de color verd el DFG, les línies de color blau indiquen interaccions enllaços d'hidrogen i l'inhibidor és de color blau. (a) Docking entre la proteïna 3QUE i l'inhibidor 3FF amb el *SwissDock*. (b) Docking entre la proteïna 5TBE i l'inhibidor 78L amb el *SwissDock*. (c) Docking entre la proteïna 1KV2 i l'inhibidor B96 amb el *SwissDock*. (d) Docking entre la proteïna 1KV2 i l'inhibidor B96 amb el *Chimera*. (e). Docking entre la proteïna 1KV2 amb model d'homologia i l'inhibidor B96 amb el *SwissDock*

Així doncs, un cop validats als dos softwares, i segons els resultats obtinguts, es treballarà amb el software *SwissDock* durant la resta del treball. Els resultats obtinguts amb aquest software proporcionen resultats més acurats per a la p38 $\alpha$ .

Per finalitzar la validació del *SwissDock*, falta comparar els resultats entre les diferents conformacions de proteïnes cristal·litzades (les quals no contenen el *loop* catalític), i les conformacions de la proteïna en les quals el *loop* catalític s'ha reconstruït amb el model d'homologia. Els valors obtinguts al realitzar docking molecular entre els inhibidors i les conformacions de la proteïna generades amb el model d'homologia no són tant bons com els resultats obtinguts a partir de la proteïna cristal·litzada. En general les energies d'interacció entre les diferents conformacions de proteïna completades amb el model d'homologia i els diferents inhibidors tenen un valor mig aproximat de  $-9$  kcal/mol, significativament més altes que a partir de les proteïnes cristal·litzades. Per les conformacions de Tipus I i I/II, l'inhibidor corresponent es situa al centre actiu en la posició que el docking assigna una energia de Gibbs més negativa, mentre que els altres dos inhibidors no ho fan a la primera assignació del docking, essent això un avantatge, ja que indica que és selectiu per aquestes dues conformacions. Per la conformació de la proteïna de Tipus II, aquest model no s'ajusta bé, ja que l'inhibidor

corresponent es situa el centre actiu com un inhibidor Tipus III amb una energia d'interacció de -9.7 kcal/mol (Figura 4e i Taula 5).

**Taula 5.** Resultats obtinguts amb al software *SwissDock* entre els diferents inhibidor i les proteïnes completades amb el model d'homologia

Proteïna	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] Met 109	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Met 109
3QUE	3FF	-10.9692	1
	78L	-8.70255	10
	B96	-6.91082	152
5TBE	3FF	-8.79931	1
	78L	-11.7515	1
	B96	-8.81053	9
1KV2	3FF	-8.02743	21
	78L	-8.07217	58
	B96	-9.73580	8

Així doncs, tot i obtenir pitjors resultats, aquests són els esperats, ja que en la zona del centre actiu hi ha el *loop* catalític que esta incomplet, i al fer el model d'homologia, aquest es reconstrueix ocupant part de la zona del centre actiu dificultant l'entrada del inhibidor, fent reduir l'energia d'interacció i la selectivitat. Per tal de millorar aquest model d'homologia caldria realitzar simulacions de dinàmica molecular per reposicionar correctament el *loop* catalític.

A partir d'aquest punt, s'utilitzarà el software *SwissDock* per fer els docking i es treballarà amb els PDBs de la proteïna amb el *loop* no reconstruït.

#### 4.2. Estudi de la conformació de la p38 $\alpha$ de tipus II

De tots els resultats obtinguts anteriorment, la conformació que presenta més dificultats és la corresponent a Tipus II, i per tal de entendre-la millor, ja que de les tres conformacions és la menys estudiada, es busca més informació.

En l'article de Zheng Zhao i coautors<sup>3</sup>, es mostra que a part de la metionina 109, també hi ha l'anell aromàtic de l'aminoàcid fenilalanina 169 que juga un paper molt important a la interacció de la proteïna i l'inhibidor de Tipus II.

És per això que es realitza un seguit de dockings moleculars entre la conformació 1KV2 cristal·litzada amb inhibidor de Tipus II de la proteïna p38 $\alpha$ , i la conformació 3K3I cristal·litzada amb un altre inhibidor de Tipus II extreta de l'article de Zheng Zhao i coautors. Per tal de validar si aquestes conformacions funcionen en general per predir correctament l'orientació d'inhibidors de Tipus II, hem seleccionat 4 inhibidors de Tipus II proposats en el mateix article (NIL, BAX, AMG i 88Z). Els estudis de docking molecular s'han realitzat per les dues conformacions de la proteïna (1KV2 i 3K3I), amb els quatre inhibidors i amb l'inhibidor inicial (B96)<sup>3</sup>.

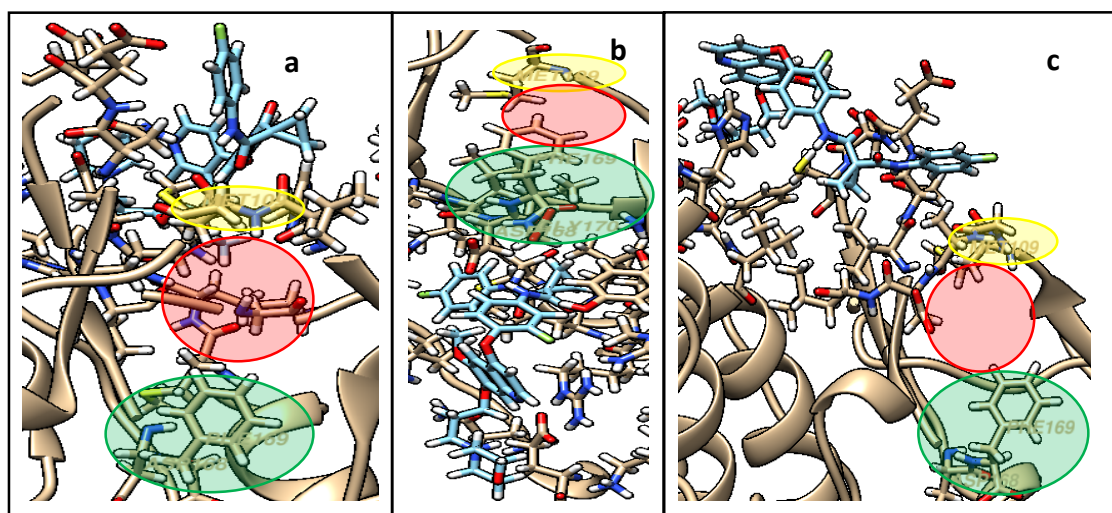
**Taula 6.** Resultats de l'estudi de la conformació de tipus II de la proteïna p38 $\alpha$ .

Proteïna	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] Met 109	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Met 109	$\Delta G$ [kcal/mol] Phe 169	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Phe 169
1KV2	B96	-11.4930	1	-11.4930	1
	NIL	-8.61169	3	-8.61169	3
	BAX	-9.44172	16	-11.37412	1
	AMG	-10.2663	1	-10.2663	1
	88Z	-9.2978	1	-	-
3K3I	B96	-7.58636	44	-8.74346	1
	NIL	-7.90647	14	-7.90647	14
	BAX	-	-	-9.85127	1
	AMG	-9.44819	1	-9.44819	1
	88Z	-	-	-9.10972	17

De les dues estructures de la proteïna estudiades, la conformació amb el PDB 1KV2, és la que millor s'ajusta el model d'estudi, amb una energia d'interacció mitja aproximadament de -10 kcal/mol pels inhibidors de Tipus II. En canvi la conformació amb el PDB 3K3I te una energia d'interacció mitja aproximadament de -9 kcal/mol (Taula 6).

Pel que fa a la selectivitat, l'estudiem a partir del rànquing d'orientacions obtingut. Si el programa de docking molecular assigna una energia de Gibbs més negativa a la posició corresponent al centre actiu, llavors diguem que el docking prediu correctament la selectivitat.

Si la posició corresponent al centre actiu es troba més avall al rànquing d'orientacions, el docking falla al assignar correctament la selectivitat de l'inhibidor. Els inhibidors de Tipus II analitzats en general ocupen posicions corresponents al centre actiu de la proteïna 1KV2 a excepció de l'inhibidor 88Z. En canvi per la

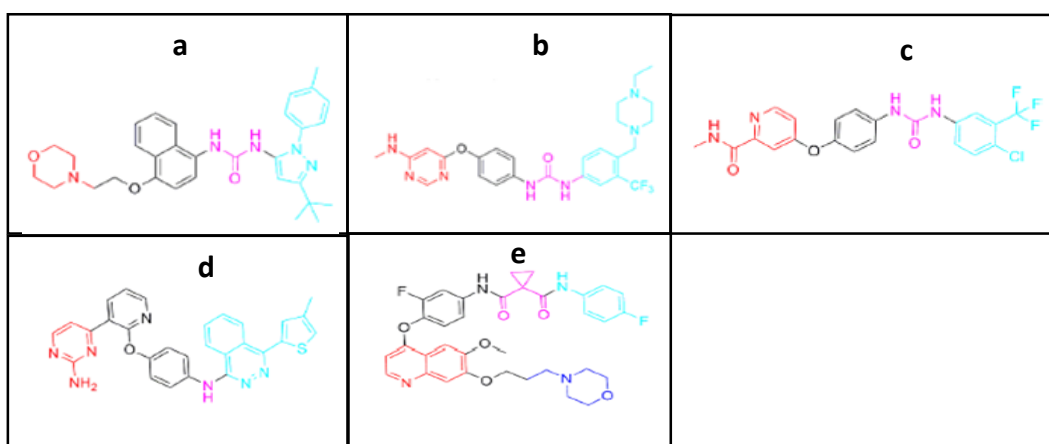


**Figura 5.** Docking entre els diferents inhibidors de tipus II i les diferents conformacions de proteïna p38 $\alpha$ . De color groc es senyala l'aminoàcid metionina 109, de color verd el DFG, de color vermell el centre actiu de la proteïna i l'inhibidor és de color blau. (a) Docking entre la proteïna 1KV2 i l'inhibidor 88Z. (b) Docking entre la proteïna 3K3I i l'inhibidor 88Z. (c) Docking entre la proteïna 1KV2 i l'inhibidor BAX.

proteïna 3K3I o no arriben a posicionar-se al centre actiu o es posicionen en posicions del rànquing més elevades (Taula 6). Per tant es continuarà treballant amb la proteïna 1KV2, ja que és la que assigna una energia de Gibbs més negativa a la regió corresponent al centre actiu.

L'inhibidor B96 és el que millor s'ajusta al model, ja que és el que té l'energia d'interacció més forta, i en la primera posició predita pel docking ja es col·loca al centre actiu (Figura 4c), en canvi la resta d'inhibidors o tenen una valor d'energia d'interacció de -9.5 kcal/mol aproximadament o no es col·loquen al centre actiu a la primera posició, com en el cas dels inhibidors 88Z i BAX (Figures 5a i 5c respectivament i Taula 6).

Les conclusions que es treuen en base aquest resultat referents a l'estructura dels inhibidors de Tipus II, són que inhibidors molt voluminosos com el 88Z no es posicionen correctament l'*ATP-binding pocket* i no es col·loquen en el centre actiu de la proteïna (Figures 5a i 5b). Per tant, la conformació de la proteïna 1KV2 i 3K3I no són adequades per aquest tipus d'inhibidors. Pel mateix motiu, els dockings amb inhibidors molt voluminosos a al zona I de la proteïna com el cas de l'inhibidor BAX tampoc funcionen correctament (Figura 5c i Figura 6). Fins al moment, hem identificat quina són les conformacions més adequades i el software més adequat per a realitzar estudis de docking molecular amb nous inhibidors per a la proteïna p38 $\alpha$ .



**Figura 6.** Els diferents inhibidors utilitzats en l'estudi de la conformació II. De color vermell la zona I, de color negre la zona II, de color lila la zona III i de color blau la zona IV. (a) Representació de l'inhibidor B96. (b) Representació de l'inhibidor NIL. (c) Representació de l'inhibidor BAX. (d) Representació de l'inhibidor AMG. (e) Representació de l'inhibidor 88Z.



### 4.3. Interaccions entre l'inhibidor i la proteïna

Un cop validat el model, és a dir, seleccionades quines conformacions de la proteïna són més adequades per valorar l'activitat d'inhibidors de Tipus I, II, o I/II, cal establir criteris per disseny de nous inhibidors més potents. Per poder començar a fer canvis als inhibidors, per intentar buscar-ne algun de millor, primerament s'ha d'entendre de quina manera interacciona cada inhibidor amb cada centre actiu de la proteïna. Per fer-ho, es mira el resultat del docking entre la conformació de la proteïna amb al seu inhibidor, i es mira els diferents tipus d'interacció que hi ha. En aquest cas només es miren tres tipus d'interaccions que considerem principals en base als nostres resultats i a la bibliografia.

Les interaccions per enllaç d'hidrogen són interaccions no covalents que es donen quan un àtom electronegatiu pot interaccionar amb un àtom d'hidrogen que està unit de manera covalent amb un altre àtom electronegatiu. Els enllaços d'hidrogen més comuns ens sistemes biològics es donen en àtoms de nitrogen i oxigen dels grups amines o imines i grups ceto respectivament.

La interacció  $\pi$  stacking és una interacció no covalent entre anells aromàtics que continguin electrons  $\pi$  de l'inhibidor i de l'aminoàcid com per exemple la fenilalanina o tirosina entre d'altres.

Les interaccions hidrofòbiques són interaccions no covalents entre les regions apolars del aminoàcid i les regions no polars de l'inhibidor com a conseqüència de la interacció per dispersió i l'efecte hidrofòbic.

**Taula 7.** Interaccions entre la conformació de la proteïna i al seu inhibidor corresponent

Inhibidor	Proteïna	Enllaços d'hidrogen Proteïna / inhibidor	$\pi$ stacking Proteïna / inhibidor	Hidrofòbica Proteïna / inhibidor
3FF	3QUE	Hsd 174 ND1-HD1 / OAC Asp 176 OT2 / HAB Asp 176 HN / OAB Gly 110 HN / HAR2 Met 109 HN / HAR2	Phe 169 / CAJ Hsd 174 / CAH	Leu 171 / CAQ
78L	5TBE	Gly 110 HN / O2 Asp 168 HN / O3 Asp 168 HN / S	Tyr 35 / C27	Val 38 / H17
B96	1KV2	Glu 71 OE1 / H18 Glu 71 OE1 / H19 Asp 169 HN / O1	Phe 169 / C18	Val 38 / C23 Leu 74 / C7

En la conformació de la p38 $\alpha$  corresponent als inhibidors de Tipus I, hi ha 5 interaccions de tipus enllaç d'hidrogen entre l'inhibidor i la proteïna. La primera és entre un dels hidrògens de l'anell aromàtic de l'aminoàcid histidina 174 i l'OH de la cadena alifàtica del inhibidor. La segona i tercera interacció comparteixen al mateix aminoàcid, que és l'aspartat 176, en aquest cas interacciona amb l'hidrogen del OH terminal del inhibidor. Per altre banda, aquest aminoàcid té una amina secundària receptora d'electrons (grup NH esquelet proteïna), i rep electrons del oxigen del mateix OH del inhibidor. La quarta interacció per enllaç d'hidrogen és entre l'amina

secundària de la glicina 110 i un dels hidrògens del carboni secundari de la cadena alifàtica del inhibidor. L'últim enllaç d'hidrogen, és amb l'hidrogen restant de la cadena alifàtica de l'inhibidor amb l'amina secundària de la meteonina 109 (Figures 2a i 4a).

Les dues interaccions  $\pi$  stacking s'estableixen entre l'anell aromàtic que conté fluors del inhibidor amb l'anell aromàtic de l'aminoàcid fenilalanina 169 i l'anell aromàtic de l'aminoàcid histidina 174. La interacció hidrofòbica és amb tots els grups CH que hi ha en els anells centrals de l'inhibidor i els CH dels aminoàcids que hi ha en aquesta zona (Figures 2a i 4a).

Per la conformació de la proteïna referent als inhibidors de Tipus I/II hi ha tres interaccions de tipus enllaç d'hidrogen. La segona i tercera comparteixen l'amina secundària de l'aminoàcid l'aspartat 168. La segona interacció és amb l'oxigen més proper a l'anell de tiofè, i la tercera és amb al sofre de l'anell de tiofè. La primera interacció és amb l'amina secundària de la glicina 110 i l'oxigen de l'anell central de l'inhibidor (Figures 2b i 4b).

La interacció de tipus  $\pi$  stacking de la conformació I/II és entre el fenol de l'aminoàcid tirosina 35 i l'anell aromàtic que conté els dos fluors de l'inhibidor. Per aquesta conformació no hi ha interaccions de tipus hidrofòbiques (Figures 2b i 4b).

Per la última conformació de la p38 $\alpha$ , la òptima per unir-se a inhibidors de Tipus II, també hi ha tres interaccions de tipus enllaç d'hidrogen. Les dues primeres, comparteixen l'àcid carboxílic desprotonat de l'aminoàcid glutamat 71, on interaccionen amb el protó de les dues amines terciàries del inhibidor, i la tercera interacció és entre l'amina secundària de l'aspartat 169 i l'oxigen de la acetona del inhibidor (Figures 2c i 4c).

La interacció de tipus  $\pi$  stacking és entre l'anell de benzè de l'aminoàcid fenilalanina 169 i el naftalè de l'inhibidor. Les interaccions hidrofòbiques són, a la zona del tert-butil de l'inhibidor i amb els CH del naftalè (Figures 2c i 4c).

Aquestes són les interaccions principals entre la proteïna p38 $\alpha$  i els diferents tipus d'inhibidor. La pregunta és si totes aquestes interaccions són necessàries per a inhibir la p38 $\alpha$ . Per tal de determinar la importància d'aquestes interaccions cal identificar el fàrmacòfor dels diferents inhibidors.

#### 4.4. Identificador del Farmacòfor dels inhibidors

Per començar a fer modificacions als inhibidors per tal de millorar-los, primerament s'ha de buscar al farmacòfor de cada inhibidor. El farmacòfor és la unitat central de l'inhibidor responsable de l'activitat biològica, i s'utilitza per definir les característiques essencials de l'inhibidor. En aquesta secció es proposen un seguit de farmacòfors dels inhibidors estudiats prèviament i es fa el docking amb la conformació de la proteïna corresponent.

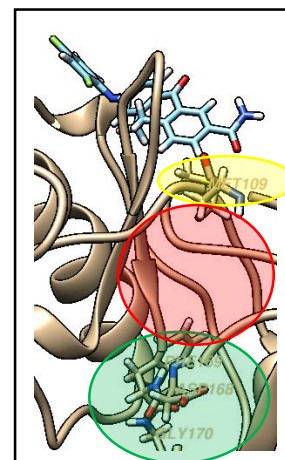
Per l'inhibidor B96, només es proposa un farmacòfor ja que el resultat obtingut del docking és bo, i estructuralment és el més simple dels diferents inhibidors analitzats (Figura 8a). Per les conformacions de Tipus I i I/II es treballa amb al mateix inhibidor, ja que els dos inhibidors de cada conformació són força iguals.

**Taula 8.** Resultats dels dockings entre els diferents farmacòfors proposats i les diferents proteïnes.

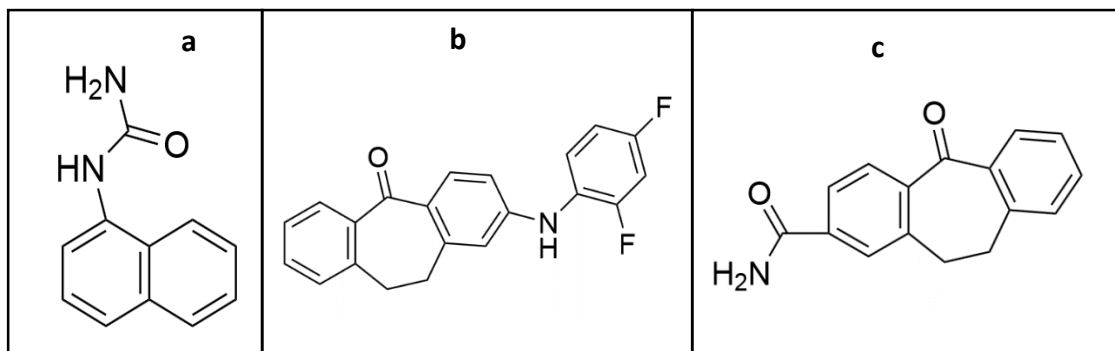
Proteïna	Farmacòfor	$\Delta G$ [kcal/mol] Met 109	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Met 109	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Phe 169	Interaccions		
					Enllaços d'hidrogen	$\pi$ stacking	Hidrofòbica
1KV2	B96_1	-7.48808	1	1	Glu 71 OE1 / H9 Asp 168 HN / O	Phe 169 / C9	Ala 51 / H8
3QUE	3FF_1	-7.72172	1	-	Gly 110 HN / O Met 109 HN / O	-	Ala 51 / H3
	3FF_2	-9.87588	1	-	Gly 110 HN / O Met 109 HN / O	Phe 169 / C6	Ala 51 / H3
	3FF_3	-9.99732	1	-	Gly 110 HN / O Met 109 HN / O	Phe 169 / C6	Ala 51 / H3
	3FF_4	-8.20549	1	-	Gly 110 HN / O Met 109 HN / O	-	Ala 51 / H3
5TBE	3FF_1	-	-	-	-	-	-
	3FF_2	-6.88029	71	-	-	-	-
	3FF_3	-7.95983	7	-	-	-	-
	3FF_4	-7.81898	1	-	Gly 110 HN / O Met 109 HN / O	-	Ala 51 / H
	3FF_5	-6.59583	73	-	-	-	-

Per la conformació de Tipus I, tots els farmacòfors, es posicionen al centre actiu de la proteïna a la primera posició predita pel docking en el rànquing de compostos. Per tant, per decidir quin és el farmacòfor correcte, es mira quina és la major energia d'interacció entre el farmacòfor i la proteïna. Així doncs, el farmacòfor hauria de ser el 3FF\_3 amb una energia d'interacció de -10.0 kcal/mol, però al farmacòfor 3FF\_2 te una energia d'interacció de -9.9 kcal/mol i estructuralment, és més simple (Taula 8). Per tant es decideix que el farmacòfor per la conformació de Tipus I és el 3FF\_2 (Figura 8b). Si es mira les interaccions que hi ha entre el farmacòfor i la proteïna, pel cas dels farmacòfors 2 i 3, a més a més dels enllaços d'hidrogen i la interacció hidrofòbica, hi ha una interacció  $\pi$  stacking que fa que augmenti la interacció. Aquesta nova interacció ve donada per l'anell aromàtic amb fluors, i aquesta consideració s'haurà de tenir en compte alhora de realitzar als canvis al inhibidor.

Per la conformació de Tipus I/II, en canvi, només el farmacòfor 3FF\_4 (Figura 8c) a la primera predicció del docking es posiciona al centre actiu de la proteïna, i per tant es decideix que aquest és el farmacòfor, tot i no tenir l'energia d'interacció més forta. El farmacòfor 3FF\_3 és el que te l'energia d'interacció més forta, però es situa en al centre actiu com un inhibidor de Tipus III, i es per això que es descarta com a farmacòfor (Figura 7 i Taula 8).



**Figura 7.** Docking entre el farmacòfor 3FF\_3 i la proteïna 5TBE. De color groc es senyala l'aminoàcid metionina 109, de color verd el DFG, de color vermell el centre actiu de la proteïna i l'inhibidor és de color blau



**Figura 8.** Representació dels farmacòfors. (a) Farmacòfor B96\_1 de l'inhibidor tipus II. (b) Farmacòfor 3FF\_2 de l'inhibidor tipus I. (c) Farmacòfor 3FF\_4 de l'inhibidor tipus I/II.

#### 4.5. Fragmentació dels inhibidors.

Per acabar d'entendre la interacció entre els inhibidors i el centre actiu de la proteïna p38 $\alpha$ , es fa una sèrie de fragmentacions en els inhibidors, per veure la importància que tenen aquests fragments en definir la interacció amb el centre actiu, per més endavant fer els canvis per tal de millorar-los.

En aquest cas, no es tindrà en compte a quina posició es col·loquen els fragments dels inhibidors en el centre actiu, ja que els fragments són relativament petits, i hi ha moltes possibilitats abans de col·locar-se en el centre actiu.

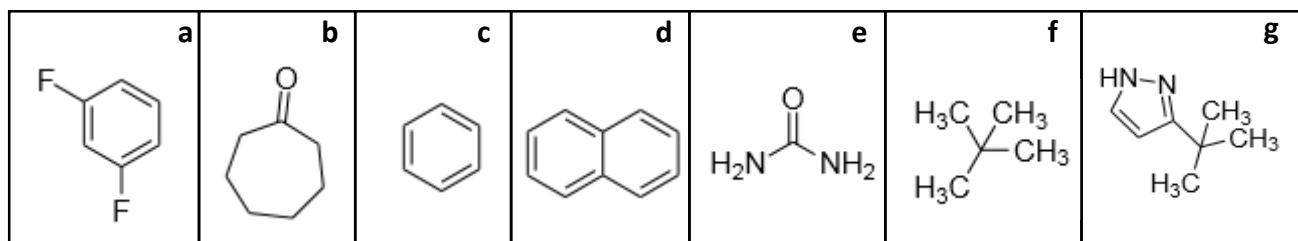
En la conformació de Tipus II, la interacció que dona més energia és la de  $\pi$  stacking, ja que els dos fragments amb aquesta interacció (Figures 9d i 9g) tenen una energia d'interacció de -6.0 kcal/mol aproximadament. Els enllaços d'hidrogen no tenen un paper tant rellevant ja que l'inhibidor que fa enllaços d'hidrogen, té una energia d'interacció de -5.3 kcal/mol (Taula 9).

En canvi, per la conformació Tipus I, la interacció enllaç d'hidrogen té un paper molt rellevant (Figura 9b), ja que el fragment que conté aquestes interaccions té una energia de -6.4 kcal/mol. Els fragments 3FF\_T1 i 3FF\_T3 (Figures 9a i 9c respectivament) tenen una energia d'interacció de -5.5 kcal/mol aproximadament, i tot i no tenir una energia tant gran, la interacció  $\pi$  stacking també és important per aquesta conformació. El fet que el benzè contingui dos fluors (Figura 9a) fa augmentar l'energia d'interacció de -5.2 kcal/mol a -5.8 kcal/mol (Taula 9).

Per la conformació de Tipus I/II, al només haver interacció hidrofòbica no es pot treure molta informació sobre al centre actiu d'aquesta conformació.

**Taula 9.** Resultats dels dockings dels fragments proposats i les proteïnes corresponents.

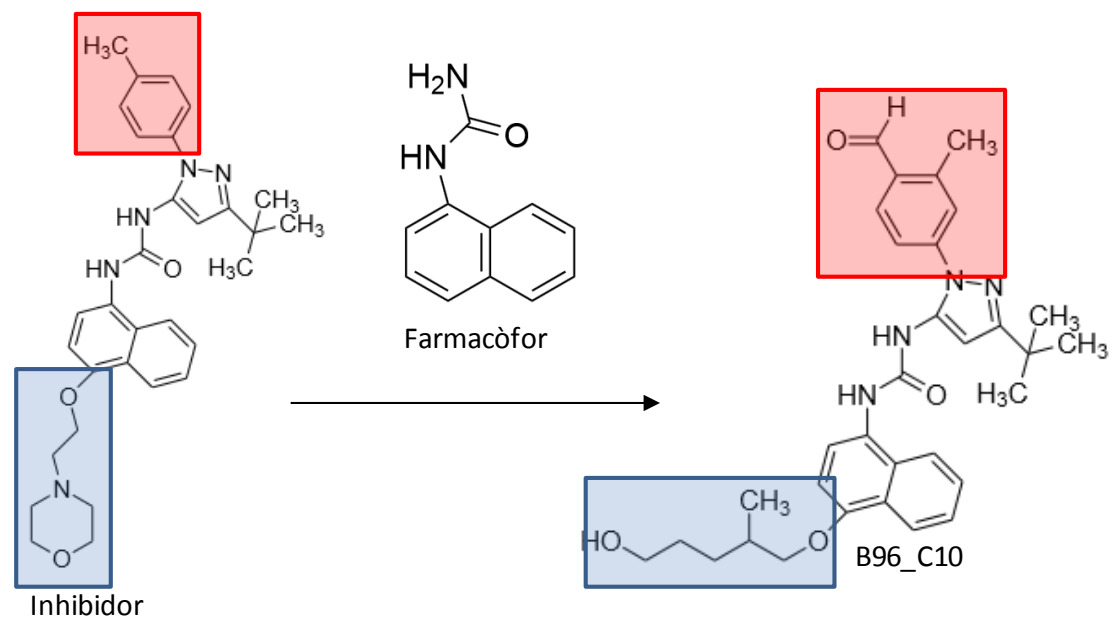
Proteïna	Fragmentació	$\Delta G$ [kcal/mol] Met 109	Posició del Rànquing del Docking on es produceix Interacció amb Met 109	$\Delta G$ [kcal/mol] Phe 169	Posició del Rànquing del Docking on es produceix Interacció amb Phe 169	Interaccions		
						Enllaços d'hidrogen	$\pi$ stacking	Hidrofòbica
1KV2	B96_T1	-5.87749	41	-6.54223	1	-	Phe 169 / Tot	Val 38 / Tot
	B96_T2	-5.38851	105	-5.66382	20	Glu 71 OE2 / H1 Glu 71 OE2 / H2 Met 109 HN / O Hsd 107 O / H3	-	-
	B96_T3	-5.72016	14	-5.52534	9	-	-	Leu 108 / Tot
	B96_T4	-6.35133	4	-6.35133	4	Ala 111 O / H11	Phe 169 / C1	Ala 51 / H6
3QUE	3FF_T1	-5.82442	49	-	-	-	Phe 169 / Tot	Leu 86 / Tot
	3FF_T2	-6.43335	1	-	-	Gly 110 HN / O Met 109 HN / O	-	Leu 108 / Tot
	3FF_T3	-5.27063	59	-	-	-	Phe 169 / Tot	Leu 86 / Tot
5TBE	3FF_T1	-5.72971	57	-	-	-	-	Leu 86 / Tot
	3FF_T2	-5.53623	$\pm 175$	-	-	-	-	Ala 51 / Tot
	3FF_T3	-	-	-	-	-	-	-


**Figura 9.** Representació dels fragments proposats. (a) Fragment 3FF\_T1. (b) Fragment 3FF\_T2. (c) Fragment 3FF\_T3. (d) Fragment B96\_T1. (e) Fragment B96\_T2. (f) Fragment B96\_T3. (g) Fragment B96\_T4.

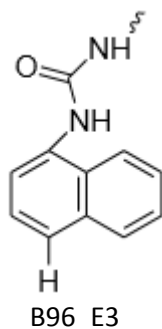
#### 4.6. Desenvolupament de nous inhibidors.

##### 4.6.1. Inhibidor B96.

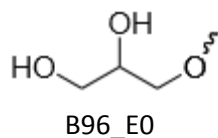
Esquema 1. Desenvolupament del inhibidor B96.



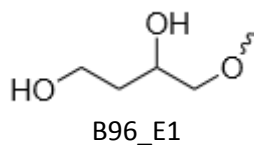
1. La part de sota no té molta importància (part blava).



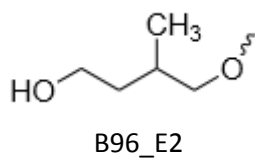
2. S'afegeix B96\_E0 per possibles interaccions tipus enllaç d'hidrogen amb els aminoàcids del centre actiu de la proteïna (part blava).



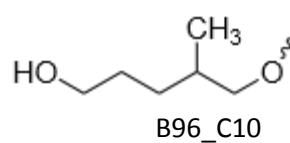
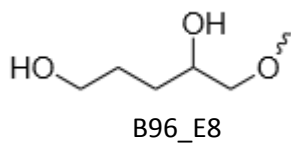
3. Es desenvolupa l'inhibidor allargant-lo amb més carbonis per tal de que faci més enllaços d'hidrogen (part blava).



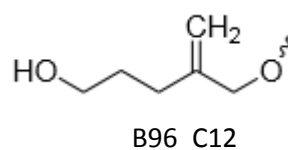
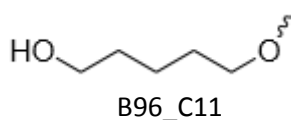
4. Es comprova si la interacció enllaç d'hidrogen és més favorable o no (part blava).



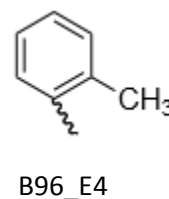
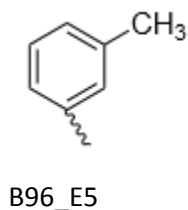
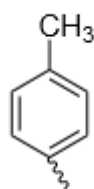
5. Es torna a afegir un altre carboni i es repeteix la mateixa operació que els punts 3 i 4 (part blava).



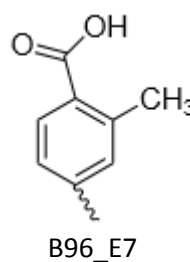
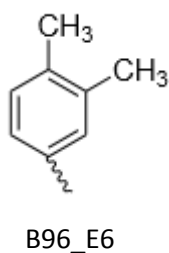
6. Es mira la importància del metil (part blava).



7. Es canvia de posició el metil del benzè (part vermella).



8. Es mira la importància de l'aldehid (part vermella).



Un cop explicats tots els passos utilitzats per desenvolupar el nou inhibidor, a la Taula 10 es mostra tots els dockings realitzats per poder acabar de desenvolupar l'explicació.



**Taula 10.** Resultats dels dockings entre la proteïna 1KV2 i els diferents canvis a l'inhibidor per desenvolupar-lo.

Proteïna	Canvis inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] proteïna – B96	$\Delta G$ [kcal/mol] proteïna - canvi inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] (menor)	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Met 109	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Phe 169	Interaccions		
							Enllaços d'hidrogen	$\pi$ stacking	Hidrofòbica
1KV2	B96_E0	-11.4930	-12.4911	-10.9241	1	1	Asp 168 HN / O Glu 71 OE1 / H Glu 71 OE1 / H7	Phe 169 / C9	Leu 104 / H3
	B96_E1			-11.1484	1	1	Asp 168 HN / O Glu 71 OE1 / H Glu 71 OE1 / H7 Gly 110 HN / O3 Met 109 HN / O3	Phe 169 / C9	Leu 104 / H3 Ile 166 / H17
	B96_E2			-10.9999	1	1	Asp 168 O / H	Phe 169 / C9	Leu 104 / H3 Ile 166 / H17
	B96_E3			-9.85757	1	1	-	-	-
	B96_E4			-10.2501	1	1	Asp 168 HN / O Glu 71 OE1 / H7	Phe 169 / C9	Leu 104 / H3 Ile 166 / H17
	B96_E5			-10.4374	1	1	Asp 168 HN / O Glu 71 OE1 / H Glu 71 OE1 / H7	Phe 169 / C9	Leu 104 / H3 Ile 166 / H17
	B96_E6			-10.4507	1	1	Asp 168 HN / O Glu 71 OE1 / H7	Phe 169 / C9	Leu 104 / H3 Ile 166 / H17
	B96_E7			-11.7220	1	1	-	-	-
	B96_E8			-10.5869	1	1	Asp 168 HN / O Glu 71 OE1 / H Glu 71 OE1 / H7 Gly 110 HN / O2 Met 109 HN / O2	Phe 169 / C9	Leu 104 / H3
	B96_C10			-12.4911	1	1	Asp 169 O / H Arg 70 HH11 ( O1	Phe 169 / C10	Ile84 / H5 Ala 51 / H29
	B96_C11			-12.0543	1	1	Asp 168 HN / O Arg 70 HH11 / O1 Glu 71 OE1 / H7 Glu 71 OE1 / H	Phe 169 / C10	Ile84 / H5
	B96_C12			-11.8283	1	1	Arg 70 HH11 / O1 Asp 168 O / H	Phe 169 / C10	Ile84 / H5

Amb el primer punt, es busca veure si la part inferior del inhibidor té un paper rellevant a la interacció amb la proteïna, per si no fos al cas, canviar-lo. L'inhibidor B96\_E3 (Esquema 1) és el que ho determina, amb un resultat favorable, ja que l'energia d'interacció amb un valor de -10.0 kcal/mol, no diferencia molt de l'inhibidor B96 amb un valor de -11.5 kcal/mol respecte el canvi produït, i per tant, es comença a fer els canvis en aquesta direcció (Taula 10).

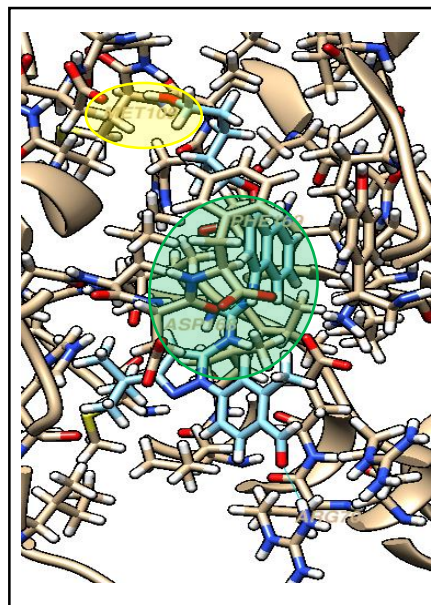
Es busca possibles interaccions a la zona del centre actiu de la proteïna que afecta a aquesta part de l'inhibidor, desenvolupant l'inhibidor B96\_E0 (Esquema 1) per buscar interaccions tipus enllaç d'hidrogen. El resultat d'aquesta modificació, és positiu, ja que l'energia d'interacció és de -11.0 kcal/mol (Taula 10), força semblant a l'inhibidor B96, i es decideix anar desenvolupant l'inhibidor per aquesta zona.

Al afegir un carboni de més en la cadena alifàtica (B96\_E1, Esquema 1), es crea dues interaccions de tipus enllaç d'hidrogen de més, i una interacció hidrofòbica, afavorint la interacció entre al nou inhibidor i la proteïna i augmentar la interacció fins a -11.1 kcal/mol respecte l'inhibidor B96\_E0 (Taula 10).

En el punt número quatre de l'Esquema 1, es comprova si la interacció de tipus enllaç d'hidrogen és rellevant en al centre actiu. Segons els resultats obtinguts en la Taula 10, l'energia d'interacció disminueix de -11.0 kcal/mol de l'inhibidor B96\_E2 a -11.1 kcal/mol de l'inhibidor B96\_E1. Així doncs en el punt número cinc de l'Esquema 1, s'afegeix un altre carboni en la cadena alifàtica, i es torna a comprovar la importància de la interacció tipus enllaç d'hidrogen amb els inhibidors B96\_E8 i B96\_C10 (Esquema 1). En aquest cas, tot i tenir més enllaços d'hidrogen (B96\_E8, Esquema 1), l'energia d'interacció per l'inhibidor B96\_E8 és de -10.6 kcal/mol mentre que per l'inhibidor B96\_C10 és de -12.5 kcal/mol (Taula 10 i Figura 10). Això és degut a que l'inhibidor no té tanta llibertat de moviments per culpa dels enllaços d'hidrogen i fa que la interacció no sigui tant bona.

En el punt número sis de l'Esquema 1, sabent que els enllaços d'hidrogen no són favorable, es comprova la importància del metil de la cadena alifàtica. Els resultats són, que el metil crea una interacció de tipus hidrofòbica, que en aquest centre actiu és favorable, ja que l'inhibidor B96\_C11 (Esquema 1), al no tenir aquest metil, disminueix la interacció fins un valor de -12.1 kcal/mol. I l'inhibidor B96\_C12 (Esquema 1), al tenir aquest doble enllaç, fa que no tingui tanta llibertat de moviments i l'energia d'interacció disminueixi fins a -11.8 kcal/mol (Taula 10).

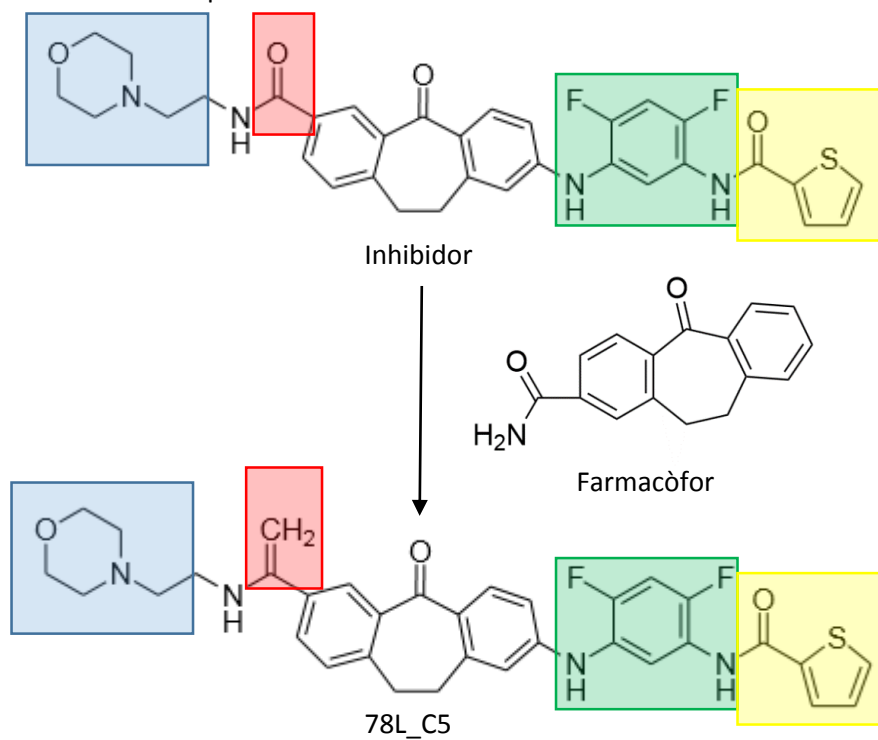
Els últims dos punts de l'Esquema 1 (punts 7 i 8), es busca acabar de millor l'inhibidor per la part superior. Els inhibidors B96\_E4 i B96\_E5 (Esquema 1), es canvia la posició del metil, i segons als resultats de la Taula 10, quan el metil està en posició meta (inhibidor B96\_E5, Esquema 1) la interacció és més favorable, amb una energia de -10.4 kcal/mol. I en posició para, si hi ha un aldehid (B96\_E7, Esquema 1), la interacció, amb una energia de -11.7 kcal/mol, és més forta que al haver un metil (B96\_E6, Esquema 1) amb una energia de -10.5 kcal/mol (Taula 10).



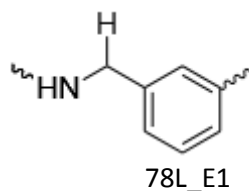
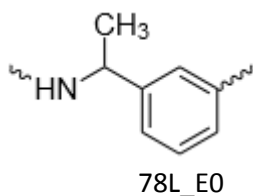
**Figura 10.** Docking entre la proteïna 1KV2 i l'inhibidor B96\_C10. De color groc es senyala l'aminoàcid metionina 109, de color verd el DFG i l'inhibidor és de color blau

4.6.2. Inhibidor 78L.

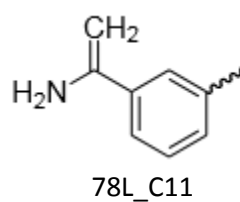
Esquema 2. Desenvolupament de l'inhibidor 78L.



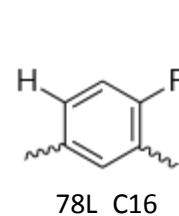
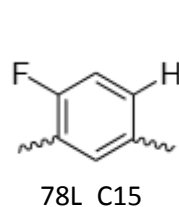
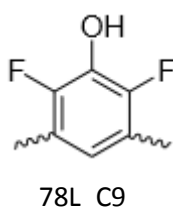
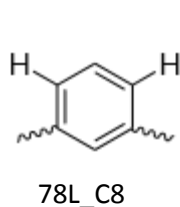
1. Veure la importància del metilè (part vermella).



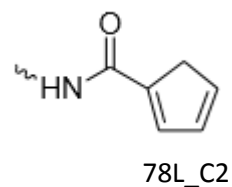
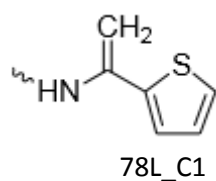
2. Importància de la part esquerra del inhibidor (part blava).



3. Modificacions en l'anell de benzè (part verda).



4. Canvis en la part dreta de l'inhibidor (part groga).



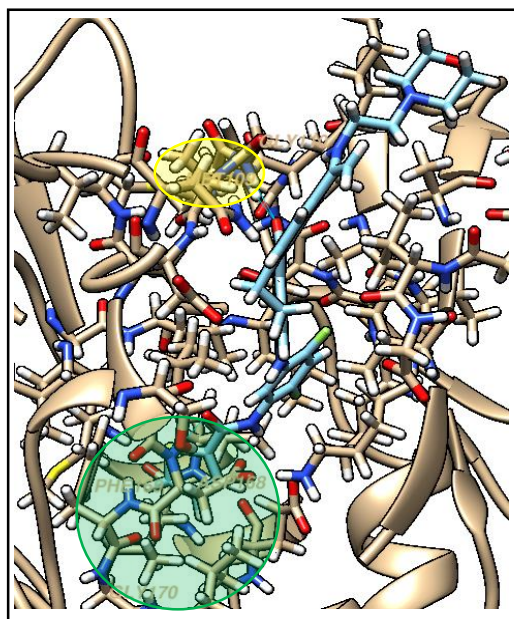
Un cop fets als canvis a l'inhibidor per tal d'explicar al seu desenvolupament, es fan els dockings moleculars per analitzar-lo. A diferència del cas anterior, al nou inhibidor només presenta un canvi respecte l'inhibidor 78L (78L\_C5, Esquema 2) que fa disminuir l'energia d'interacció fins a -12.1 kcal/mol, col·locant l'inhibidor a la primera posició al centre actiu (Figura 11). Això fa que la seva explicació no sigui tant un desenvolupament d'un nou inhibidor, sinó petits canvis que fan entendre la millora de la interacció del nou inhibidor amb la conformació de la proteïna de Tipus I/II.

Els canvis realitzats en al primer punt de l'Esquema 2, expliquen la importància del metilè. Al afegir un metil (inhibidor 78L\_E0, Esquema 2) l'energia d'interacció baixa fins a -9.0 kcal/mol i la predicció en al centre actiu no és fins la cinquena posició, la seva explicació, és que el metil te molta més rotació fent possible que l'inhibidor es pugui posicionar a més llocs. En canvi, quan en la posició del metilè hi ha un hidrogen (inhibidor 78L\_E1, Esquema 2), l'energia augmenta fins a -11.6 kcal/mol i a la primera predicció es situa en al centre actiu degut a la rotació. Aquest canvi es veu reflectit en les interaccions, de passar a tenir tres interaccions de tipus enllaç d'hidrogen quan hi ha al metil, a passar a tenir-ne quatre al haver l'hidrogen (Taula 11).

En el segon punt, es busca mirar la importància que te la part esquerra de l'inhibidor, on els resultats obtinguts indica que no es rellevant ja que l'energia d'interacció es redueix molt poc, i les interaccions no canvien. Per tant, es descarta aquesta regió de l'inhibidor per millorar-la.

Una de les parts importants de l'inhibidor, és l'anell de benzè i la col·locació dels seus substituents, per donar estabilitat a l'inhibidor. Si a l'anell no hi ha substituents (78L\_C8, Esquema 2) l'energia d'interacció baixa molt fins a -9.2 kcal/mol i perd totes les interaccions de tipus enllaç d'hidrogen. Al canviar un dels dos fluors per un hidrogen (78L\_C15 i 78L\_C16, Esquema 2), l'energia es veu afectada, i segons quin dels dos fluors es canvia, l'energia és diferent en cada cas, tot i tenir les mateixes interaccions. Si es canvia el fluor de l'esquerra per un hidrogen (78L\_C16, Esquema 2) amb una energia de -11.9 kcal/mol te menys importància a nivell d'estabilitat que no el de la dreta (78L\_C15, Esquema 2) amb una energia de -11.5 kcal/mol. Per últim al afegir un substituent entre els dos fluors (78L\_C9, Esquema 2) l'energia es redueix fins a -9.6 kcal/mol, significat que l'anell és massa voluminós i perd les seves propietats d'estabilitat (Taula 11).

Els canvis per la part dreta de l'inhibidor, com es mostra en al quart punt de l'Esquema 2, són significatius, ja que l'energia d'interacció es veu reduïda, per la pèrdua de la interacció enllaç d'hidrogen que hi ha entre el sofre del tiofè i l'aminoàcid de la proteïna. Tot i crear-se una nova



**Figura 11.** Docking entre la proteïna 5TBE i l'inhibidor 78L\_C5. De color groc es senyala l'aminoàcid metionina 109, de color verd el DFG i l'inhibidor és de color blau

interacció de tipus  $\pi$  stacking, aquesta no és tant important com els enllaços d'hidrogen (Taula 11).

**Taula 11.** Resultats dels dockings entre la proteïna 5TBE i els diferents canvis a l'inhibidor per desenvolupar-lo.

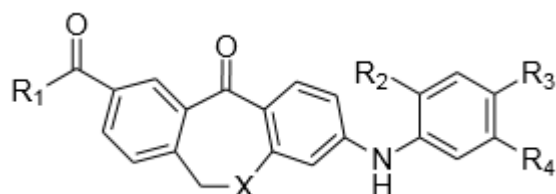
Proteïna	Canvis inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] proteïna – 78L	$\Delta G$ [kcal/mol] proteïna - canvi inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] (menor)	Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb Met 109	Interaccions		
						Enllaços d'hidrogen	$\pi$ stacking	Hidrofòbica
5TBE (I/II)	78L_E0	-11.7338	-12.1366	-8.98886	5 (-8.87648)	Asp 168 HN / S Lys 53 HZ2 / O2 Asp 112 OD2 / H10	-	Val 38 / H17
	78L_E1			-11.5900	1	Asp 168 HN / S Asp 168 HN / O2 Met 109 HN / O1 Gly 110 HN / O2	-	Val 38 / H17
	78L_C1			-10.8199	1	Gly 110 HN / O2 Met 109 HN / O2	Tyr 35 / C23	Val 38 / H17
	78L_C2			-11.0167	1	Asp 168 HN / O3 Gly 110 HN / O2 Met 109 HN / O2	Tyr 35 / C23	Val 38 / H17
	3FF_C8			-9.18331	27 (-8.39707)	-	-	Val 38 / H17
	3FF_C9			-9.58686	1	Asp 168 HN / O3 Gly 110 HN / O2 Lys 118 HZ3 / O	-	Val 38 / H17
	78L_C11			-11.5076	1	Asp 168 HN / O1 Asp 168 HN / S Gly 110 HN / O Met 109 HN / O	-	Val 38 / H17
	78L_C15			-11.5631	1	Asp 168 HN / O2 Asp 168 HN / S Gly 110 HN / O1 Met 109 HN / O1	-	Val 38 / H17
	78L_C16			-11.9094	1	Asp 168 HN / O2 Asp 168 HN / S Gly 110 HN / O1 Met 109 HN / O1	-	Val 38 / H17
	78L_C5			-12.1366	1	Asp 168 HN / O3 Asp 168 HN / S Gly 110 HN / O2 Met 109 HN / O2	-	Val 38 / H17

#### 4.7. Comparativa amb els valors d'IC<sub>50</sub>: experiments vs prediccions computacionals.

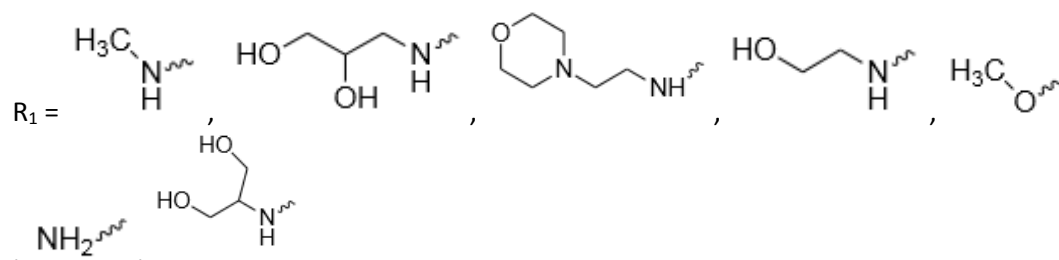
En l'article de Niklas M. Walter i coautors<sup>2</sup>, fan unes modificacions en l'inhibidor 78L i miren quin és el seu IC<sub>50</sub> sobre la proteïna p38 $\alpha$  de Tipus I/II. En base a aquests resultats, en aquest treball s'ha realitzat els dockings molecular de totes les modificacions presentades a l'article anterior amb la proteïna 5TBE, per veure si al model creat te una relació amb aquesta unitat de mesura experimental de l'activitat dels inhibidors. Com més baix és el valor de IC<sub>50</sub> més actiu és l'inhibidor.

A la Taula 12 hi ha el recull de les modificacions efectuades a l'inhibidor 78L.

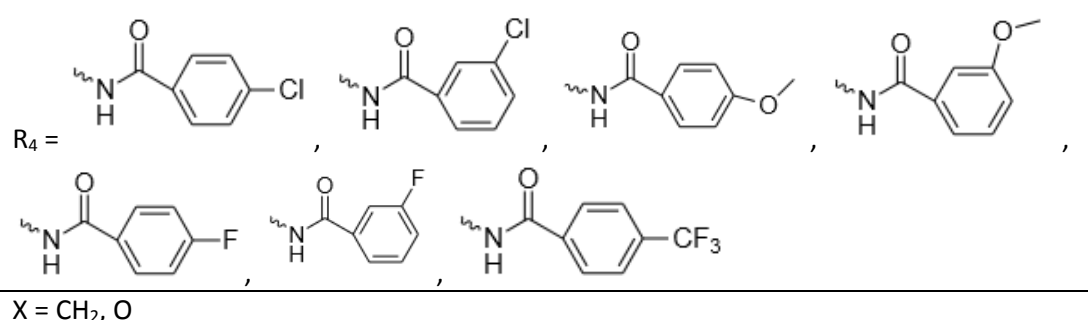
**Taula 12.** Resum de les modificacions sobre l'inhibidor 78L



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>X</b>
<b>1b</b>		CH <sub>3</sub>	F		CH <sub>2</sub>
<b>2 – 3c</b>		Part variable	Part variable		CH <sub>2</sub>
<b>4a – 4d</b>		Part variable	Part variable		CH <sub>2</sub>
<b>5a – 5n</b>	Part variable	Part variable	Part variable		Part variable
<b>6a – 6v</b>	Part variable	Part variable	Part variable		Part variable
<b>7a – 7c</b>	Part variable	Part variable	F		CH <sub>2</sub>
<b>8a – 8n</b>	Part variable	Part variable	F		Part variable
<b>9a – 12</b>		F	F	Part variable	CH <sub>2</sub>



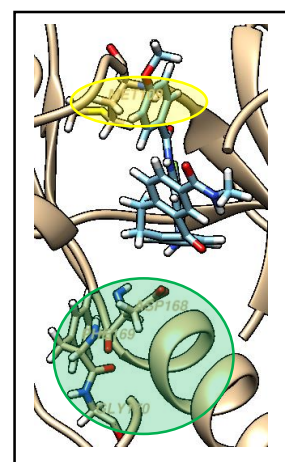
R<sub>2</sub> i R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>, F, H,



A la Taula 13 hi ha els resultats obtinguts dels dockings moleculars amb als resultats experimentals sobre la mesura del IC<sub>50</sub>.

En la primera secció de la Taula 12 (inhibidors A1b – A4d), es pot veure com inhibidors amb elevats índex IC<sub>50</sub> (menor activitat), com per exemple els inhibidors A2 i A3c, el resultat del docking és també dolent (poca afinitat), amb unes energies d'interacció de -9.4 kcal/mol i de -7.8 kcal/mol respectivament (Taula 13). Així la primera conclusió que es pot treure, que amb aquest model ets capaç de afirmar si l'inhibidor és un *hit* o no, és a dir, si l'inhibidor té una activitat biològica satisfactòria. Quan l'inhibidor pateix canvis subtils, aquest model es veu limitat, com es pot veure en la Taula 13, els inhibidors A5c i A5d, on el resultat del docking és de -11.4 kcal/mol i -11.0 kcal/mol respectivament, i en canvi, el resultat del índex IC<sub>50</sub> és de 19.3 nM i 13.1 nM respectivament (Taula 13). Així doncs, aprofitant els resultats del índex IC<sub>50</sub> s'ha pogut veure la limitació d'aquest model. Per veure aquesta conclusió, es fa dues gràfiques (Figura 12) per veure si segueix alguna tendència entre l'índex IC<sub>50</sub> i el resultat del docking. En la Figura 12a es mostra tots els resultats obtinguts, on es pot veure que no segueix cap tendència, els valors més alts de IC<sub>50</sub>, no corresponen amb els valors menys negatius del docking molecular, com ja s'ha comentat anteriorment.

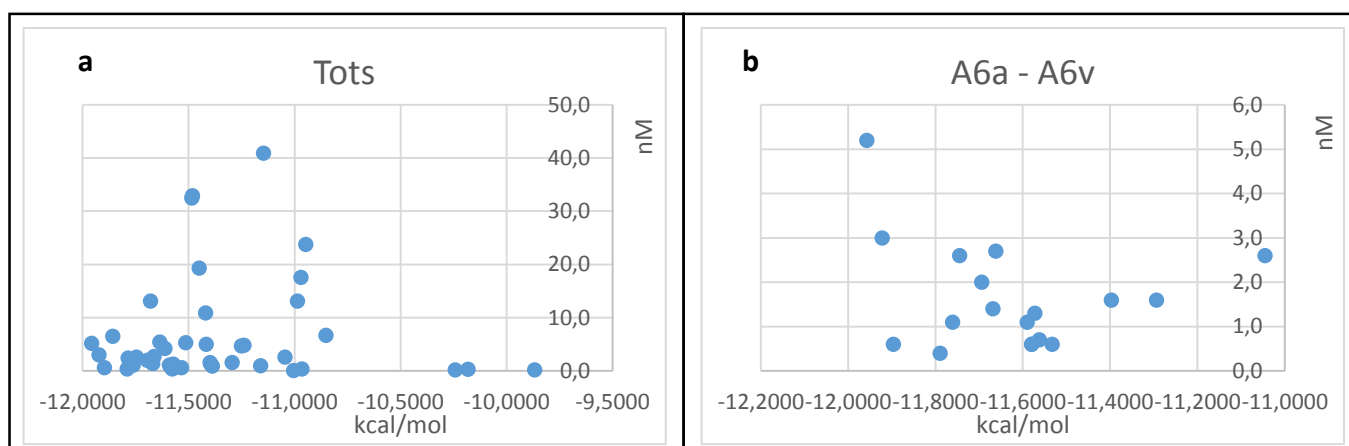
En la Figura 12b, només és mostra els resultats obtinguts pel grup d'inhibidors compresos entre A6a i A6v. Igual que abans, tampoc segueix cap tendència, el qual acaba d'afirmar la limitació d'aquest model.



**Figura 13.** Docking entre l'inhibidor 78L\_A11a i la proteïna 5TBE. De color groc es senyala l'aminoàcid metionina 109, de color verd el DFG, i l'inhibidor és de color blau



Aquests resultats han servit també per explicar i entendre el centre actiu de la proteïna 5TBE. Primerament en la Taula 13 es pot veure com els millors resultats obtinguts són del grup del inhibidor del A6a a 78L, on mirant la Taula 12, l'única part que es manté fixa és la part del R<sub>4</sub>, volent dir que aquesta part és molt important en l'inhibidor perquè hi hagi millor interacció amb la proteïna, com s'ha comentat anteriorment. Aquesta conclusió també es demostra amb els resultats obtinguts a la Taula 13 entre els inhibidors del A9a a A12, on els quatre primers inhibidors només hi ha un halogen en l'anell de benzè, i els resultats dels dockings són força bons amb una energia mitja de -10.5 kcal/mol aproximadament, en canvi, els tres últims inhibidors, el substituent és més voluminós i el resultat del docking és més dolent, amb una energia mitja de -9.0 kcal/mol aproximadament, volent dir que aquesta zona del centre actiu ha d'haver un substituent poc voluminós (Figura 13).



**Figura 12.** Gràfiques entre l'índex IC<sub>50</sub> i l'energia d'interacció del docking. (a) Gràfica entre l'índex IC<sub>50</sub> i l'energia d'interacció de totes les modificacions de l'inhibidor 78L. (b) Gràfica per veure la relació entre l'índex IC<sub>50</sub> i l'energia d'interacció de les modificacions de la 6a a la 6v de l'inhibidor 78L.

**Taula 13.** Resultats del docking i de l'índex IC<sub>50</sub> per cada modificació de l'inhibidor 78L

Proteïna	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol]	IC <sub>50</sub> [nM]	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol]	IC <sub>50</sub> [nM]
5TBE	A1b	-11.1591	1.0	A6a	-11.5897	1.1
	A2	-9.38339	23008	A6b	-11.5329	0.6
	A3a	-10.9109	160.7	A6c	-11.5801	0.6
	A3b	-10.9789	374.4	A6d	-11.5799	0.6
	A3c	-7.75707	659.1	A6e	-11.6684	1.4
	A4a	-11.4184	10.9	A6f	-11.7611	1.1
	A4b	-10.5568	129.3	A6h	-11.7897	0.4
	A4c	-11.4844	32.5	A6i	-11.9574	5.2
	A4d	-11.1462	40.9	A6j	-11.8962	0.6
	A5a	-11.2502	4.7	A6l	-11.2940	1.6
	A5b	-11.4160	5.0	A6m	-11.3975	1.6
	A5c	-11.4487	19.3	A6n	-11.0449	2.6
	A5d	-10.9851	13.1	A6o	-11.6944	2.0
	A5e	-11.5122	5.3	A6p	-11.4806	32.9
	A5f	-11.2386	4.8	A6q	-11.5722	1.3
	A5g	-10.8521	6.7	A6s	-11.5625	0.7
	A5h	-11.7846	2.4	A6t	-11.6622	2.7
	A5i	-11.6357	5.4	A6u	-11.7447	2.6
	A5j	-11.3870	0.9	A6v	-11.9222	3.0
	A5k	-11.3957	1.3	78L	-11.7338	1.0
	A5l	-11.6102	4.2	A7a	-11.5755	0.4
	A5m	-10.9870	17.6	A7b	-11.8573	6.5
	A5n	-10.9463	23.8	A7c	-11.6784	13.1
	A8a	-10.9470	0.8	A9a	-10.2414	0.2
	A8b	-9.66673	0.2	A9b	-10.1813	0.3
	A8c	-10.1761	0.3	A10a	-10.9651	0.4
	A8d	-10.9770	0.5	A10b	-11.0042	0.1
	A8e	-11.1029	0.8	A11a	-8.5285	0.4
	A8f	-11.0892	0.3	A11b	-9.23033	0.2
	A8g	-11.2246	0.4	A12	-9.88613	0.2
	A8h	-10.8970	0.2			
	A8i	-11.2125	1.0			
	A8j	-11.1693	1.2			
	A8k	-11.1535	0.7			
A8l	-10.7407	1.2				
A8m	-10.9119	1.0				
A8n	-9.93465	1.4				

#### 4.8. Interacció dels Inhibidors amb altres proteïnes p38 ( $\delta$ , $\gamma$ i $\beta$ ).

Un cop fetes millores en els inhibidors, aquests es provaran amb les altres tres tipus de proteïna p38 per veure quin model segueixen.

Per fer-ho, primerament es realitza una recerca bibliogràfica de diferents proteïnes cristal·litzades de cada tipus, amb els seus respectius inhibidors<sup>9</sup>, i es fa al docking per veure quina proteïna cristal·litzada i inhibidor s'ajusta més al model.

**Taula 14.** Resultats dels dockings entre els diferents tipus de proteïna p38 i els seus corresponents inhibidors.

Tipus proteïna p38	Proteïna	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] menor	$\Delta G$ [kcal/mol] i Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb l'aminoàcid clau
$\beta$	3GC8	B45	-10.5961	1 (Met 109)
	3GC9	B45	-10.4164	1 (Met 109)
	3GPO	NIL	-8.61882	- (Met 109)
$\gamma$	1CM8	ANP	-11.3767	- (Met 112)
	1CM8_1		-10.9299	(23) -9.80010 (Met 112)
$\Delta$	5EKN	N58	-9.70120	1 (Met 110)
	5EKO	N17	-9.57999	1 (Met 110)
	4EYJ	N61	-10.0444	1 (Met 110)
	4EYM	ORX	-9.43758	1 (Met 110)

A la Taula 14 hi ha diferents proteïnes cristal·litzades segons al tipus de proteïna p38 amb els seus respectius inhibidors, i amb el resultat del docking molecular. La última columna de la Taula 14, indica un aminoàcid clau de la interacció entre la proteïna i l'inhibidor, i la posició en que el SwissDock prediu aquesta interacció.

Per la proteïna de tipus  $\gamma$ , al SwissDock en cap moment col·loca l'inhibidor perquè tingui interacció amb l'aminoàcid clau, ja que aquesta proteïna te dues cadenes, i les diferents prediccions es situen a la cadena oposada de l'aminoàcid clau. Així doncs, s'elimina aquesta cadena i el resultat d'aquesta operació rep al nom de 1CM8\_1 i es torna a fer al docking amb aquesta nova proteïna.

En base els resultats obtinguts de la Taula 14, per la proteïna p38 $\beta$ , s'escull la cristal·lització amb un PDB 3GC8 i al seu respectiu inhibidor, ja que és qui te l'energia d'interacció més forta amb un valor de -10.6 kcal/mol, i a la primera posició ja col·loca l'inhibidor en el centre actiu . Pel mateix motiu, per la proteïna p38 $\Delta$  es tria la cristal·lització amb un PDB 4EYJ. Per la proteïna p38 $\gamma$ , al fer aquesta operació, s'aconsegueix que predigui la interacció en el centre actiu amb una bona energia d'interacció de -9.8kcal/mol, tot i predir-la a la 23 posició.

Un cop escollides les proteïnes, es fa al docking amb els diferents inhibidors millorats de la proteïna p38 $\alpha$ .

**Taula 15.** Resultats dels dockings entre els diferents tipus de proteïna p38, els inhibidors corresponents, i els inhibidors desenvolupats de proteïna p38 $\alpha$ .

Tipus proteïna	Proteïna	Inhibidor	$\Delta G$ [kcal/mol] menor	$\Delta G$ [kcal/mol] i Posició del Rànquing del Docking on es produeix Interacció amb l'aminoàcid clau
$\beta$	3GC8	B45	-10.5961	1 (Met 109)
		3FF	-8.83678	1 (Met 109)
		78L_C5	-10.0232	1 (Met 109)
		B96_C10	-9.79418	(35) -8.60086 (Met 109)
$\gamma$	1CM8_1	ANP	-10.9299	(23) -9.80001 (Met 112)
		3FF	-7.80137	-
		78L_C5	-8.83412	(14) -8.72443 (Met 112)
		B96_C10	-8.74783	-
$\Delta$	4EYJ	N61	-10.0444	1 (Met 110)
		3FF	-7.90178	-
		78L_C5	-8.75104	-
		B96_C10	-10.5418	1 (Met 110)

Per la proteïna p38 $\Delta$  l'únic inhibidor que es situa al centre actiu, és l'inhibidor amb una conformació de Tipus II, a més a més, a la primera posició ja es situa interaccionant amb l'aminoàcid clau, millorant l'energia d'interacció entre la proteïna i l'inhibidor amb un valor de -10.5 kcal/mol (taula 15), i és selectiva a aquests tipus d'inhibidors, ja que és l'únic que es situa al centre actiu. Per tant, almenys aquesta proteïna p38 $\Delta$ , és pot concloure que al seu centre actiu, segueix un model com les proteïnes de conformació Tipus II de les p38 $\alpha$ .

La proteïna p38 $\beta$  no és tant selectiva com l'anterior perquè diferents inhibidors es situen a la primera posició al centre actiu, però segueix al model de proteïnes p38 $\alpha$  amb conformació Tipus I/II, ja que l'energia d'interacció d'aquests inhibidors amb un valor de -10.0 kcal/mol, és semblant a l'energia del inhibidor cristal·litzat amb la proteïna amb un valor de -10.6 kcal/mol (Taula 15).

Amb els resultats obtinguts de la proteïna p38 $\gamma$ , no es pot concloure que segueixi cap model descrit anteriorment, s'hauria de continuar estudiant-les.

Un tret rellevant d'aquests resultats i que evidència resultats anteriors, es que l'inhibidor de Tipus I no acaba de funcionar per aquestes proteïnes, ja que aquests inhibidors han estat molt estudiats i desenvolupats i per tant són molt específics per proteïnes p38 $\alpha$  amb conformació Tipus I.

## 5. Conclusions

In this project, we have assessed and developed a computational protocol to estimate the binding affinity of inhibitors of p38 $\alpha$ . To accomplish with this goal we have obtained the following conclusions:

- First, we obtained that *SwissDock* is the best molecular docking software to predict both the orientation and binding affinity of p38 $\alpha$  inhibitors. The results obtained are significantly better than with *AutoDock*. Thus, *SwissDock* has been used for the rest of molecular docking calculations.
- Second, we have observed that Phenylalanine 169 plays a key role on determining the interaction with Type II inhibitors. Bulky inhibitors do not fit on the ATP pocket. This is important to keep in mind for further inhibitor development.
- Third, we have identified the pharmacophore of three inhibitors (Type I, Type II, and Type I/II). In particular, the pharmacophore corresponds to 3FF\_2 (Figure 7b) for Type I, B96\_1 (Figure 7a) for Type II, and 3FF\_4 (Figure 7c) for Type I/II.
- Fourth, based on fragment-based studies of inhibitors we conclude that  $\pi$  stacking interactions are important for type II inhibitors while hydrogen bonds play a key role for Type I and hydrophobic interactions in Type I/II.
- Fifth, we have designed a more potent Type II inhibitor than B96. The binding affinity has improved from -11.5 kcal/mol to -12.5 kcal/mol (Scheme 1, Figure 9 and Table 10).
- Sixth, we have designed a better Type I/II inhibitor than 78L. The binding affinity has improved from -11.7 kcal/mol to -12.1 kcal/mol (Scheme 2, Figure 10 and Table 11).
- Seventh, for Type I it was not possible to obtain a more potent inhibitors because is the type of inhibitors that have been more developed and assessed.
- Eight, Type II inhibitors are selective for p38 $\Delta$  and Type I/II inhibitors are selective also for p38 $\beta$ .
- Ninth, comparison of IC<sub>50</sub> and binding affinities from molecular docking do not show a clear trend.

Finally, we can conclude that our protocol works well for identifying initial hits for p38 $\alpha$  but is not accurate enough to offer a reliable ranking of compounds.

## 6. Bibliografia

- (1) Robert Roskoski Jr, *Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes*, *Pharmacological Research* 103 (2016) 26-48.
- (2) Niklas M. Walter; Heike K. Wentsch; Mike Bührmann; Sikle M. Bauer; Eva Döring; Svenja Mayer-Wrangowski; Adrian Sievers-Engler; Nicole Willemsen-Seegers; Guido Zaman; Rogier Buijsman; Michael Lämmerhofer; Daniel Rauh; Stefan A. Laufer, *Design synthesis and biological evaluation of novel type I/II p38 $\alpha$  MAP kinase inhibitors with excellent selectivity high potency and prolonged target residence time by interfering with the R-spine*, *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (2017) 8027-8054.
- (3) Zheng Zhao; Hong Wu; Li Wang; Yi Liu; Stefan Knapp; Qingsong Liu; Nathanael S. Gray, *Exploration of type II binding mode: a privileged approach for kinase inhibitor focused drug discovery?*, *ACS Chemical Biology* 9 (2014) 1230-1241.
- (4) Marco Biasini; Stefan Bienert; Andrew Waterhouse; Konstantin Arnold; Gabriel Studer; Tobias Schidt; Florian Kiefer; Tiziano Gallo Cassarino; Martino Bertoni; Lorenza Bordoli; Torsten Schwede, *Swiss-Model: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information*, *Nucleic Acids Research* 42 (2014) 252-258.
- (5) Grosdider A; Zoete V; Michielin O, *SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADockDss*, *Nucleic Acids Research* 39 (2011) 270-277.
- (6) Pettersen EF; Goddard TD; Haug CC; Couch GS; Greenblatt DM; Meng EC; Ferrin TE, *UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis*, *Journal of Computational. Chemistry*, 13 (2004) 1605-1612.
- (7) Oleg Trott; Arthur J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*, *Journal of Computational Chemistry*, 31 (2012) 455-461.
- (8) Heike K. Wentsch; Niklas M. Walter; Mike Bührmann; Svenja Mayer-Wrangowski; Daniel Rauh; Guido J. R. Zaman; Nicole Willemsen-Seegers; Rogier C. Buijsman; Melanie Henning; Daniel Dauch; Lars Zender; Stefan Laufer, *Optimized target residence time: type I/II inhibitors for p38 $\alpha$  MAP Kinase with improved binding kinetic through direct interaction with the R-Spine*, *Angewandte Chemie International Edition* 56 (2017) 5363-5367.
- (9) Lloc web: <https://www.rcsb.org/>