

---

# NUEVOS BLANCOS PARA NUEVOS ANTIBIÓTICOS

---

DISEÑO COMPUTACIONAL Y POLIFARMACOLOGÍA DE  
INHIBIDORES DE FACTORES DE VIRULENCIA  
BACTERIANOS

**Eduardo Bermudez Gabriel**

Tesis doctoral  
2018

CCBG – DETEMA – FQ – UDELAR

Directores: Patricia Saenz – Leif Eriksson





## LISTADO DE ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácidos
ACP	3-amino-3-carboxipropil
ADP	Adenosín difosfato
ADP-R	ADP-ribosa
ART	Mono-ADP-ribosiltransferasas
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
β-TAD	Beta-metileno-tiazol-4-carboxiamida-adenina-dinucleotido
Cbz	Carbobenciloxi
ChxA	Toxina cholix
DM	Dinámica molecular
DT	Toxina diftérica*
DTA	Diftamida
DTI	Diftina
eEF2	Factor de Elongación Eucariótico 2*
ETA	Exotoxina A
FASTA	<i>Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm</i>
FF	Campo de fuerzas*
GTP	Guanosín trifosfato
HF	Hartree-Fock
LPAT*	Cbz-LPAT* péptido: leucina, prolina, adenina y T* un derivado de treonina en el que el grupo carboxilo fue substituido con –CH <sub>2</sub> -SH
LPATG	Péptido: leucina, prolina, adenina, treonina y glicina
LPXTG	Péptido: leucina, prolina, X, treonina, y glicina, donde X es cualquier aminoácido
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina*
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido
NIC	Nicotinamida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBC	Condiciones de Borde Periódicas*
PDB	<i>Protein data bank</i>
RESP	<i>Restrained ElectroStatic Potential</i>



RCSB-PDB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein data bank</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación de la media cuadrática*
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAM	S-adenosilmetionina
SrtA	Sortasa A
VHTS	Tamizado virtual de alto rendimiento*
ZINC	Acrónimo recursivo “ZINC is not commercial”

\* Siglas provenientes del idioma inglés.





## 1 CONTENIDO GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
CONTENIDO GENERAL .....	3
CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO II - ANTECEDENTES.....	9
CAPÍTULO III - OBJETIVOS.....	41
CAPÍTULO IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
CAPÍTULO V - CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	89
ANEXO A - RESULTADOS VHTS SCHRÖDINGER .....	93
ANEXO B - NUEVOS PARÁMETROS FF.....	109
ANEXO C - BASE DE DATOS DE DIANAS BIOLÓGICAS .....	129
AGRADECIMIENTOS .....	135





---

# CAPÍTULO I

---

## INTRODUCCIÓN



Es bien sabido que el revolucionario descubrimiento de la Penicilina y el posterior desarrollo de fármacos antibacterianos incidió positivamente tanto en la calidad como en la esperanza de vida. Sin embargo, ya desde 1945 se conoce la capacidad de los microorganismos a generar resistencia a los mismos. El uso y abuso de los fármacos contribuyó a acelerar este proceso convirtiéndolos en menos efectivos e incluso, en ocasiones, totalmente ineficientes. Nos encontramos ante una emergencia sanitaria mundial donde es imperante el diseño de antibióticos capaces de combatir bacterias especialmente resistentes.

Dada la falta de inversión de la industria farmacéutica en el desarrollo de este tipo de fármacos y que el enfoque bactericida facilita la generación de resistencia, es que nuevos enfoques para enfrentar esta problemática, son requeridos. En este marco, es que el presente trabajo de tesis busca contribuir a una posible solución. Mediante el uso de métodos computacionales, se abordará el estudio de dos sistemas diferentes: la Sortasa A de bacterias Gram-positivas y la toxina diftérica de la familia de las mono-ADP-ribosiltransferasas. De este modo buscamos desarrollar estrategias que permitan mitigar la severidad de las infecciones para que el sistema inmune pueda tomar el control sobre las mismas.

Sortasa A es una enzima esencial para la alta patogenicidad de bacterias Gram-positivas y ha sido propuesta como un blanco universal para agentes terapéuticos contra este tipo de bacterias, ya que su inactivación reduce la virulencia de los patógenos de forma significativa. Además, como Sortasa A no es una enzima requerida para el crecimiento celular, sus inhibidores mostrarían una menor propensión a generar resistencia.

La toxina diftérica es una toxina bacteriana responsable de los principales síntomas de la difteria. Presenta actividad enzimática que lleva a la muerte de las células eucariotas blanco por medio de modificaciones covalentes de proteínas específicas dentro de las mismas. El dominio catalítico es liberado en el citoplasma de la célula hospedera catalizando allí la transferencia de un fragmento ADP-ribosa de su cofactor  $\text{NAD}^+$ , a un residuo particular del factor de elongación eucariótico 2. Esta modificación inhibe la síntesis proteica que consiguientemente lleva a la muerte celular.

Empleando *docking* molecular se buscó estudiar la inhibición de la Sortasa A como modo alternativo para disminuir la virulencia de las bacterias Gram-positivas. En el caso del sistema de la toxina diftérica estudiamos la interacción de la misma con el factor de elongación eucariótico 2 y el mecanismo que conduce hacia la ADP-ribosilación mediante técnicas de dinámica molecular. De este modo se buscaron los elementos clave para el desarrollo de estrategias para combatir la acción de dicha toxina.

Para ambos sistemas se obtuvieron resultados que abren caminos claros para seguir adelante con la investigación acorde al objetivo general del presente trabajo. Logrando así hacer una breve contribución a la problemática que representa actualmente la generación de resistencia bacteriana.





---

# CAPÍTULO II

---

## ANTECEDENTES





1	CONTENIDO DEL CAPÍTULO	
2	RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	13
3	ESTRATEGIAS COMPUTACIONALES PARA EL ESTUDIO DE FÁRMACOS .....	14
4	SORTASA A.....	15
4.1	ESTRUCTURA.....	15
4.2	FUNCIÓN.....	16
4.3	MECANISMOS DE REACCIÓN .....	17
4.4	ENFOQUE .....	18
5	TOXINA DIFTÉRICA Y FACTOR DE ELONGACIÓN EUCARIÓTICO 2 .....	18
5.1	TOXINA DIFTÉRICA .....	18
5.2	FACTOR DE ELONGACIÓN EUCARIÓTICO 2 .....	19
5.3	ACCIÓN DE LAS TOXINAS ADP-RIBOSÍLICAS FRENTE A EEF2 .....	20
6	METODOLOGÍA .....	21
6.1	MECÁNICA MOLECULAR.....	21
6.2	DINÁMICA MOLECULAR.....	22
6.3	MODELADO POR HOMOLOGÍA .....	24
6.4	<i>DOCKING</i> MOLECULAR .....	26
7	BIBLIOGRAFÍA.....	29





## 2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Hasta hace algunos años los fármacos antibacterianos eran considerados el remedio definitivo para el tratamiento de infecciones de cualquier tipo, independientemente de si fuesen producto de cepas encontradas en la comunidad u hospitalarias y si su uso era el correcto o no. En 1945 en su discurso del premio nobel, Alexander Fleming advertía que era posible que los microorganismos generasen resistencia a la Penicilina y que de hecho lo había observado en el laboratorio y en el cuerpo humano.<sup>1</sup> Es así que se ha detectado resistencia a cada nuevo fármaco antibacteriano que se ha desarrollado a lo largo de los años.

El uso generalizado de agentes antimicrobianos ejerce una presión selectiva que acelera el proceso evolutivo normal de desarrollo de resistencia. Las cepas resistentes pueden propagarse y diseminarse donde no se cumplen las medidas de prevención y control de infecciones. El abuso al momento de emplear este tipo de agentes terapéuticos ha llevado a que en la actualidad se hayan vuelto menos efectivos e incluso, en algunos casos, totalmente ineficaces. Esto ha dado lugar a una emergencia de seguridad sanitaria mundial acelerada que está superando rápidamente las opciones de tratamiento disponibles.<sup>2</sup>

A todo esto, se suma el hecho de que no se han desarrollado nuevas clases de fármacos antibacterianos desde finales de los años ochenta. En la Figura II. 1<sup>2</sup> se presenta una línea de tiempo con la fecha de descubrimiento (no de introducción al mercado) de los diferentes agentes antibacterianos.<sup>3</sup>

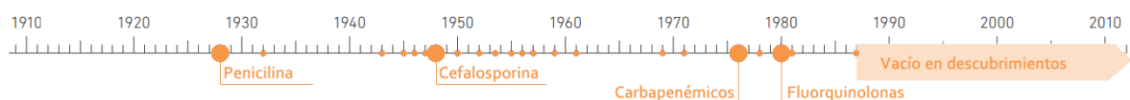


Figura II. 1 – Línea temporal que indica la fecha inicial de descubrimiento o patentado de las diferentes clases de agentes antibacterianos.

La resistencia a antibióticos constituye una gran amenaza para la sociedad y por lo tanto, el desarrollo de fármacos antibacterianos sigue siendo un objetivo importante. En particular, un desafío científico relevante consiste en el diseño de antibióticos para combatir bacterias especialmente resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA por su acrónimo en inglés), que es responsable de infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados. Otro ejemplo es *Listeria monocytogenes*, que es una bacteria Gram-positiva que causa listeriosis, con manifestaciones clínicas que incluyen septicemia, meningitis, y muchas otras enfermedades letales.<sup>4</sup> En la Tabla II. 1<sup>2</sup> se presenta un informe referente al estado de situación de la resistencia bacteriana en Uruguay del año 2014 elaborado por la OMS.<sup>2</sup>

Tabla II. 1 – Resistencia bacteriana en Uruguay 2014.<sup>2</sup>

	Resistencia	Fuente	Resistencia (%)	Recolección de datos	Publicación o informe
<i>Escherichia coli</i>	Cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> generación	Datos oficiales no disponibles			2013
		Publicación	0	2007–2008	2010
	Fluoroquinolonas	Datos oficiales no disponibles			2013
		Publicación	15	2007–2008	2010
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> generación	Datos oficiales	49 (ctx); 58 (caz)	2010	2013
	Carbapenémicos	Datos oficiales	0.7 (mem); 1.2 (imi)	2010	2013
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina (MRSA)	Datos oficiales no disponibles			2013
		Publicación	40	2001–2006	2009
		Publicación	76.4	2003–2006	2013
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina <sup>+</sup>	Datos oficiales	1.1*	2010	2013
<i>Salmonella no tifoidea</i> (SNT)	Fluoroquinolonas	Datos oficiales no disponibles			2013
		Publicación	0	1976–2000	2009
<i>Shigella</i> sp.	Fluoroquinolonas	Datos oficiales no disponibles			2013
		Publicación	0	2001–2008	2010
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> generación <sup>++</sup>	Datos oficiales no disponibles			2013

caz, ceftazidim; ctx, cefotaxim; + no susceptible \*no especifica resistencia o no susceptibilidad  
imi, imipenem; mem, meropenem ++ susceptibilidad disminuida

Como consecuencia de haber completado la decodificación del genoma humano y los genomas de patógenos, se encuentran disponibles alrededor de 40.000 genes y al menos el mismo número de proteínas. Muchas de estas proteínas son potenciales blancos para el descubrimiento de fármacos o la identificación de nuevas dianas biológicas.<sup>5</sup> Es evidente que la expresión de todas estas proteínas y el ensayo experimental (*screening*) de compuestos activos contra ellas son extremadamente costosos, demandan demasiado tiempo y resultan totalmente imprácticos. De esta forma, los estudios *in silico* se vuelven una alternativa atractiva para el *screening* contra múltiples blancos biológicos.

### 3 ESTRATEGIAS COMPUTACIONALES PARA EL ESTUDIO DE FÁRMACOS

La polifarmacología se concentra en el hecho de que un fármaco puede interactuar con múltiples dianas biológicas, siendo ésta una propiedad deseable en el caso de enfermedades complejas, como es el cáncer. Sin embargo, esta habilidad de un fármaco puede además ser responsable de efectos colaterales perjudiciales.<sup>6</sup>

Tradicionalmente, las aproximaciones computacionales se han enfocado en la interacción de compuestos químicos y dianas biológicas mediante la búsqueda en una base de datos de pequeñas moléculas para compuestos con actividad similar contra un único blanco.<sup>7</sup> Por otro lado, las aproximaciones de *docking* reverso (o inverso) han emergido como una herramienta computacional prometedora para identificar blancos probables para nuevos compuestos, productos naturales o fármacos conocidos.<sup>8-11</sup> Estos nuevos blancos pueden incluir biomoléculas asociadas con toxicidad, generando información esencial para que un nuevo fármaco se encuentre disponible en el mercado. Esta aproximación computacional que tiende puentes entre los espacios químico y biológico, se describe a menudo como “pescar el blanco”.<sup>7, 12</sup>

En la literatura se han expuesto varios estudios con el fin de validar la aproximación de *docking* inverso, los que han permitido la identificación de nuevos blancos terapéuticos y la detección de toxicidad de fármacos conocidos y productos naturales.<sup>13-18</sup>

La primera etapa consiste en definir el subconjunto de pequeñas moléculas para usar como “carnadas” para pescar el blanco.

## 4 SORTASA A

### 4.1 Estructura

Sortasa A (SrtA) está conformada por 2 hojas beta de 4 hebras cada una y dos hélices alfa muy pequeñas. Los aminoácidos más relevantes en el sitio activo son: His120, Cys184, Arg197 y Trp194, estos aminoácidos juegan un rol fundamental en la reacción de transpeptidación catalizada por la SrtA.

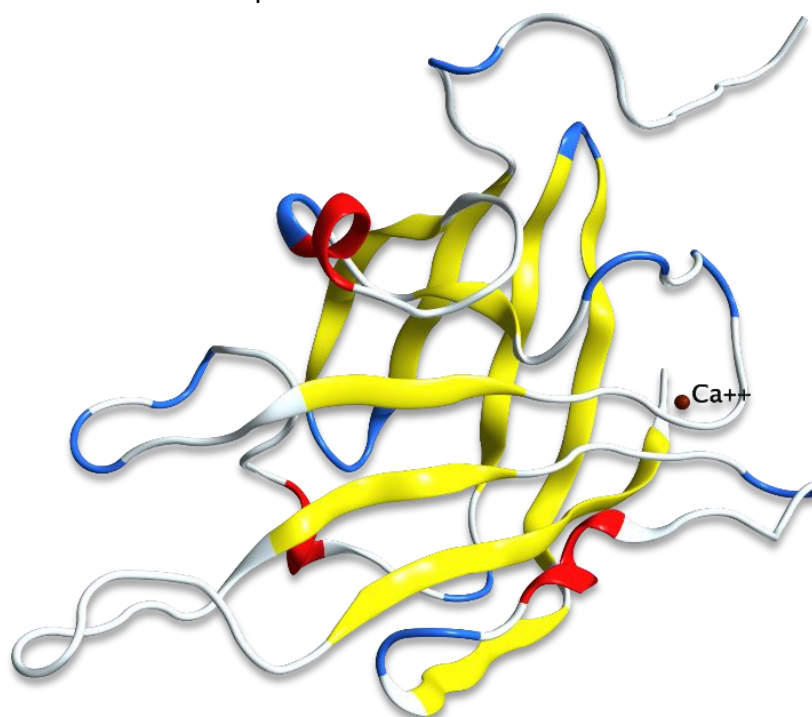


Figura II. 2 – Estructura de la Sortasa A PDB: 2KID

En su conformación cerrada tiene además un Ca divalente cuya función principal es mantener el sitio activo cerrado.

Particularmente la estructura 2KID<sup>19</sup> está unida covalentemente a un inhibidor, el péptido Cbz-LPAT\* (siendo T\* un derivado de treonina en el que el grupo carboxilo fue substituido con  $-\text{CH}_2-\text{SH}$  y el Cbz un grupo protector carbobenciloxi, de aquí en más simplemente LPAT\*) que es a su vez un análogo de señal. La estructura fue resuelta mediante espectroscopía de RMN y se publicaron 20 confórmeros.

## 4.2 Función

Las bacterias Gram-positivas despliegan proteínas en su superficie que pueden interaccionar con las células del huésped y juegan por tanto un rol en la virulencia. SrtA es una enzima esencial para la alta patogenicidad de bacterias Gram-positivas que dan lugar a listeriosis, infecciones causadas por MRSA y neumonía, entre otras enfermedades.<sup>20-23</sup>

La ruptura del fragmento LPXTG (leucina, prolina, X, treonina, y glicina, donde X es cualquier aminoácido) ocurre entre los residuos de treonina y glicina, en una reacción catalizada por SrtA. Luego de esta ruptura en el motivo conservado LPXTG, el carboxilo de la treonina se une mediante un enlace amida al grupo amino libre de un puente pentaglicina perteneciente a la pared celular del microorganismo (Figura II. 3).<sup>24, 25</sup>

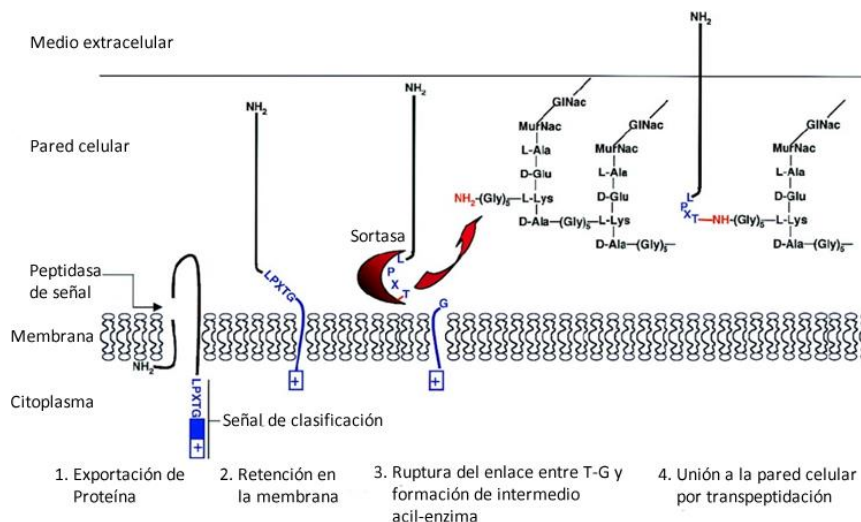


Figura II. 3 – Pasos involucrados en el mecanismo de unión covalente de proteínas superficiales a la pared celular. MurNac: ácido N-acetilmurámico.

La enzima SrtA, que cataliza la reacción de anclaje al peptidoglicano de la pared celular de un fragmento LPXTG, ha sido propuesta como un blanco universal para agentes terapéuticos contra bacterias Gram-positivas,<sup>24, 26, 27</sup> ya que su inactivación reduce la virulencia de los patógenos de forma significativa.<sup>28-31</sup> Más aún, como SrtA no es una enzima requerida para el crecimiento celular, sus inhibidores mostrarían una menor propensión a generar resistencia.<sup>26</sup> SrtA de *Staphylococcus aureus* es por lejos la enzima de este tipo más estudiada,<sup>26, 32-39</sup> para la cual se han descrito inhibidores.<sup>40-46</sup>

### 4.3 Mecanismos de reacción

Se han postulado tres posibles mecanismos para el primer paso de la reacción catalizada por la SrtA, los mismos se presentan en la Figura II. 4.<sup>37, 47</sup> El primero (Figura II. 4-A) involucra un par iónico formado por el tiolato de la Cys184 con el ion imidazolio de la His120 o el ion guanidinio de la Arg197 (si bien esto es descartado actualmente<sup>47</sup>). El segundo tipo de mecanismo (Figura II. 4-B) implica una activación del tiol por medio de una desprotonación llevada a cabo por la cadena lateral de un residuo básico, pudiendo ser la His120 o bien la Arg197. El tercer y último mecanismo propuesto (Figura II. 4-C) involucra una tríada catalítica Cys-His-Asp. En el mismo, nuevamente la Cys184 requiere de un tipo de activación básica, pero esta vez el residuo Asp serviría para formar un sistema de relé de cargas que facilitaría la sustracción del protón de la Cys184 y la estabilización de la carga positiva de la His120.

Tanto Frankel y colaboradores como Suree y colaboradores se han inclinado por el primer modelo. Si bien implica dos cadenas laterales ionizadas de manera inversa a lo esperado a pH fisiológico (pKa del ion imidazolio en el entorno de 6 y pKa del tiol en el entorno de 8) postulan que aproximadamente un 0,06% de la enzima se encontraría en dicha situación y que este porcentaje tan bajo sería suficiente para explicar la actividad de la misma.

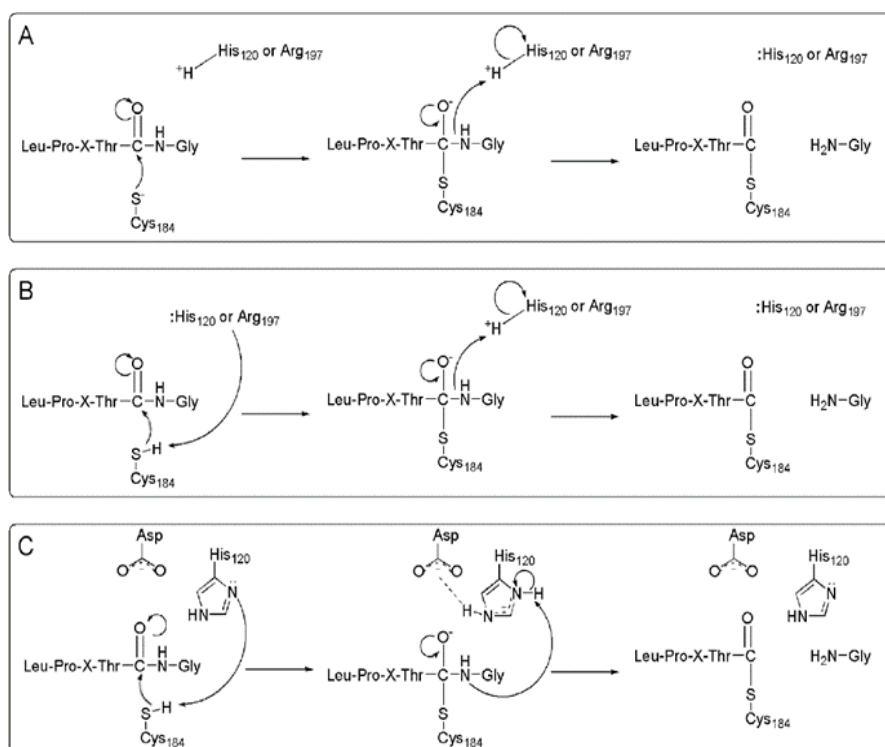


Figura II. 4 – Mecanismos de reacción propuestos para el primer paso de la catálisis realizada por SrtA.

#### 4.4 Enfoque

Tradicionalmente los agentes antibacterianos tienen como objetivo matar o detener el crecimiento de los microorganismos. Mientras que estos compuestos bactericidas y bacteriostáticos, respectivamente, son muy efectivos en organismos susceptibles, la acción antimicrobiana de estos fármacos está comprometida frente a bacterias resistentes a la acción. Los compuestos que no actúan matando a sus blancos sino inhibiendo su habilidad para desplegar las proteínas necesarias para infectar a sus huéspedes, resultan una alternativa promisoría que evita la generación de resistencia. Así, estos compuestos impiden la infección, pero no son bactericidas. El tratamiento con los nuevos compuestos conduce a bacterias que no son patogénicas y serán blancos de la destrucción por el sistema inmune.<sup>40, 48</sup>

Resulta evidente entonces, que llevar a cabo un estudio en profundidad de nuevas moléculas pequeñas activas contra SrtA es de vital importancia, principalmente para el desarrollo de nuevos antibióticos, evitando la resistencia y efectos colaterales en el organismo humano.

Habiendo identificado las nuevas moléculas que se predice interaccionan o se unen eficientemente al sitio activo de SrtA, empleando *docking* inverso es posible obtener un conjunto restringido de blancos biológicos relacionados a cada inhibidor de SrtA (incluyendo también los previamente descritos),<sup>40-46</sup> de forma de permitir ensayos biológicos posteriores. Esto puede conducir a la identificación de posibles efectos colaterales en el huésped.

## 5 TOXINA DIFTÉRICA Y FACTOR DE ELONGACIÓN EUCARIÓTICO 2

### 5.1 Toxina diftérica

La toxina diftérica (DT) es una de las primeras toxinas bacterianas caracterizadas y una de las más estudiadas de todos los tiempos.<sup>49</sup> Es el agente patogénico de *Corynebacterium diphtheria* y la responsable detrás de los principales síntomas de la difteria. DT es una toxina de tipo A-B típica, estas están formadas por dos componentes que realizan diferentes tareas durante su acción. Más específicamente pertenece a la familia de las mono-ADP-ribosiltransferasas (ART) junto la exotoxina A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa* y la toxina del cólera (ChxA) de *Vibrio cholerae*, entre otras. Este grupo de toxinas bacterianas presenta actividad enzimática que lleva a la muerte de las células eucariotas blanco por medio de modificaciones covalentes de proteínas intracelulares específicas.<sup>50</sup>

DT es un polipéptido de 560 a.a. el cual pierde un fragmento señal de 25 a.a. al ser secretado por la bacteria, dando como resultado una toxina de 58 kDa compuesta de 535 a.a.<sup>51, 52</sup> Su estructura consta de tres dominios que se pliegan en forma de Y. Desde su residuo N-terminal al C-terminal los mismos; el dominio C (dominio catalítico,



residuos 1 a 193), dominio T (dominio de translocación, residuos 205 a 378) y dominio R (dominio de unión a receptor, residuos 386 a 535).<sup>49, 53, 54</sup>

En términos de la clasificación de toxinas de tipo A-B, el dominio C corresponde al fragmento A y los dominios R y T al B.<sup>54</sup> Luego de una endocitosis mediada por receptor y una translocación dependiente de pH en las que los dominios R y T son escindidos, el dominio C es liberado en el citoplasma de la célula hospedera.<sup>55-61</sup> Allí cataliza la transferencia un fragmento ADP-ribosa de su cofactor NAD<sup>+</sup>, a un residuo particular de su blanco proteico, el factor de elongación eucariótico 2 (eEF2). Esta modificación inhibe la síntesis proteica que consiguientemente lleva a la muerte celular.<sup>62-66</sup> Este mecanismo es tan eficiente que basta con un único dominio C para terminar completamente con el funcionamiento de una célula.<sup>67</sup> En ausencia de sustrato, la DT cataliza la glicohidrólisis lenta del NAD<sup>+</sup> en el enlace *N*-glicosídico entre la ADP-ribosa y la nicotinamida.<sup>68</sup> Sin embargo, no se ha establecido relevancia biológica para este proceso hasta el momento.

## 5.2 Factor de Elongación Eucariótico 2

El factor eucariótico de elongación 2 (eEF2) es una proteína de 842 a.a. que cataliza la translocación dependiente de GTP del ribosoma durante los procesos de traducción – elongación involucrados en la síntesis proteica. Siendo una pieza fundamental para el correcto desarrollo de la misma.<sup>69</sup> Este posee un aminoácido único y distintivo, el cual es altamente conservado y distribuido tanto en eucariotas como *archaea*, la diftamida (DTA).<sup>65, 66</sup> La misma se obtiene mediante la modificación de un residuo histidínico (His699 en levaduras y His715 en mamíferos) y su ausencia se ha asociado a la falta de fidelidad traduccional en la síntesis proteica.<sup>70, 71</sup>

La ruta biosintética que lleva a la formación de la DTA partiendo de histidina, consta de cuatro etapas en las que participan siete enzimas (Dph1 – Dph7).<sup>72-76</sup> El primer paso involucra la transferencia del fragmento 3-amino-3-carboxipropil (ACP) de la *S*-adenosilmetionina (SAM) al anillo imidazólico de la histidina. De esta manera se genera el primer intermedio, el cual comúnmente se denomina ACP en función del grupo transferido. En esta etapa participan cuatro de las enzimas antes mencionadas (Dph1 a Dph4).<sup>72, 77-79</sup> En el segundo paso se da la formación del éster metílico de la diftina, este intermedio ha sido descrito hace relativamente poco, habiéndose ignorado su existencia por mucho tiempo.<sup>80</sup> Dph5 juega un rol inusual catalizando la *N*-trimetilación y la *O*-metilación en ACP.<sup>81</sup> El tercer paso es la formación de la diftina (DTI) por medio de una desmetilación a cargo de Dph7.<sup>80</sup> Finalmente se da la amidación del grupo carboxilo de la DTI para formar DTA en un proceso dependiente de ATP y catalizado por Dph6.<sup>82-84</sup> En la Figura II. 5<sup>81, 85</sup> se presenta la ruta biosintética.

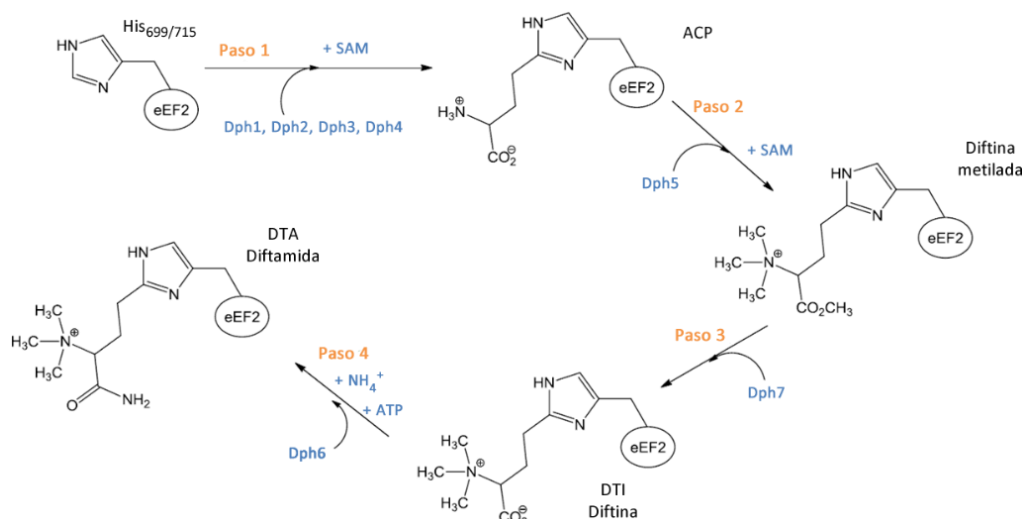


Figura II. 5 – Ruta biosintética para la obtención de diftamida.

### 5.3 Acción de las toxinas ADP-ribosílicas frente a eEF2

Diftamida en el eEF2 es el blanco de toxinas ADP-ribosílicas como DT, ETA y ChxA. Es así, que en este residuo único y modificado post-traduccionalmente, es también donde ocurre la ADP-ribosilación que lleva a la muerte celular.<sup>86</sup> Se especula que este proceso se da por medio de una reacción que transcurre con un mecanismo de tipo S<sub>N</sub>1.<sup>87, 88</sup> En una primera etapa se da la ruptura del enlace entre la nicotinamida y la *N*-ribosa,<sup>50, 89, 90</sup> posteriormente ocurre el ataque nucleofílico posterior del N3 del anillo imidazólico de DTA a la *N*-ribosa.<sup>91, 92</sup> Figura II. 6.<sup>50, 85</sup>

Se sabe que únicamente DTA y en menor grado DTI pueden ser ADP-ribosiladas por las toxinas.<sup>50, 93, 94</sup> No hay datos concretos sobre lo que ocurre con la diftina metilada ya que previamente se ignoraba su presencia como intermedio en la ruta biosintética.

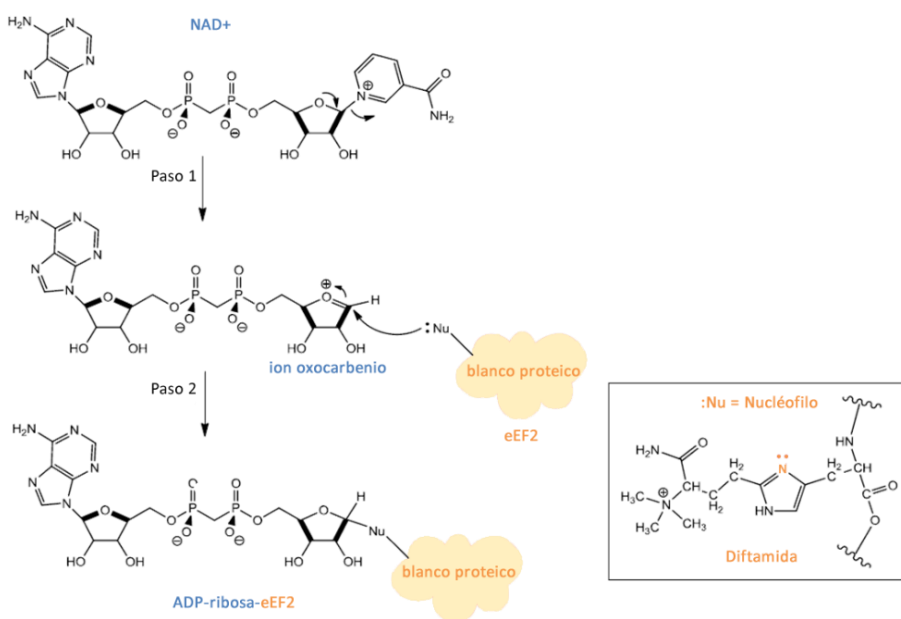


Figura II. 6 – Mecanismo propuesto para la modificación de diftamida por DT

## 6 METODOLOGÍA

### 6.1 Mecánica Molecular

Si bien la teoría de mecánica molecular se remonta a la década de 1930, las primeras aplicaciones comenzaron a surgir en los años cincuenta como respuesta a la necesidad de predecir estructuras moleculares por medio de simulaciones computacionales. Emplear la química cuántica era inviable para la capacidad de cálculo de la época y de esta manera surgió como una solución el uso de potenciales derivados de la mecánica clásica. Fue así que moléculas de mayor complejidad que las moléculas de hidrógeno y de monóxido de carbono estuvieron al alcance de los métodos *in silico*.<sup>95</sup> Hoy en día siguen vigentes y son utilizados para el estudio de sistemas atómicos de gran porte (cientos de miles de átomos), los cuales quedan fuera del alcance de métodos cuánticos aun considerando el avance exponencial en la capacidad de cálculo.

Basados en la aproximación de Born-Oppenheimer,<sup>96</sup> los métodos de mecánica molecular desestiman la presencia de los electrones y calculan la energía del sistema en función de la posición de sus núcleos. La función de energía potencial recibe el nombre de campo de fuerzas ya que su gradiente permite obtener las fuerzas que actúan sobre cada átomo. En algunas ocasiones el uso de los mismos da respuestas tan precisas como cálculos de mecánica cuántica, sin embargo, debido a su naturaleza, no es posible realizar cálculos de propiedades que dependen de la distribución electrónica en una molécula.

La transferibilidad es un atributo fundamental en un campo de fuerza, ya que permite el desarrollo y la prueba de un conjunto de parámetros en un número limitado de casos que puede aplicarse a un amplio espectro de sistemas.<sup>97</sup>

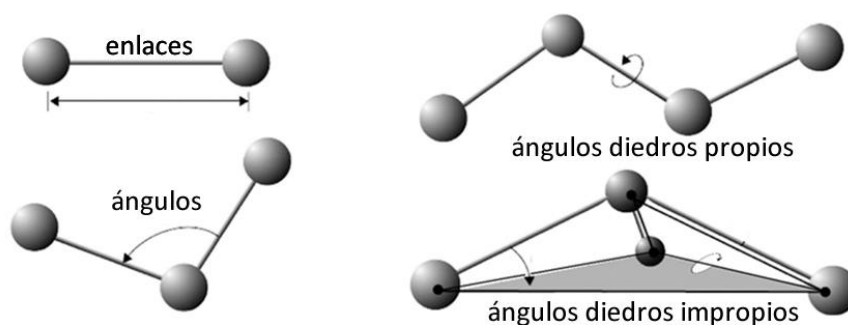


Figura II. 7 – Tipos de contribuciones de unión

Dentro del campo de fuerzas, las interacciones entre los núcleos se agrupan en términos de unión y términos de no unión. Los términos de unión (intramoleculares) describen la interacción entre átomos unidos entre sí, o hasta dos átomos de distancia. Están comprendidos por cuatro tipos de términos: estiramientos de enlaces, flexión angular, variación de los ángulos diedros propios e impropios (ver Figura II. 7). Como se ve en la Figura II. 8, la contribución de las energías de estiramiento y de flexión angular son representadas como osciladores de Hook. Los términos de no unión describen

interacciones entre átomos de la misma molécula, pero distantes entre sí o con átomos extramoleculares. Generalmente se representan considerando la contribución electrostática y de van der Waals. La primera es tomada como interacciones de Coulomb entre cargas puntuales centradas en los átomos. La segunda utiliza generalmente el potencial de Lennard-Jones. Algunos campos de fuerza más sofisticados pueden considerar otras contribuciones, pero todos incluyen las descritas anteriormente.<sup>97, 98</sup>

$$E(r^N) = \underbrace{\sum_{\text{enlaces}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))^2}_{\text{términos de unión}} + \underbrace{\sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)}_{\text{términos de no unión}}$$

Figura II. 8 – Ecuación general de un campo de fuerzas

Debido a la transferibilidad de los campos de fuerza, al estudiar un sistema, no es necesario parametrizar la mayoría de los tipos de átomos que lo componen. En caso de serlo, una estrategia viable para el usuario suele ser tomar como punto de partida juegos de parámetros de grupos o átomos similares. Subsecuentemente, las cargas puntuales pueden ser obtenidas de potenciales electrostáticos derivados de cálculos mecano-cuánticos de alto nivel, utilizando métodos adecuados como CHELPG<sup>99</sup> o RESP<sup>100</sup> y en algunos casos hasta de métodos semiempíricos como AM1-BCC<sup>101</sup>. Es importante notar que el nivel de teoría a utilizar para realizar estos cálculos debe ser el mismo que el utilizado para el desarrollo del juego de parámetros del campo.

Entre los campos de fuerza más utilizados se encuentran: AMBER,<sup>102</sup> CHARMM,<sup>103, 104</sup> GROMOS<sup>105</sup> y OPLS-AA,<sup>106</sup> todos ellos desarrollados por grupos académicos de investigación.

## 6.2 Dinámica Molecular

Como vimos anteriormente la mecánica molecular permite realizar cálculos estáticos de las moléculas como por ejemplo minimizaciones de energía y el estudio de propiedades no dependientes de la distribución electrónica. Sin embargo, no permite estudiar la evolución de un sistema a través del tiempo. Esto nos lleva a la dinámica molecular, este método estudia sucesivas configuraciones del sistema integrando las leyes de movimiento de Newton. La trayectoria es descrita resolviendo la ecuación diferencial correspondiente a la segunda ley de Newton:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{d(mv)}{dt}$$

Donde  $F$  es la fuerza,  $dp/dt$  la derivada del momento lineal en función del tiempo,  $m$  la masa y  $v$  la velocidad.

$$m_i \frac{\partial v_{i,x}}{\partial t} = -\frac{\partial U(R)}{\partial r_{i,x}} \quad m_i \frac{\partial v_{i,y}}{\partial t} = -\frac{\partial U(R)}{\partial r_{i,y}} \quad m_i \frac{\partial v_{i,z}}{\partial t} = -\frac{\partial U(R)}{\partial r_{i,z}}$$

De la fórmula inicial se obtienen  $3N$  (siendo  $N$  el número de partículas del sistema) ecuaciones diferenciales acopladas de primer orden, donde  $x, y$  y  $z$  son las coordenadas espaciales de una partícula dada,  $v$  su velocidad y  $U$  la energía potencial proveniente del campo de fuerzas. Las mismas no pueden ser resueltas de forma exacta, por lo que se debe hacer de forma numérica utilizando un algoritmo de integración adecuado. Además, es necesario contar con las condiciones iniciales del sistema (posiciones y velocidades de cada partícula) y definir las condiciones de borde.

Generalmente se utilizan las coordenadas de la estructura a estudiar como posiciones iniciales. Las velocidades de cada partícula se asignan de forma aleatoria siguiendo una distribución de Maxwell centrada en la temperatura de trabajo y luego se ajusta de manera de igualar a cero el momento angular y la velocidad del centro de masa del sistema.

Es posible simular el sistema en vacío, pero si nos interesa reproducir las propiedades de un disolvente de forma explícita es necesario imponer propiedades de borde. A no ser que nos interese estudiar un sistema confinado en un volumen acotado, se utilizan condiciones de borde periódicas (PBC por sus siglas en inglés). De esta manera, la caja de simulación se encuentra rodeada por un número infinito de copias de sí misma, donde únicamente los  $N$  átomos dentro de la caja principal son considerados explícitamente, pero tan pronto como uno atraviesa una de las paredes de la caja, una partícula imagen ingresa por el lado opuesto como reemplazo. Es importante tener en cuenta que de tratarse de un sistema no periódico podríamos estar introduciendo el efecto artificialmente. Por ello, en estos casos, se debe seleccionar una caja lo suficientemente grande con el fin de evitarlo, así como el empleo de una esfera de corte (*cutoff*) de interacciones entre partículas de radio apropiado.<sup>107</sup>

Como fue expuesto anteriormente no es posible dar una solución exacta a las ecuaciones diferenciales planteadas. Por ello es necesario resolverlas de forma numérica. La trayectoria debe ser representada de forma discreta y con la ayuda de un algoritmo integrador avanzar de a pequeños tramos de tiempo, lo que comúnmente se conoce por *time step* ( $\Delta t$ ). Es deseable que el integrador posea: buena estabilidad si se utilizan  $\Delta t$  grandes, buena precisión, buena conservación de energía y momento, reversibilidad temporal y conservación del volumen del espacio de fases, y a su vez, no requiera más de un ciclo para evaluar las fuerzas por *time step*. Una discusión más amplia sobre los diferentes algoritmos se puede encontrar en <sup>108</sup>.

Hay diferentes tipos de ensambles termodinámicos que pueden ser utilizados durante las simulaciones. Si el volumen ( $V$ ), el número de partículas ( $N$ ) y la energía total de

sistema (E), permanecen constantes estamos ante un ensamble de tipo NVE. Si bien la energía total del sistema es constante, ello no implica que las contribuciones cinética y potencial lo sean, por lo que si no está equilibrado va a tender a estarlo mientras la temperatura varía. Pero si queremos simular ciertos tipos de condiciones experimentales tal vez necesitemos que la temperatura o la presión permanezcan constantes, para ello hay diferentes tipos de termostatos o baróstatos que pueden ser utilizados.<sup>109</sup> El ensamble NVT mantiene la temperatura (T) además del volumen (V) y la cantidad de partículas (N) constantes controlando la energía cinética del sistema de diversas formas. En tanto que el ensamble NPT mantiene tanto presión (P) como temperatura (T) constantes, además del número de partículas (N), mediante el escalado del volumen total a lo largo de la simulación.

### 6.3 Modelado por homología

El modelado por homología tiene como objetivo predecir la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia (el blanco), para lo cual se basa en estructuras de secuencias similares ya conocidas (los moldes). El método se basa en el principio que establece que proteínas homólogas poseen estructuras similares.<sup>110-112</sup> Como prerrequisito es necesaria una similitud entre secuencias de más de un 30% con el fin de asegurar un correcto alineamiento. De esta manera tomando en cuenta características estructurales conocidas de las proteínas homólogas se construye el modelo de la secuencia estudiada.

En primera instancia se realiza una búsqueda de estructuras conocidas que posean secuencias homólogas. En general, BLAST (del inglés: *Basic Local Alignment Search Tool*) es la herramienta de referencia para realizar este tipo de trabajo. Luego se busca el alineamiento óptimo entre las secuencias del blanco y los moldes. Un alineamiento óptimo significa que hay un número considerable de residuos idénticos o positivamente idénticos ocupando las mismas posiciones y únicamente se observan huecos (*gaps*) pequeños entre secuencias. Los residuos son positivamente idénticos cuando poseen propiedades fisicoquímicas similares y por ello pueden ser sustituidos fácilmente. De esta manera se determina el nivel de equivalencia entre una secuencia y otra.<sup>113, 114</sup>

Una vez que se logra/n uno o más alineamientos adecuados, se utiliza la información estructural conocida de las cadenas principales de los moldes para generar la cadena principal del blanco. Existen varias estrategias posibles para lograrlo.<sup>115-117</sup> Una de estas consiste en construirla (de N-terminal a C-terminal) promediando las posiciones de los átomos de las estructuras de los moldes, ponderadas según su similitud a la secuencia blanco. Otros tipos de procedimientos se basan en reglas de espaciado entre átomos, distancias de enlace, ángulos y ángulos diedros derivadas de valores observados en estructuras proteicas conocidas. Esta información se extrae de los moldes en forma de restricciones espaciales. Luego, la estructura del blanco se construye intentando satisfacer las mismas de la mejor manera posible. Aplicando una cantidad suficiente de estas, el número de conformaciones que puede asumir la estructura predicha se reduce

drásticamente. La cantidad de variaciones permitidas entre pares equivalentes de las estructuras homólogas, se puede determinar empleando herramientas de análisis estadístico, expresadas por ejemplo como funciones cuadráticas o sumas ponderadas de funciones Gaussianas entre otras.<sup>118</sup>

Para las regiones de inserciones o eliminaciones, que corresponden a los *gaps* en el alineamiento, no se puede derivar información estructural de los moldes.<sup>119</sup> Estos pueden ser rellenados con lazos (*loops*) compatibles, obtenidos en bibliotecas de fragmentos derivadas de estructuras experimentales. Así como también pueden ser generados construyendo fragmentos que sean compatibles con los residuos colindantes y que son evaluados por medio de una función de puntuación. Estas tienen en cuenta parámetros como la energía conformacional, el impedimento estérico e interacciones favorables.

Luego de completar la cadena principal se insertan las cadenas laterales. Sus conformaciones se originan a partir de las posiciones ponderadas de los residuos correspondientes de las estructuras de los moldes, contemplando a su vez consideraciones estéricas. Las mismas se construyen por reemplazo isoestérico de sus homólogas en los moldes, comenzando por los residuos conservados. Las posibles conformaciones se obtienen de una biblioteca de rotámeros dependientes de la cadena principal. Para seleccionar las conformaciones más probables, se utilizan funciones de puntuación que dependen de interacciones favorables como ser enlaces de hidrógeno y puentes disulfuro, así como también de desfavorables como por ejemplo impedimento estérico.

Debido al modelado rígido pueden ocurrir ciertos tipos de distorsiones estructurales: choques atómicos, impedimentos estéricos, enlaces estirados y ángulos desfavorables son algunos de ellos. Con el fin de subsanarlas se realiza una optimización de la estructura del modelo mediante una minimización energética, logrando así una conformación estable. Generalmente se utilizan métodos de mecánica molecular en las que la energía del sistema es descrita mediante un campo de fuerzas basado en mecánica clásica.<sup>120, 121</sup>

Por último, la calidad del modelo es evaluada comparando su geometría con la de estructuras conocidas de alta resolución. Su bondad se estima según parámetros estereoquímicos tales como: distancias de enlace, ángulos, ángulos diedros y planaridad. Estos permiten estimar que tan realista es la estructura obtenida. Si la misma es aceptable el estudio concluye. Si no lo es, se vuelve a realizar el procedimiento ajustando los parámetros, como por ejemplo una optimización del alineamiento de secuencias adicional.



## 6.4 Docking Molecular

El objetivo del *docking* molecular es entender y predecir las bases del reconocimiento molecular, tanto estructuralmente (encontrando los modos de interacción más probables), como energéticamente (prediciendo la afinidad de unión). Generalmente los sujetos de estudio son una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula objetivo (receptor). Con un grado sustancial de precisión, el *docking* molecular es capaz de predecir la correcta conformación y ubicación de los ligandos en el sitio de unión a los receptores propuestos.<sup>122</sup> Tras el desarrollo de los primeros algoritmos en la década de los ochenta, se ha convertido en una herramienta esencial para el descubrimiento de nuevos fármacos,<sup>123</sup> pudiendo describir las interacciones intermoleculares que estabilizan los complejos ligando-receptor, así como también realizar predicciones cuantitativas de las energías de unión de los mismos lo cual permite la categorización relativa entre distintos ligandos.<sup>122, 123</sup>

La identificación de la conformación de interacción más probable consta de dos etapas. La primera es la exploración de un amplio espacio de conformaciones donde se ven representados un conjunto de modos de interacción probables. La segunda es la correcta predicción de la energía de unión asociada a dichos modos.<sup>124</sup> Estas etapas son aplicadas en un proceso cíclico en el que cada conformación del ligando es evaluada mediante funciones de puntuación (*scoring*) específicas. Este proceso se lleva a cabo recursivamente hasta converger a una solución de energía mínima.<sup>124-126</sup>

Para realizar las búsquedas conformacionales se pueden utilizar tanto métodos sistemáticos como estocásticos. En ambos casos se modifican incrementalmente los parámetros estructurales de los ligandos tales como los grados de libertad torsionales, traslacionales y rotacionales.<sup>126, 127</sup>

Los métodos sistemáticos de búsqueda realizan pequeñas variaciones de los parámetros estructurales, modificando así gradualmente la conformación de los ligandos.<sup>128</sup> Esta clase de algoritmos sondan la hiperficie potencial del espacio conformacional y luego de numerosos ciclos de búsqueda y evaluación convergen a una solución de mínima energía correspondiente al modo de unión más probable. Sin embargo, este mínimo puede ser de carácter local y no global. Esto se puede mitigar hasta cierto punto, realizando varias búsquedas simultáneas que comiencen desde diferentes conformaciones.<sup>129</sup> Otro inconveniente que pueden sufrir este tipo de algoritmos es la llamada explosión combinatoria, esto se debe a que con el aumento de los grados de libertad de los ligandos, el número de combinaciones posibles crece exponencialmente complejizando así el problema.<sup>128</sup> Una forma de lidiar con este inconveniente es utilizando algoritmos que implementen un método de construcción incremental de los ligandos en el sitio activo.<sup>130-133</sup>

Los métodos estocásticos realizan la búsqueda conformacional modificando aleatoriamente los parámetros estructurales de los ligandos.<sup>134</sup> Los algoritmos generan conjuntos de conformaciones que abarcan ampliamente la hiperficie potencial. Esto



evita que el resultado final sea producto de la oscilación en torno a un mínimo local y aumenta la probabilidad de hallar el mínimo global. El principal inconveniente de este tipo de algoritmos es su costo computacional. Esto puede mitigarse parcialmente, por ejemplo, utilizando estrategias de búsqueda que implementen algoritmos genéticos. En primera instancia, los parámetros estructurales de la conformación inicial del ligando son codificados en un “cromosoma” representado por un vector. Partiendo del mismo se genera una población inicial aleatoria que abarca un amplio rango de la hiperficie energética. Estos nuevos “cromosomas” son evaluados y los más adaptados (es decir, aquellas conformaciones de menor energía) son seleccionados como base para formar la siguiente generación. Este procedimiento disminuye la energía promedio del conjunto de “cromosomas” transmitiendo características estructurales favorables de una población a otra, reduciendo, por lo tanto, el espacio conformacional que se explorará. La rutina se ejecuta recursivamente y generación tras generación se va aproximando a un “cromosoma” que correspondería con el mínimo global de energía.<sup>135-138</sup>

Por otro lado los datos estructurales de los receptores (y su calidad) son de vital importancia. Por ello, se recurre al uso de estructuras tridimensionales resueltas por medio de estudios cristalográficos de difracción de rayos X, así como por resonancia magnética nuclear (RMN) y en algunos casos a modelos homológicos computacionales.<sup>125, 139-142</sup>

Finalmente, con el objetivo de estimar las energías de unión de los distintos complejos ligando-receptor predichos, se utilizan diferentes tipos de funciones de *scoring*. La variación energética debida a la formación de los mismos, queda determinada por la constante de unión ( $K_d$ ) y la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_L$ ).<sup>143</sup> Para lograr una correcta estimación, es necesario evaluar los principales fenómenos fisicoquímicos involucrados en la formación de los diferentes complejos, como ser, interacciones intermoleculares y efectos entrópicos y de desolvatación.<sup>144</sup> Es así, que al evaluar un mayor número de estos parámetros, mayor es la precisión de la función de *score*. Sin embargo, el costo computacional aumenta proporcionalmente a la cantidad de variables incluidas y disminuye la productividad de los algoritmos. Idealmente, las funciones de *score* deben mantener un balance entre precisión y velocidad, lo cual es crucial al momento de trabajar con grandes bases de datos de ligandos.

Las funciones de *score* pueden ser catalogadas dentro de tres grandes grupos, estos son: las basadas en campos de fuerza, las empíricas y las funciones basadas en conocimiento.<sup>145</sup> Las basadas en campos de fuerza estiman la energía de unión por medio de una función donde se suman las contribuciones de átomos enlazados (estiramiento de enlaces, flexión de ángulos y deformaciones de ángulos torsionales) y no enlazados (interacciones de Van der Waals y electrostáticas). Este tipo de funciones de *score* utilizan métodos *ab initio* (a primeros principios) para calcular las energías relacionadas con cada uno de los términos a partir de ecuaciones derivadas de la mecánica clásica.<sup>146</sup> Una limitación muy importante de las funciones basadas en campos

de fuerza es la dificultad de estimar las contribuciones debidas a cambios entrópicos. Esto se debe a que no existe un modelo físico apropiado para describir este tipo de fenómenos. Otro inconveniente es que el disolvente no es considerado de forma explícita, dificultando así la determinación de las energías asociadas a los efectos de desolvatación.<sup>147</sup>

Las funciones de *score* empíricas son otra forma de evaluación de la energía de unión. Cada término representa un tipo de evento físico involucrado en la formación del complejo ligando-receptor. Como ser: enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas y apolares y efectos entrópicos y de desolvatación.<sup>148</sup> Para desarrollar este tipo de funciones, en primera instancia, se realiza un análisis de regresión lineal múltiple, para el cual se emplean una serie de complejos ligando-receptor con afinidades de unión conocidas como conjunto de entrenamiento. Luego, las constantes ponderadas devueltas por el modelo son utilizadas como coeficientes para ajustar los términos de la ecuación. Un inconveniente de este tipo de métodos es la dependencia que presentan con los datos utilizados para generarlos. Sin embargo, dada la simplicidad de los términos empleados para su cálculo, este tipo de funciones son más rápidas que las basadas en campos de fuerzas.<sup>149</sup>

Por último, otra estrategia para evaluar la energía de unión de los complejos ligando-receptor, son las funciones de *score* basadas en conocimiento. Este método utiliza potenciales apareados extraídos de complejos conocidos para establecer una función general que utilizará para los cálculos.<sup>150</sup> Estos potenciales se construyen teniendo en cuenta la frecuencia con que dos átomos se encuentran a cierta distancia en un conjunto de datos estructurales. Los diferentes tipos de interacciones se clasifican y se ponderan también de acuerdo con su frecuencia de ocurrencia. El *score* final se da como una suma de estas interacciones individuales. Dado que este tipo de funciones no se basan en reproducir afinidades de unión (como los métodos empíricos) o en cálculos *ab initio* (como los métodos basados en campos de fuerzas), ofrecen un equilibrio adecuado entre precisión y velocidad.<sup>138, 151</sup>

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Fleming, A.; Chain, E.; Florey, H., Sir Alexander Fleming-Nobel Lecture: Penicillin. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html) **1945**.
2. Organization, W. H., *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization: 2014.
3. Silver, L. L., Challenges of antibacterial discovery. *Clinical microbiology reviews* **2011**, 24, 71-109.
4. Vazquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; T., C.; Dominguez-Bernal, G.; Goebel, W.; Gonzalez-Zorn, B.; Wehland, J.; Kreft, J., *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 584-640.
5. Gao, Z.; Li, H.; Zhang, H.; Liu, X.; Kang, L.; Luo, X.; Zhu, W.; Wang, X.; Jiang, H., PDTD: a web-accessible protein database for drug target identification. *BMC Bioinformatics* **2008**, 9, 104-111.
6. AbdulHameed, M. D. M.; Chaudhury, S.; Singh, N.; Sun, H.; Wallqvist, A.; Tawa, G. J., Exploring Polypharmacology Using a ROCS-Based Target Fishing Approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 492-505.
7. Nettles, J. H.; Jenkins, J. L.; Bende, A.; Deng, Z.; Davies, J. W.; Glick, M., Bridging Chemical and Biological Space: "Target Fishing" Using 2D and 3D Molecular Descriptors. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6802-6810.
8. Chen, Y. Z.; Zhi, D. G., Ligand-protein inverse docking and its potential use in the computer search of protein targets of a small molecule. *Proteins* **2001**, 43, 217-226.
9. Paul, N.; Kellenberger, E.; Bret, G.; Muller, P.; Rognan, D., Recovering the true targets of specific ligands by virtual screening of the protein data bank. *Proteins* **2004**, 54, 671-680.
10. Li, H.; Gao, Z.; Kang, L.; Zhang, H.; Yang, K.; Yu, K.; Luo, X.; Zhu, W.; Chen, K.; Shen, J.; Wang, X.; Jiang, H., TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, W209-W224.
11. Muller, P.; Lena, G.; Boilard, E.; Bezzine, S.; Lambeau, G.; Guichard, G.; Rognan, D., *In Silico*-Guided Target Identification of a Scaffold-Focused Library: 1,3,5-Triazepan-2,6-diones as Novel Phospholipase A2 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6768-6778.
12. Jenkins, J. L.; Bender, A.; Davies, J. W., *In silico* target fishing: Predicting biological targets from chemical structure. *Drug Discovery Today* **2006**, 3, 413-420.
13. Chen, Y. Z.; Ung, C. Y., Prediction of Potential Toxicity and Side Effect Protein Targets of a Small Molecule by a Ligand-Protein Inverse Docking Approach. *J. Mol. Graph. Mod.* **2001**, 20, 199-218.

14. Cai, J.; Han, C.; Hu, T.; Zhang, J.; Wu, D.; Wang, F.; Liu, Y.; Ding, J.; Chen, K.; Yue, J.; Shen, X.; Jiang, H., Peptide deformylase is a potential target for anti-*Helicobacter pylori* drugs: Reverse docking, enzymatic assay, and x-ray crystallography validation. *Protein Sci.* **2009**, *15*, 2071-2081.
15. Chen, Y. Z.; Ung, C. Y., Computer Automated Prediction of Putative Therapeutic and Toxicity Protein Targets of Bioactive Compounds from Chinese Medicinal Plants. *Am. J. Chin. Med.* **2002**, *30*, 139-154.
16. Hui-fang, L.; Qing, S.; Jian, Z.; Wei, F., Evaluation of various inverse docking schemes in multiple targets identificati. *J. Mol. Graph. Mod.* **2010**, *29*, 326-330.
17. Lauro, G.; Masullo, M.; Piacente, S.; Riccio, R.; Bifulco, G., Inverse Virtual Screening allows the discovery of the biological activity of natural compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3596-3602.
18. Calvaresi, M.; Zerbetto, F., In Silico Carborane Docking to Proteins and Potential Drug Targets. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1882-1896.
19. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.
20. Manzano, C.; Izoré, T.; Job, V.; Di Guilmi, A. M.; Dessen, A., Sortase Activity Is Controlled by a Flexible Lid in the Pilus Biogenesis Mechanism of Gram-Positive Pathogens. *Biochemistry* **2009**, *48*, 10549-10557.
21. Melvin, J. A.; Murphy, C. F.; Dubois, L. G.; Thompson, J. W.; Moseley, M. A.; McCafferty, D. G., *Staphylococcus aureus* Sortase A Contributes to the Trojan Horse Mechanism of Immune Defense Evasion with Its Intrinsic Resistance to Cys184 Oxidation. *Biochemistry* **2011**, *50*, 7591-7599.
22. Paterson, G. K.; Mitchell, T. J., The biology of Gram-positive sortase enzymes. *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 89-95.
23. Yamaguchi, M.; Terao, Y.; Ogawa, T.; Takahashi, T.; Hamada, S.; Kawabata, S., Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes and Infection* **2006**, *8*, 2791-2796.
24. Cossart, P.; Jonquieres, R., Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 5013-5015.
25. Marraffini, L. A.; DeDent, A. C.; Schneewind, O., Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 192-221.
26. Mazmanian, S. K.; Liu, G.; Hung, T. T.; Schneewind, O., *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **1999**, *285*, 760-763.

27. Ton-That, H.; Liu, G.; Mazmanian, S. K.; Faull, K. F.; Schneewind, O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 12424-12429.
28. Tian, B.; Eriksson, L. A., Catalytic Mechanism and Roles of Arg197 and Thr183 in the *Staphylococcus aureus* Sortase A Enzyme. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 13003-13011.
29. Mazmanian, S. K.; Liu, G.; Jensen, E. R.; Lenoy, E.; Schneewind, O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 5510-5515.
30. Bierne, H.; Mazmanian, S. K.; Trost, M.; Pucciarelli, M. G.; Liu, G.; Dehoux, P.; Jänsch, L.; Garcia-del Portillo, F.; Schneewind, O.; Cossart, P., *Mol. Microbiol.* **2002**, 43, 869-881.
31. Tian, B.; Eriksson, L. A., Structural Changes of *Listeria monocytogenes* sortase A: A key to understanding the catalytic mechanism. *Proteins* **2011**, 79, 1564-1572.
32. Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Faull, K. F.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH<sub>2</sub>-Gly(3) substrates. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 9876-9881.
33. Mazmanian, S. K.; Hung, I. T.; Schneewind, O., Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **2001**, 40, 1049-1057.
34. Perry, A. M.; Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—III. Lipid II is an in vivo peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 16241-16248.
35. Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Alksne, L.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 7447-7452.
36. Marraffini, L. A.; Ton-That, H.; Zong, Y. N.; Narayana, S. V. L.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—a conserved arginine residue is required for efficient catalysis of sortase A. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 37763-37770.
37. Frankel, B. A.; Kruger, R. G.; Robinson, D. E.; Kelleher, N. L.; McCafferty, D. G., *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA: insight into the kinetic mechanism and evidence for a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry* **2005**, 44, 11188-11200.
38. Frankel, B. A.; Tong, Y.; Bentley, M. L.; Fitzgerald, M. C.; McCafferty, D. G., Mutational analysis of active site residues in the *Staphylococcus aureus* transpeptidase SrtA. *Biochemistry* **2007**, 46, 7269-7278.

39. Bentley, M. L.; Lamb, E. C.; McCafferty, D. G., Mutagenesis studies of substrate recognition and catalysis in the sortase A transpeptidase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 14762-14771.
40. Maresso, A. W.; Schneewind, O., Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacol. Rev.* **2008**, 60, 128-141.
41. Sure, N.; Jung, M. E.; Clubb, R. T., Recent advances towards new anti-infective agents that inhibit cell surface protein anchoring in *Staphylococcus aureus* and other gram-positive pathogens. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 991-1000.
42. Kudryavtsev, K. V.; Bentley, M. L.; McCafferty, D. G., Probing of the cis-5-phenyl proline scaffold as a platform for the synthesis of mechanism-based inhibitors of the *Staphylococcus aureus* sortase SrtA isoform. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 2886-2893.
43. Suree, N.; Yi, S. W.; Thieu, W.; Marohn, M.; Damoiseaux, R.; Chan, A.; Jung, M. E.; Clubb, R. T., Discovery and structure-activity relationship analysis of *Staphylococcus aureus* sortase A inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 7174-7185.
44. Chenna, B. C.; Shinkre, B. A.; King, J. R.; Lucius, A. L.; Narayana, S. V. L.; Velu, S. E., Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 380-385.
45. Chenna, B. C.; King, J. R.; Shinkre, B. A.; Glover, A. L.; Lucius, A. L.; Velu, S. E., Synthesis and structure activity relationship studies of novel *Staphylococcus aureus* Sortase A inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 3752-3761.
46. Jang, K. H.; Chung, S.-C.; Shin, J.; Lee, S.-H.; Kim, T.-I.; Lee, H.-S.; Oh, K.-B., Aaptamines as sortase A inhibitors from the tropical sponge *Aaptos aaptos*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5366-5369.
47. Suree, N.; Liew, C. K.; Villareal, V. A.; Thieu, W.; Fadeev, E. A.; Clemens, J. J.; Jung, M. E.; Clubb, R. T., The structure of the *Staphylococcus aureus* sortase-substrate complex reveals how the universally conserved LPXTG sorting signal is recognized. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 24465-24477.
48. Yoneyma, H.; Katsumata, R., Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70, 1060-1075.
49. Collier, R. J., Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* **2001**, 39, 1793-1803.
50. Yates, S. P.; Jørgensen, R.; Andersen, G. R.; Merrill, A. R., Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends in Biochemical Sciences* **2006**, 31, 123-133.
51. Kaczorek, M.; Delpeyroux, F.; Chenciner, N.; Streeck, R.; Murphy; Boquet, P.; Tiollais, P., Nucleotide sequence and expression of the diphtheria tox228 gene in *Escherichia coli*. *Science* **1983**, 221, 855-858.
52. Greenfield, L.; Bjorn, M. J.; Horn, G.; Fong, D.; Buck, G. A.; Collier, R. J.; Kaplan, D. A., Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by

corynebacteriophage beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1983**, 80, 6853-6857.

53. Choe, S.; Bennett, M. J.; Fujii, G.; Curmi, P. M. G.; Kantardjieff, K. A.; Collier, R. J.; Eisenberg, D., The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **1992**, 357, 216-222.

54. Gillet, D.; Barbier, J. 4 - Diphtheria toxin A2 - Alouf, Joseph. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)*, Ladant, D.; Popoff, M. R., Eds.; Academic Press: Boston, 2015, pp 111-132.

55. Sandvig, K.; Olsnes, S., Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *The Journal of Cell Biology* **1980**, 87, 828-832.

56. Morris, R.; Gerstein, A.; Bonventre, P.; Saelinger, C., Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infection and immunity* **1985**, 50, 721-727.

57. Blewitt, M. G.; Chung, L. A.; London, E., Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its implications for membrane penetration. *Biochemistry* **1985**, 24, 5458-5464.

58. Naglich, J. G.; Eidels, L., Isolation of diphtheria toxin-sensitive mouse cells from a toxin-resistant population transfected with monkey DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, 87, 7250-7254.

59. Moskaug, J.; Stenmark, H.; Olsnes, S., Insertion of diphtheria toxin B-fragment into the plasma membrane at low pH. Characterization and topology of inserted regions. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 2652-2659.

60. Naglich, J. G.; Metherall, J. E.; Russell, D. W.; Eidels, L., Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* **1992**, 69, 1051-1061.

61. Chenal, A.; Savarin, P.; Nizard, P.; Guillain, F.; Gillet, D.; Forge, V., Membrane Protein Insertion Regulated by Bringing Electrostatic and Hydrophobic Interactions into Play A CASE STUDY WITH THE TRANSLOCATION DOMAIN OF THE DIPHTHERIA TOXIN. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 43425-43432.

62. Collier, R., Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors. *Journal of molecular biology* **1967**, 25, 83-98.

63. Honjo, T.; Nishizuka, Y.; Hayaishi, O.; Kato, I., Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **1968**, 243, 3553-3555.

64. Collier, R.; Cole, H. A., Diphtheria Toxin Submit Active in vitro. *Science* **1969**, 164, 1179-1182.

65. Van Ness, B. G.; Howard, J. B.; Bodley, J. W., ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, 255, 10717-10720.



66. Van Ness, B. G.; Howard, J. B.; Bodley, J. W., ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. NMR spectra and proposed structures of ribosyl-diphthamide and its hydrolysis products. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, 255, 10710-10716.
67. Yamaizumi, M.; Mekada, E.; Uchida, T.; Okada, Y., One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **1978**, 15, 245-250.
68. Kandel, J.; Collier, R. J.; Chung, D. W., Interaction of fragment A from diphtheria toxin with nicotinamide adenine dinucleotide. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, 249, 2088-2097.
69. Andersen, G. R.; Nissen, P.; Nyborg, J., Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in biochemical sciences* **2003**, 28, 434-441.
70. Ortiz, P. A.; Ulloque, R.; Kihara, G. K.; Zheng, H.; Kinzy, T. G., Translation elongation factor 2 anticodon mimicry domain mutants affect fidelity and diphtheria toxin resistance. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 32639-32648.
71. Liu, S.; Bachran, C.; Gupta, P.; Miller-Randolph, S.; Wang, H.; Crown, D.; Zhang, Y.; Wein, A. N.; Singh, R.; Fattah, R., Diphthamide modification on eukaryotic elongation factor 2 is needed to assure fidelity of mRNA translation and mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, 109, 13817-13822.
72. Liu, S.; Milne, G. T.; Kuremsky, J. G.; Fink, G. R.; Leppla, S. H., Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins on translation elongation factor 2. *Molecular and Cellular Biology* **2004**, 24, 9487-9497.
73. Uthman, S.; Liu, S.; Giorgini, F.; Stark, M. J.; Costanzo, M.; Schaffrath, R. Diphtheria disease and genes involved in formation of diphthamide, key effector of the diphtheria toxin. In *Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario*; InTech: 2012.
74. Su, X.; Chen, W.; Lee, W.; Jiang, H.; Zhang, S.; Lin, H., YBR246W is required for the third step of diphthamide biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 134, 773-776.
75. Su, X.; Lin, Z.; Chen, W.; Jiang, H.; Zhang, S.; Lin, H., Chemogenomic approach identified yeast YLR143W as diphthamide synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, 109, 19983-19987.
76. Uthman, S.; Bär, C.; Scheidt, V.; Liu, S.; ten Have, S.; Giorgini, F.; Stark, M. J.; Schaffrath, R., The amidation step of diphthamide biosynthesis in yeast requires DPH6, a gene identified through mining the DPH1-DPH5 interaction network. *PLoS genetics* **2013**, 9, e1003334.
77. Zhang, Y.; Zhu, X.; Torelli, A. T.; Lee, M.; Dzikovski, B.; Koralewski, R. M.; Wang, E.; Freed, J.; Krebs, C.; Ealick, S. E., Diphthamide biosynthesis requires an organic radical generated by an iron-sulphur enzyme. *Nature* **2010**, 465, 891.



78. Zhu, X.; Dzikovski, B.; Su, X.; Torelli, A. T.; Zhang, Y.; Ealick, S. E.; Freed, J. H.; Lin, H., Mechanistic understanding of *Pyrococcus horikoshii* Dph2, a [4Fe–4S] enzyme required for diphthamide biosynthesis. *Molecular BioSystems* **2011**, *7*, 74-81.
79. Liu, S.; Wiggins, J. F.; Sreenath, T.; Kulkarni, A. B.; Ward, J. M.; Leppla, S. H., Dph3, a small protein required for diphthamide biosynthesis, is essential in mouse development. *Molecular and cellular biology* **2006**, *26*, 3835-3841.
80. Lin, Z.; Su, X.; Chen, W.; Ci, B.; Zhang, S.; Lin, H., Dph7 catalyzes a previously unknown demethylation step in diphthamide biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 6179-6182.
81. Schaffrath, R.; Abdel-Fattah, W.; Klassen, R.; Stark, M. J. R., The diphthamide modification pathway from *Saccharomyces cerevisiae*—revisited. *Molecular microbiology* **2014**, *94*, 1213-1226.
82. Schaffrath, R.; Stark, M. J., Decoding the biosynthesis and function of diphthamide, an enigmatic modification of translation. *Microbial Cell* **2014**, *1*, 203.
83. Abdel-Fattah, W.; Scheidt, V.; Uthman, S.; Stark, M. J.; Schaffrath, R., Insights into diphthamide, key diphtheria toxin effector. *Toxins* **2013**, *5*, 958-968.
84. Moehring, J. M.; Moehring, T. J., The post-translational trimethylation of diphthamide studied in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 3840-3844.
85. Billod, J.-M.; Saenz-Mendez, P.; Blomberg, A.; Eriksson, L. A., Structures, Properties, and Dynamics of Intermediates in eEF2-Diphthamide Biosynthesis. *Journal of chemical information and modeling* **2016**, *56*, 1776-1786.
86. Foley, B. T.; Moehring, J. M.; Moehring, T. J., Mutations in the Elongation Factor 2 Gene Which Confer Resistance to Diphtheria Toxin and Pseudomonas Exotoxin A GENETIC AND BIOCHEMICAL ANALYSES. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 23218-23225.
87. Beattie, B. K.; Merrill, A. R., In vitro enzyme activation and folded stability of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its C-terminal peptide. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9042-9051.
88. Armstrong, S.; Merrill, A. R., Toward the elucidation of the catalytic mechanism of the mono-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemistry* **2004**, *43*, 183-194.
89. Oppenheimer, N.; Bodley, J., Diphtheria toxin. Site and configuration of ADP-ribosylation of diphthamide in elongation factor 2. *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 8579-8581.
90. Iglewski, B. H.; Liu, P. V.; Kabat, D., Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. *Infection and immunity* **1977**, *15*, 138-144.

91. Jorgensen, R.; Merrill, A. R.; Yates, S. P.; Marquez, V. E.; Schwan, A. L.; Boesen, T.; Andersen, G. R., Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry. *Nature* **2005**, 436, 979-84.
92. Parikh, S. L.; Schramm, V. L., Transition state structure for ADP-ribosylation of eukaryotic elongation factor 2 catalyzed by diphtheria toxin. *Biochemistry* **2004**, 43, 1204-1212.
93. Moehring, T. J.; Danley, D. E.; Moehring, J. M., In vitro biosynthesis of diphthamide, studied with mutant Chinese hamster ovary cells resistant to diphtheria toxin. *Molecular and cellular biology* **1984**, 4, 642-650.
94. Chen, J.; Bodley, J., Biosynthesis of diphthamide in *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and characterization of a specific S-adenosylmethionine: elongation factor 2 methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 11692-11696.
95. Gavezzotti, A., *Molecular aggregation: structure analysis and molecular simulation of crystals and liquids*. OUP Oxford: 2007; Vol. 19.
96. Goodisman, J.; Colgate, S. O., Diatomic Interaction Potential Theory: Vol. 1, Fundamentals; Vol. 2, Applications. *Physics Today* **1974**, 27, 47.
97. Leach, A. R., *Molecular modelling: principles and applications*. Pearson education: 2001.
98. Vanommeslaeghe, K.; Guvench, O., Molecular mechanics. *Current pharmaceutical design* **2014**, 20, 3281-3292.
99. Breneman, C. M.; Wiberg, K. B., Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *Journal of Computational Chemistry* **1990**, 11, 361-373.
100. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A., A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, 97, 10269-10280.
101. Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I., Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of computational chemistry* **2002**, 23, 1623-1641.
102. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A., A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 5179-5197.
103. Best, R. B.; Zhu, X.; Shim, J.; Lopes, P. E.; Mittal, J.; Feig, M.; MacKerell Jr, A. D., Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and side-chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  dihedral angles. *Journal of chemical theory and computation* **2012**, 8, 3257-3273.

104. MacKerell Jr, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack Jr, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S., All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry B* **1998**, 102, 3586-3616.
105. Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F., A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of computational chemistry* **2004**, 25, 1656-1676.
106. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J., Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 11225-11236.
107. González, M., Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique* **2011**, 12, 169-200.
108. Berendsen, H.; Van Gunsteren, W., Practical algorithms for dynamic simulations. *Molecular-dynamics simulation of statistical-mechanical systems* **1986**, 43-65.
109. Hünenberger, P. H. Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations. In *Advanced computer simulation*; Springer: 2005, pp 105-149.
110. Xu, D.; Xu, Y.; Uberbacher, C., Computational tools for protein modeling. *Current Protein and Peptide Science* **2000**, 1, 1-21.
111. Johnson, M. S.; Srinivasan, N.; Sowdhamini, R.; Blundell, T. L., Knowledge-based protein modeling. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **1994**, 29, 1-68.
112. Schwede, T.; Diemand, A.; Guex, N.; Peitsch, M. C., Protein structure computing in the genomic era. *Research in Microbiology* **2000**, 151, 107-112.
113. Dalton, J. A.; Jackson, R. M., An evaluation of automated homology modelling methods at low target-template sequence similarity. *Bioinformatics* **2007**, 23, 1901-1908.
114. Wallner, B.; Elofsson, A., All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs. *Protein Science* **2005**, 14, 1315-1327.
115. Šali, A.; Blundell, T. L., Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of molecular biology* **1993**, 234, 779-815.
116. Sanchez, R.; Šali, A., Advances in comparative protein-structure modelling. *Current opinion in structural biology* **1997**, 7, 206-214.
117. Peitsch, M. C. Large Scale Protein Modeling and Model Repository. In *Ismb*, 1997; 1997; pp 234-236.
118. Wiltgen, M.; Tilz, G. P., Homology modelling: a review about the method on hand of the diabetic antigen GAD 65 structure prediction. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **2009**, 159, 112-125.

119. Fiser, A.; Do, R. K. G., Modeling of loops in protein structures. *Protein science* **2000**, 9, 1753-1773.
120. Guvench, O.; MacKerell, A. D. Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. In *Molecular modeling of proteins*; Springer: 2008, pp 63-88.
121. Li, Z.; Yu, H.; Zhuang, W.; Mukamel, S., Geometry and excitation energy fluctuations of NMA in aqueous solution with CHARMM, AMBER, OPLS, and GROMOS force fields: implications for protein ultraviolet spectra simulation. *Chemical physics letters* **2008**, 452, 78-83.
122. Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M., Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design* **2011**, 7, 146-157.
123. López-Vallejo, F.; Caulfield, T.; Martínez-Mayorga, K.; A Giulianotti, M.; Nefzi, A.; A Houghten, R.; L Medina-Franco, J., Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **2011**, 14, 475-487.
124. Kapetanovic, I., Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chemico-biological interactions* **2008**, 171, 165-176.
125. Shoichet, B. K.; McGovern, S. L.; Wei, B.; Irwin, J. J., Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, 6, 439-446.
126. Yuriev, E.; Agostino, M.; Ramsland, P. A., Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *Journal of Molecular Recognition* **2011**, 24, 149-164.
127. Agrafiotis, D. K.; Gibbs, A. C.; Zhu, F.; Izrailev, S.; Martin, E., Conformational sampling of bioactive molecules: a comparative study. *Journal of chemical information and modeling* **2007**, 47, 1067-1086.
128. Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Protein–ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2006**, 65, 15-26.
129. Zsoldos, Z.; Reid, D.; Simon, A.; Sadjad, S. B.; Johnson, A. P., eHiTS: a new fast, exhaustive flexible ligand docking system. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2007**, 26, 198-212.
130. McGann, M., FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *Journal of computer-aided molecular design* **2012**, 26, 897-906.
131. Jain, A. N., Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, 46, 499-511.
132. Ewing, T. J.; Makino, S.; Skillman, A. G.; Kuntz, I. D., DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of computer-aided molecular design* **2001**, 15, 411-428.

133. Dias, R.; de Azevedo, J.; Walter, F., Molecular docking algorithms. *Current Drug Targets* **2008**, 9, 1040-1047.
134. Gorelik, B.; Goldblum, A., High quality binding modes in docking ligands to proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2008**, 71, 1373-1386.
135. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Huey, R.; Olson, A. J., Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *Journal of computer-aided molecular design* **1996**, 10, 293-304.
136. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of molecular biology* **1997**, 267, 727-748.
137. Krovat, E.; Steindl, T.; Langer, T., Recent advances in docking and scoring. *Current Computer-Aided Drug Design* **2005**, 1, 93-102.
138. Ferreira, L. G.; dos Santos, R. N.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D., Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **2015**, 20, 13384-13421.
139. Mandal, S.; Moudgil, M. n.; Mandal, S. K., Rational drug design. *European journal of pharmacology* **2009**, 625, 90-100.
140. de Graaf, C.; Oostenbrink, C.; Keizers, P. H.; van der Wijst, T.; Jongejan, A.; Vermeulen, N. P., Catalytic site prediction and virtual screening of cytochrome P450 2D6 substrates by consideration of water and rescoring in automated docking. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, 49, 2417-2430.
141. Evers, A.; Klabunde, T., Structure-based drug discovery using GPCR homology modeling: successful virtual screening for antagonists of the alpha1A adrenergic receptor. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, 48, 1088-1097.
142. Diller, D. J.; Li, R., Kinases, homology models, and high throughput docking. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, 46, 4638-4647.
143. Foloppe, N.; Hubbard, R., Towards predictive ligand design with free-energy based computational methods? *Current medicinal chemistry* **2006**, 13, 3583-3608.
144. Jain, A. N., Scoring functions for protein-ligand docking. *Current Protein and Peptide Science* **2006**, 7, 407-420.
145. Huang, S.-Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X., Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12, 12899-12908.
146. Englebienne, P.; Moitessier, N., Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 5. Force-field-based prediction of binding affinities of ligands to proteins. *Journal of chemical information and modeling* **2009**, 49, 2564-2571.
147. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery* **2004**, 3, 935.

148. Murray, C. W.; Auton, T. R.; Eldridge, M. D., Empirical scoring functions. II. The testing of an empirical scoring function for the prediction of ligand-receptor binding affinities and the use of Bayesian regression to improve the quality of the model. *Journal of computer-aided molecular design* **1998**, 12, 503-519.

149. Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P., Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of computer-aided molecular design* **1997**, 11, 425-445.

150. Huang, S. Y.; Zou, X., An iterative knowledge-based scoring function to predict protein–ligand interactions: I. Derivation of interaction potentials. *Journal of computational chemistry* **2006**, 27, 1866-1875.

151. Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G., Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions<sup>1</sup>. *Journal of molecular biology* **2000**, 295, 337-356.

---

# CAPÍTULO III

---

## OBJETIVOS





## OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis es el diseño computacional de nuevas estrategias para el desarrollo de compuestos que actúen como inhibidores de factores de virulencia bacterianos, en particular Sortasa A y Toxina Diftérica. Adicionalmente se propone explorar nuevos blancos biológicos para los potenciales agentes antimicrobianos diseñados.

Con este fin, se plantean diferentes objetivos particulares:

- a) Tamizado virtual de alto rendimiento (*Virtual High-Throughput-Screening*, VHTS) para desarrollar nuevos inhibidores activos contra la enzima SrtA.
- b) Estudio de la interacción entre la toxina diftérica y el factor de elongación eucariótico 2 (eEF2)
- c) Desarrollo de una base de datos de proteínas humanas relevantes que no se quieren afectar (evitar efectos secundarios no deseados por el uso de los agentes antimicrobianos desarrollados)
- d) *Docking* inverso para los compuestos seleccionados contra una base de datos de proteínas empleando diferentes programas computacionales y diferentes aproximaciones, de forma de analizar los blancos de cada compuesto y verificar que no se unen a, o inhiben, enzimas humanas.





---

# CAPÍTULO IV

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 1 CONTENIDO DEL CAPÍTULO

2	TAMIZADO VIRTUAL DE SRTA .....	49
2.1	ESTRUCTURAS DE SRTA .....	49
2.2	BASES DE DATOS DE LIGANDOS.....	49
2.3	RECEPTOR .....	49
2.4	PROCEDIMIENTO DEL TAMIZADO VIRTUAL DE ALTO RENDIMIENTO .....	51
2.5	VHTS EN MOE.....	52
2.6	VHTS EN SCHRÖDINGER .....	54
3	INTERACCIÓN ENTRE DT Y eEF2 .....	58
3.1	ESTRUCTURAS .....	58
3.2	MODELADO POR HOMOLOGÍA .....	59
3.3	SUPERPOSICIÓN DT eEF2.....	62
3.4	PARAMETRIZACIÓN.....	63
3.5	PROCEDIMIENTO DM .....	63
3.6	PRIMERA APROXIMACIÓN AL MODELO DE INTERACCIÓN .....	65
3.7	DM DT-eEF2 (DTA).....	68
3.7.1	ANÁLISIS DE INTERACCIONES .....	69
3.8	DM DT-eEF2 (DTI) .....	72
3.8.1	ANÁLISIS DE INTERACCIONES .....	73
3.9	DM DT-eEF2 (ACP) .....	76
3.9.1	ANÁLISIS DE INTERACCIONES .....	77
3.10	DM DT-eEF2 (HIS).....	80
3.10.1	ANÁLISIS DE INTERACCIONES .....	81
3.11	DM DT (ADP-R/NIC) – eEF2 (DTA) .....	82
4	BASE DE DATOS DE DIANAS BIOLÓGICAS .....	84
5	<i>DOCKING</i> INVERSO .....	84
6	BIBLIOGRAFÍA.....	85



## 2 TAMIZADO VIRTUAL DE SrtA

### 2.1 Estructuras de SrtA

Se realizó una búsqueda de los modelos disponibles de SrtA en RCSB-PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank).<sup>1</sup> Los mismos eran provenientes de *Staphylococcus aureus* (PDB 1T2O, 1T2P, 1T2W, 1IJA, 2KID), *Bacillus anthracis* (PDB 2KW8), *Streptococcus pyogenes* (PDB 3FN5, 3FN6), y *Streptococcus agalactiae* (PDB 3RCC). Estas estructuras fueron preparadas empleando el paquete de software MOE.<sup>2</sup> En los casos en que las estructuras se obtuvieron de estudios de difracción de rayos X, se protonaron considerando los valores de pKa de los diferentes aminoácidos y trabajando a pH fisiológico (pH 7). Finalmente se minimizaron las estructuras y se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular a 300K y con un tiempo de integración de 0,002 ps para relajar cada uno de los sistemas macromoleculares (tiempo de simulación: 10 ns). Cuando las estructuras fueron obtenidas de estudios de resonancia magnética nuclear se controló que la protonación fuese la apropiada para trabajar a pH 7 y luego se procedió a la minimización energética. En todos los casos se utilizó el campo de fuerzas AMBER99<sup>3</sup> y se realizó solvatación explícita mediante cajas de agua periódicas TIP3P incluyendo como contra iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para neutralizar el sistema.

### 2.2 Bases de datos de ligandos

Se utilizaron dos subconjuntos de la base de datos de ligandos ZINC.<sup>4</sup> Los mismos fueron; “Clean fragment-like” (162.278 estructuras al 05/11/2013 cuando fueron descargadas) y “Clean lead-like” (6.914.291 estructuras a la misma fecha de descarga). *Clean* hace referencia a que fueron filtrados de los catálogos de los vendedores todos los compuestos posiblemente problemáticos siguiendo unas series de reglas llamadas “yuck”, estas tienen en cuenta cantidades máximas permitidas de grupos funcionales potencialmente tóxicos. El grupo de moléculas contenidas en “Clean fragment-like” además posee las siguientes características: xlogp (coeficiente de partición octanol/agua calculado a partir de las contribuciones atómicas) menor o igual a 3,5; peso molecular menor o igual a 250 g/mol y cinco o menos enlaces en torno a los cuales puede haber rotación. En tanto que el grupo contenido en “Clean lead-like” cumple: xlogp menor o igual a 3,5; el peso molecular entre 250 y 350 g/mol y siete o menos enlaces susceptibles de rotación. ZINC<sup>4</sup> asegura que todos los compuestos están disponibles en un formato *ready-to-dock* ya que sus conformaciones 3D serían las biológicamente relevantes.

### 2.3 Receptor

De todas las estructuras de SrtA pertenecientes a RCSB-PDB<sup>1</sup> que fueron obtenidas y preparadas centramos nuestros estudios particularmente en una, la 2KID.<sup>5</sup> El archivo



PDB en el que está contenida presenta los 20 confórmeros de menor energía de los 400 obtenidos en el estudio. Dicha estructura fue seleccionada luego de un análisis cuidadoso de cada una de las estructuras existentes de SrtA, por las razones que se detallan a continuación. Esta estructura proviene de *S. aureus* que es la bacteria Gram-positiva más estudiada en este contexto.<sup>6-14</sup> Fue determinada por medio de espectroscopía de RMN, y al haberse obtenido en disolución se tiene una estructura más cercana a la nativa en un medio biológico. Es además la primera de las estructuras de SrtA resueltas que posee el ion metálico  $\text{Ca}^{2+}$ , que, si bien no interviene directamente en los estudios de *docking* molecular, su presencia nos asegura una estructura más refinada de la enzima. Por último y principal, posee un inhibidor análogo peptídico LPAT\* de la señal de reconocimiento LPXTG que forma un complejo unido covalentemente a la enzima (Figura IV. 1-A).

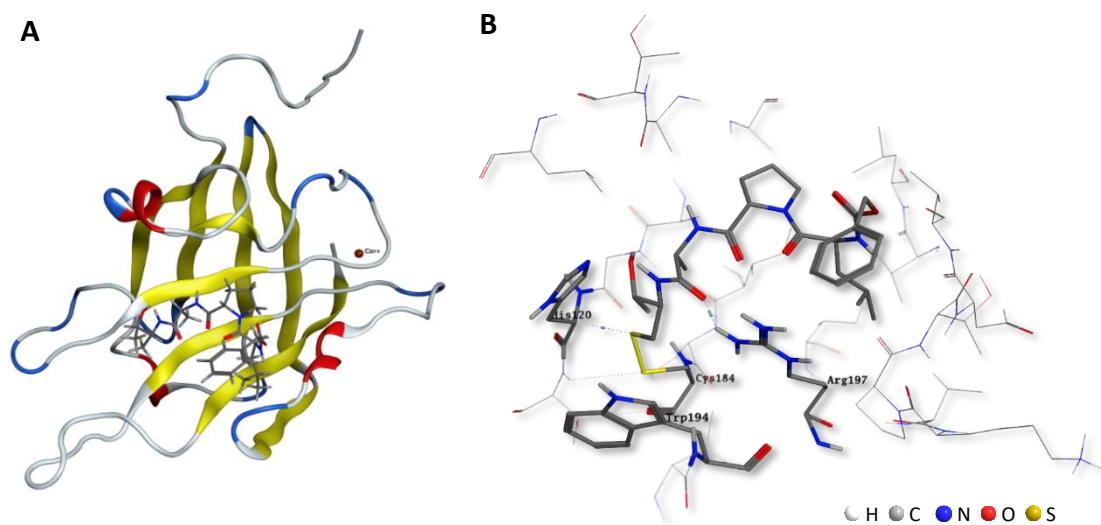


Figura IV. 1 – (A) Estructura de SrtA obtenida mediante RMN (PDB 2KID). Se destaca el inhibidor. (B) Conformación del sitio activo con los principales aminoácidos resaltados y el inhibidor unido covalentemente (PDB 2KID).

Los aminoácidos más relevantes en el sitio activo (Figura IV. 1-B) son: His120, Cys184, Arg197 y Trp194, estos residuos juegan un rol fundamental en la reacción de transpeptidación catalizada por la SrtA. Por lo que la búsqueda de inhibidores se centra en que estos tengan la capacidad de bloquear el tiol de la cadena lateral de la misma. Este tiol es susceptible a la oxidación permitiendo formar puentes disulfuro. Se presume que dicha oxidación podría estar favorecida por la cadena lateral de la His120 que se encuentra muy cercana a él y que a pH fisiológico se encuentra monoprotionada. Es por todas estas razones que se buscan inhibidores que puedan o bien establecer interacciones mediante enlaces de hidrógeno tanto como dadores o aceptores fuertes con dicho tiol, o bien que sean susceptibles de formar puentes disulfuro, así como también tioésteres bloqueando de esta manera la acción de la enzima. Ya que estas últimas son interacciones covalentes, las mismas no están cubiertas en los estudios de *docking* tradicional que utilizan aproximaciones de mecánica molecular. De todas maneras, sí es posible obtener candidatos para luego indagar en la estructura electrónica mediante métodos mecano-cuánticos.



Tomando en cuenta los mecanismos propuestos mencionados en el punto 4.3 del Capítulo II y los posibles estados de protonación del sitio activo de la SrtA es que se realizó el VHTS con dos configuraciones posibles para Cys184 e His120. Estas configuraciones constituyen dos modelos (Figura IV. 2). El Modelo I, en el que tanto Cys184 como His120 se encuentran en los estados de protonación esperados a pH fisiológico, siendo estos tiol e imidazol respectivamente. En tanto que en el Modelo II se contempla el microestado de reacción en el que tanto Cys184 como His120 se encuentran en sus formas ionizadas (tiolato e imidazolio).

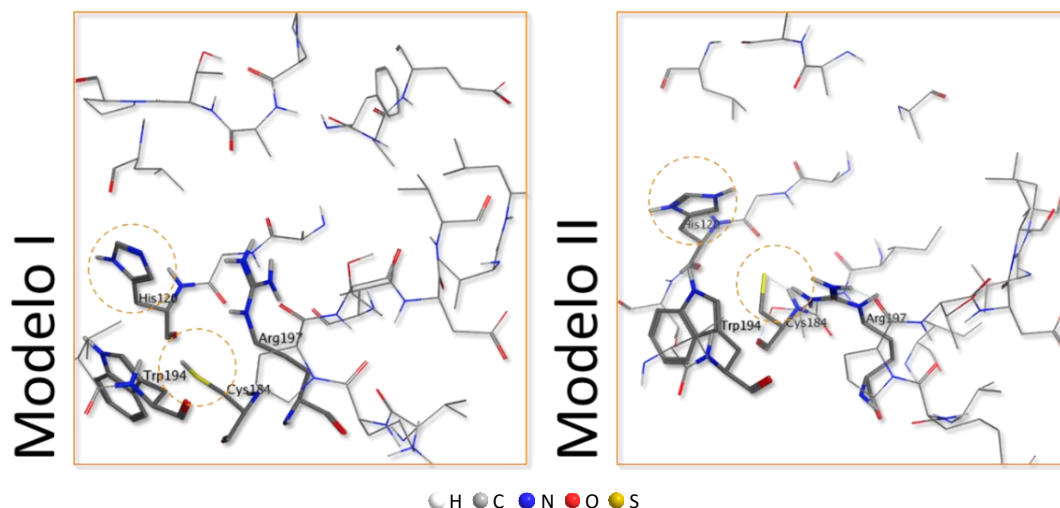


Figura IV. 2 – Modelos de protonación del sitio activo considerados.

## 2.4 Procedimiento del tamizado virtual de alto rendimiento

VHTS por sus siglas en inglés. El mismo fue llevado a cabo empleando métodos tradicionales de *docking* molecular, recurriendo a dos paquetes de software; en primera instancia se utilizó MOE<sup>2</sup> y luego Schrödinger<sup>15</sup>. Se utilizó SrtA como diana biomolecular y las bases de datos de ligandos “Clean fragment-like” y “Clean lead-like” como fuentes de posibles inhibidores.

En principio se estudió exclusivamente el receptor, localizando los potenciales sitios de unión de ligandos. Una vez definido el principal sitio de unión de interés con fines inhibitorios (de aquí en más sitio activo), se realizaron los estudios clásicos de optimización de estructuras de equilibrio teniendo en cuenta diversas posibilidades de protonación de los principales residuos aminoacídicos presentes en el mismo.

Luego se procedió a realizar el VHTS en tres etapas con ambos paquetes de software. Partiendo de las bases de datos de ligandos y las estructuras preparadas de SrtA se realizó una primera aproximación utilizando tanto ligandos como receptores rígidos. En esta fase se retuvo el 10% en el caso de “Clean fragment-like” y el 1% en el de “Clean lead-like” de las mejores poses basándonos en el criterio de afinidad que nos brinda el valor de *score*. Con esos candidatos se realizó una nueva ronda de *docking* con receptor rígido pero esta vez permitiendo la flexibilización del ligando.

Por último, conservando el 10% de las poses de mejor *score* de la etapa anterior se procedió a realizar una última ronda de *docking* en la que se retuvo nuevamente el 10%. En MOE<sup>2</sup> se utilizó *induced fit*, este es un algoritmo de *docking* que permite adición

almente el movimiento de las cadenas laterales del sitio activo, con lo cual se logra un mejor ajuste entre los ligandos y el receptor. En tanto que en Schrödinger<sup>15</sup> se realizó una nueva ronda de *docking* con ligando flexible y receptor rígido pero con un algoritmo de mayor precisión.

Las condiciones de trabajo en MOE<sup>2</sup> fueron las siguientes: como método de *placement* se utilizó *Alpha Triangle*; *Afinity dG* fue la función a la que se recurrió tanto para *score* como para *re-score*; en todos los casos se retuvo únicamente una pose por ligando y el campo de fuerzas empleado fue AMBER99<sup>3</sup>.

En Schrödinger<sup>15</sup> se utilizó el algoritmo de *docking* propietario GLIDE<sup>16-18</sup> (Grid-based Ligand Docking with Energetics). En la primera etapa se empleó Glide HTVS, luego Glide SP (*standard-precision*) y por último Glide XP (*extra-precision*). Las diferencias entre los mismos radican en un aumento progresivo de la precisión de los métodos de posicionamiento y búsquedas conformacionales, así como funciones de *score* cada vez más estrictas. En todos los casos se realizó una minimización de los ligandos post-*docking* y se conservó una única pose por ligando. Se empleó OPLS\_2005<sup>19</sup> como campo de fuerzas de trabajo.

## 2.5 VHTS en MOE

En la Tabla IV. 1 se presentan los diez principales candidatos derivados del VHTS de la base de datos “Clean fragment-like” para el Modelo I realizado con el paquete de software MOE<sup>2</sup>, en la Tabla IV. 2 se presentan los diez principales candidatos para el Modelo II. Es importante resaltar que el valor de *score* es una función adimensional que se utiliza como criterio para cuantificar la bondad de la afinidad entre ligando y receptor, cuanto menor es su valor mayor es la afinidad.

Se observa que en general los *scores* del Modelo II son mejores que los obtenidos para el Modelo I. ¿Pero qué tan buenos son estos candidatos a inhibidores? Para responder esta pregunta es que se procedió a realizar el mismo procedimiento de *docking* que se le realizó a la base de datos de ligandos, pero esta vez para el inhibidor (LPAT\*) y para un fragmento de péptido señal LPATG. Es importante destacar que no fue posible obtener un *docking* satisfactorio utilizando el método implementado con este paquete de software.<sup>2</sup> Esto se puede deber a que se trata de moléculas muy grandes y con muchos grados de libertad. Por ello intentamos un nuevo enfoque utilizando el método *QM-polarized ligand Docking* implementado en el paquete de software Schrödinger.<sup>20</sup> Luego se realizó el *scoring* de la pose obtenida por medio del MOE<sup>2</sup> para que los valores fuesen comparables. Los resultados para el Modelo II se pueden observar en la Figura IV. 3.

Tabla IV. 1 – Principales candidatos del VHTS derivados de la base de datos “Clean fragment-like molecules” para el Modelo I.

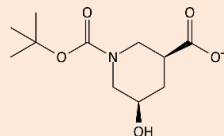
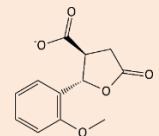
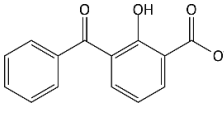
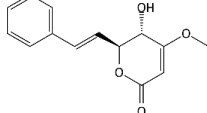
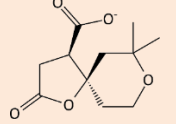
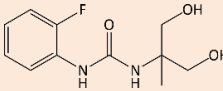
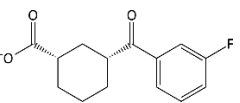
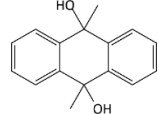
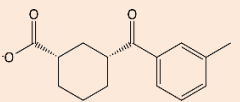
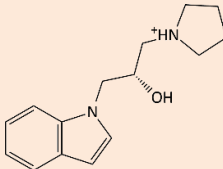
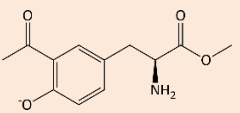
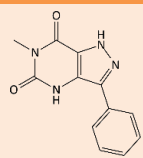
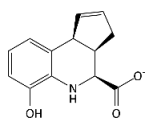
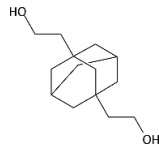
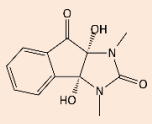
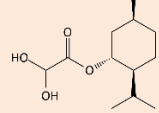
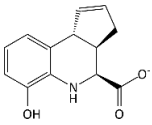
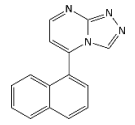
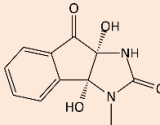
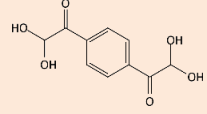
Posición	Ligando	Score	Posición	Ligando	Score
1		-4,5022	6		-4,0701
2		-4,4111	7		-4,0682
3		-4,2548	8		-4,0363
4		-4,1297	9		-4,0230
5		-4,0719	10		-4,0198

Tabla IV. 2 – Principales candidatos del VHTS derivados de la base de datos “Clean fragment-like molecules” para el Modelo II.

Posición	Ligando	Score	Posición	Ligando	Score
1		-4,9414	6		-4,5125
2		-4,8993	7		-4,3612
3		-4,7060	8		-4,3118
4		-4,6604	9		-4,2964
5		-4,5471	10		-4,1703

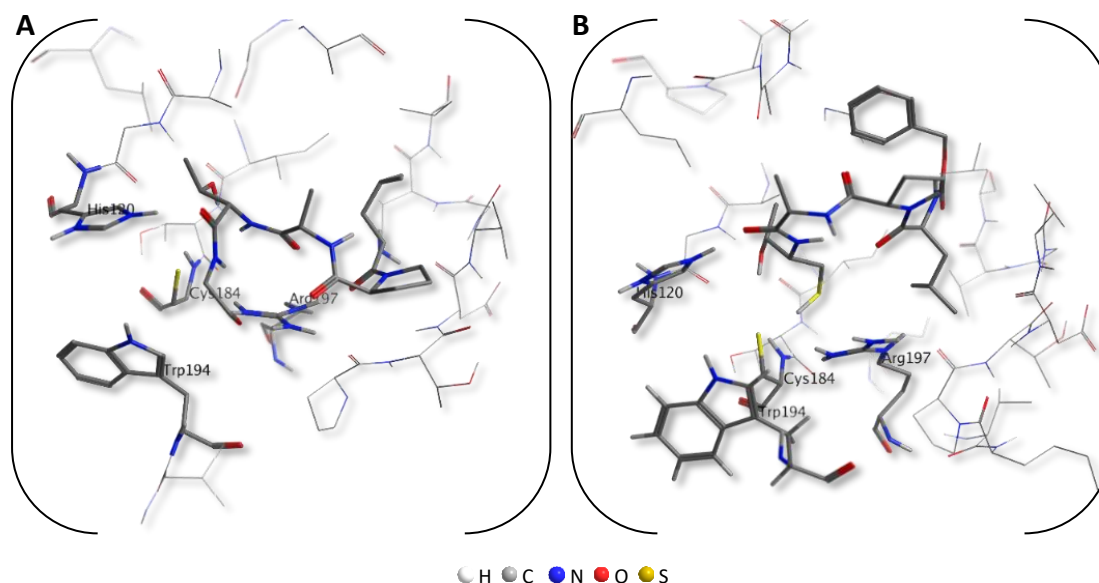


Figura IV. 3 – Docking de LPATG (A) y LPAT\* (B) con los principales aminoácidos y los ligandos resaltados para el Modelo II de 2KID.

El score para el complejo 2KID-LPATG (Figura IV. 3-A) es de -3,4085 y para el 2KID-LPAT\* (Figura IV. 3-B) -4,5291, ambos para el Modelo II. Como se puede observar todos los ligandos en las Tabla IV. 1 y Tabla IV. 2 poseen scores más favorables que el ligando natural (LPATG), por lo que podríamos decir que nos encontramos en presencia de probables inhibidores, algunos incluso mejores que el LPAT\* antes de la formación del enlace disulfuro con la enzima. Dadas las dificultades antes mencionadas (imposibilidad de reproducir las poses de LPATG y LPAT\*) y que los resultados de los estudios no fueron consistentes a lo largo de diversas pruebas es que se decidió desestimar estos resultados, abandonar el uso de MOE y realizar el VHTS utilizando el paquete de software Schrödinger.

## 2.6 VHTS en Schrödinger

Se presentan los principales candidatos derivados del VHTS de ambas bases de datos para cada uno de los modelos en estudio en el Gráfico IV. 1 y el Gráfico IV. 2.

Para ponderar la calidad de los candidatos a inhibidores se utilizaron como referencia el inhibidor (LPAT\*) presente en 2KID y un fragmento de péptido señal (LPATG). Los mismos fueron sometidos al mismo procedimiento de VHTS que los ligandos, en este caso a diferencia de MOE, las poses de LPATG y LPAT\* presentaron resultados satisfactorios. Como se puede observar en los Gráfico IV. 1 y Gráfico IV. 2 en general los scores del Modelo I son mejores que los obtenidos para el Modelo II. Seguramente el receptor en el Modelo I ajuste mejor a una configuración en la que un ligando esté presente en el sitio activo que el Modelo II. También se observa que los resultados para “Clean lead-like” son más favorables que para “Clean fragment-like”, si bien las moléculas de este último grupo son más pequeñas y permiten una mejor exploración del sitio activo (dado que es más sencillo posicionarlas), los scores suelen ser menores

ya que a mayor tamaño aumentan las posibilidades de establecer interacciones favorables con las cadenas laterales del receptor. El detalle se puede encontrar en el Anexo A.

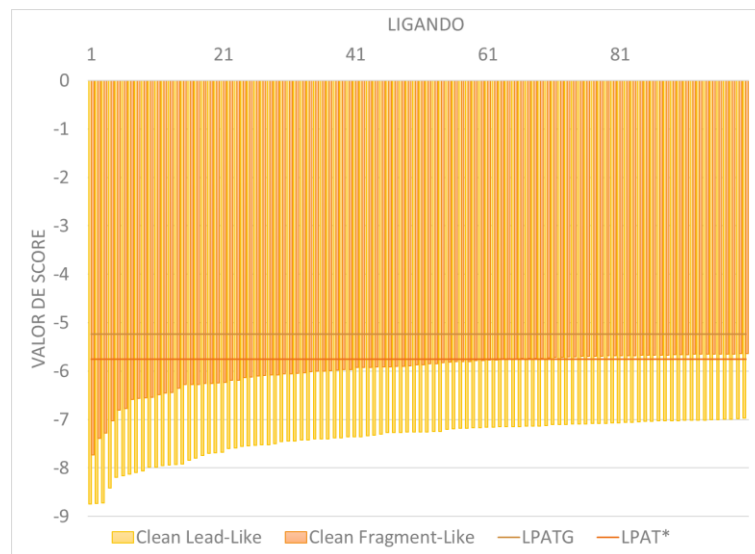


Gráfico IV. 1 – Score de los cien mejores ligandos de “Clean Fragment-Like” y “Clean Lead-Like” para el Modelo I. Se incluyen LPATG y LPAT\* como referencia.

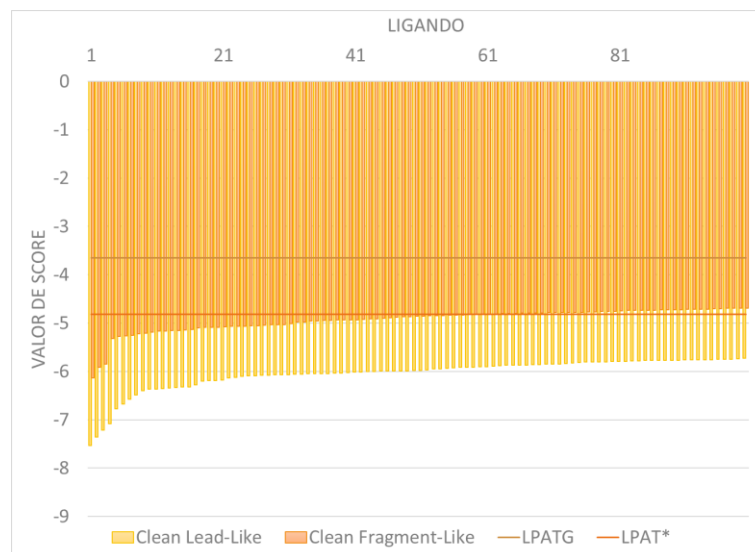


Gráfico IV. 2 – Score de los cien mejores ligandos de “Clean Fragment-Like” y “Clean Lead-Like” para el Modelo II. Se incluyen LPATG y LPAT\* como referencia.

En las Figura IV. 3, Figura IV. 5, Figura IV. 6 y Figura IV. 7 se presenta la superposición de los cien mejores candidatos para cada base de datos y cada modelo, así como los farmacóforos consenso y los mapas de interacción (*fingerprints*) con las cadenas laterales del sitio activo. Los farmacóforos son conjuntos de representaciones tridimensionales abstractas de características químicas comunes a un grupo de ligandos.

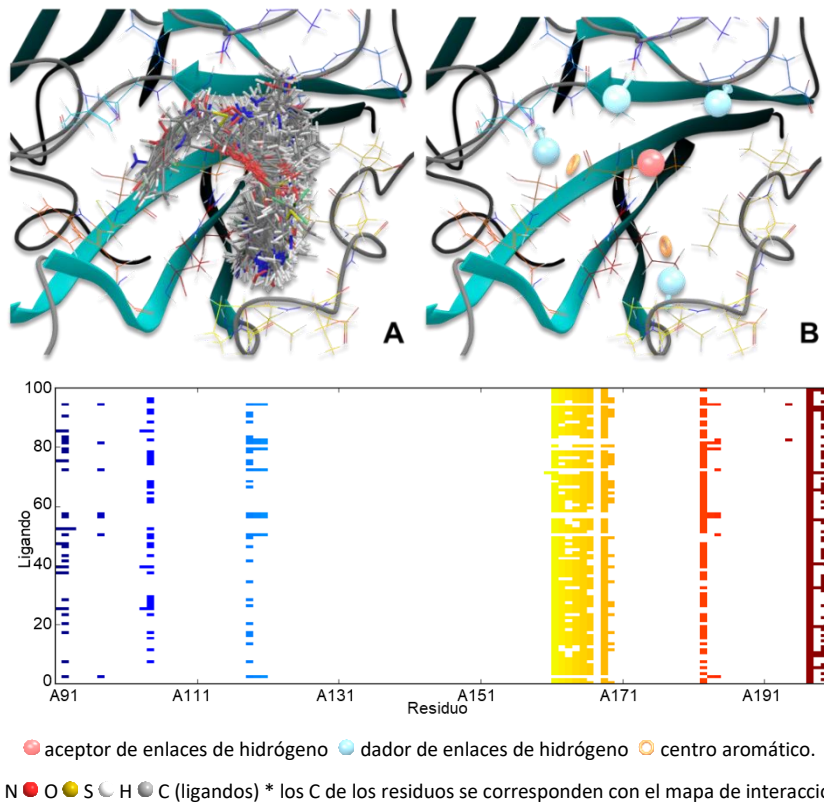


Figura IV. 4 – Modelo I - “Clean Fragment-like” - (A) Superposición de los ligandos en el sitio activo. (B) Farmacóforo consenso. (C) Mapa de interacciones. PDB 2KID.

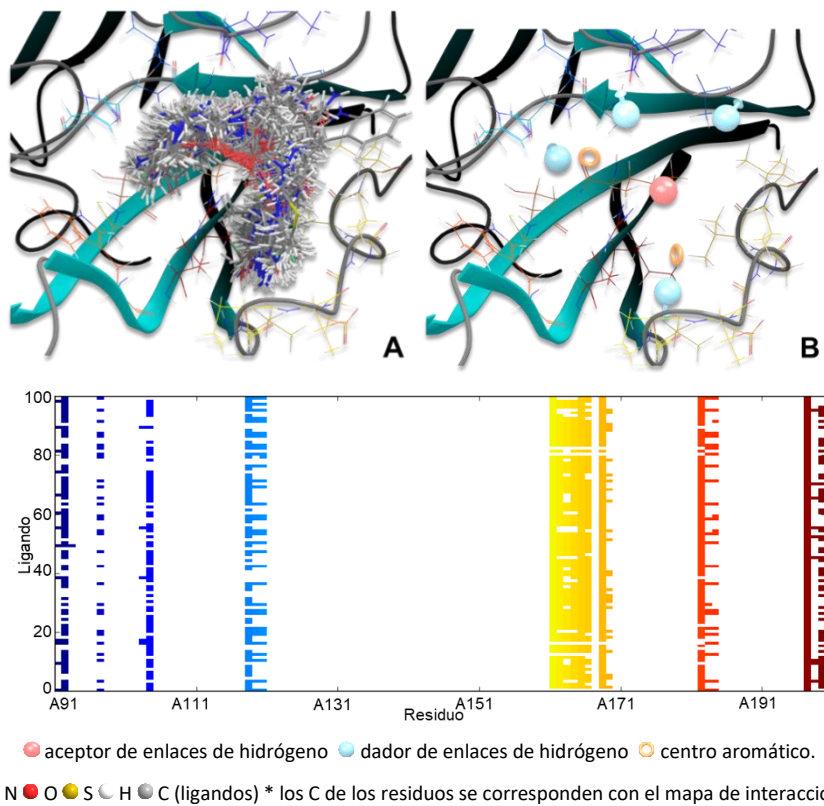


Figura IV. 5 – Modelo I - “Clean Lead-like” - (A) Superposición de los ligandos en el sitio activo. (B) Farmacóforo consenso (C) Mapa de interacciones. PDB 2KID.



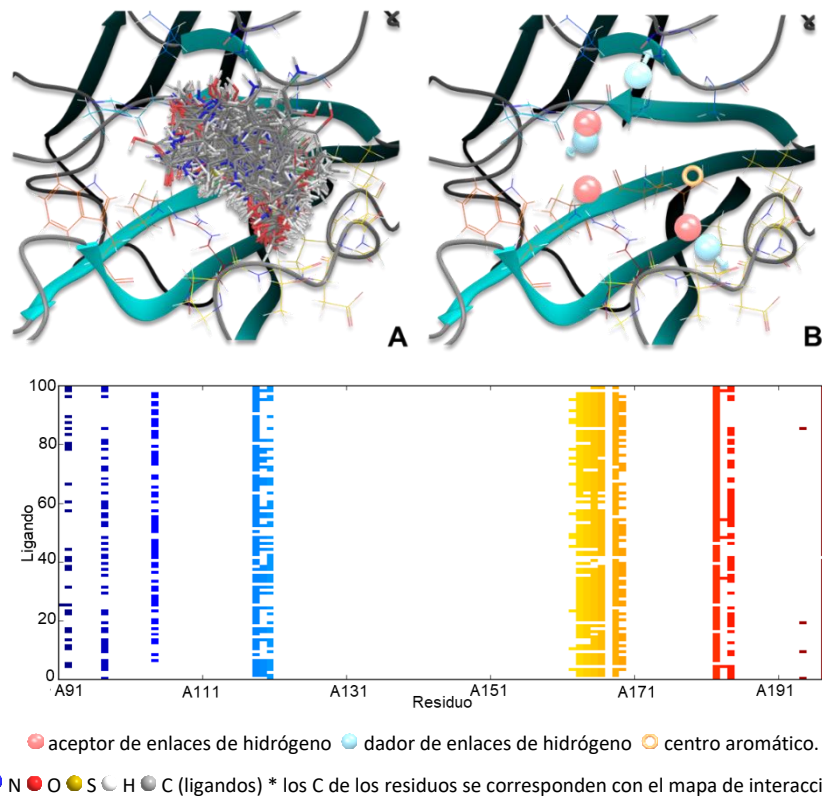


Figura IV. 6 – Modelo II - “Clean Fragment-like” - (A) Superposición de los ligandos en el sitio activo. (B) Farmacóforo consenso (C) Mapa de interacciones. PDB 2KID.

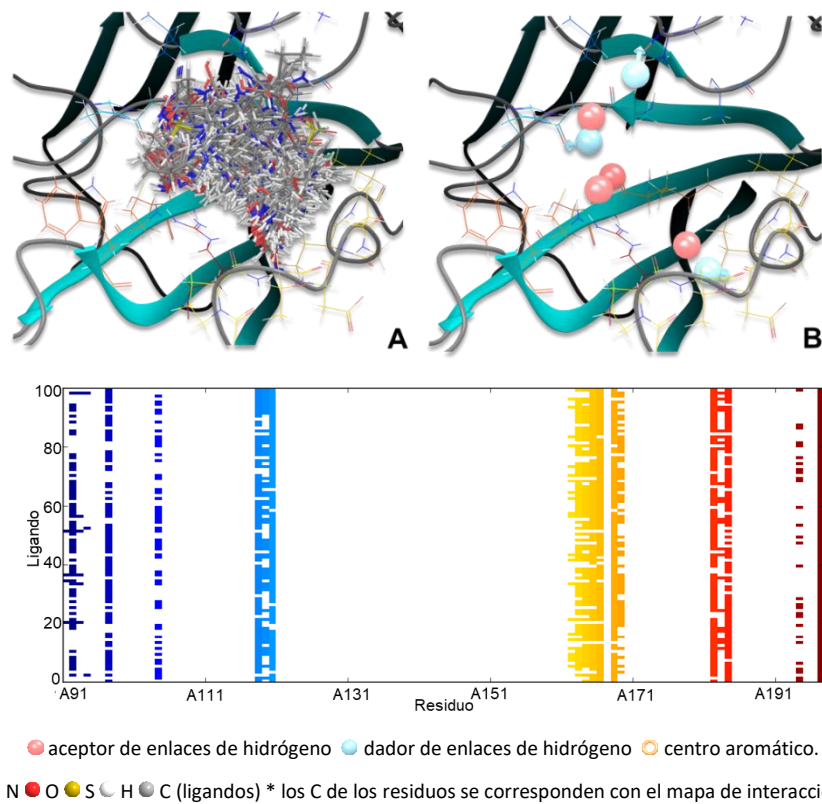


Figura IV. 7 – Modelo II - “Clean Lead-like” - (A) Superposición de los ligandos en el sitio activo. (B) Farmacóforo consenso (C) Mapa de interacciones. PDB 2KID.

Como se puede observar en las superposiciones hay zonas claras donde prevalecen ciertos tipos de interacciones. Estas concuerdan con lo representado por los farmacóforos consenso. Los mismos son muy semejantes dentro de un mismo modelo para las distintas bases de datos, e incluso hay características que se repiten entre los diferentes modelos. Siendo además de gran ayuda a la hora de identificar las principales características de los posibles inhibidores, así como también al momento de evaluar o generar nuevos candidatos.

Las columnas de los mapas de interacción representan los residuos, de este modo se puede dimensionar la cantidad de ligandos que presentan una interacción favorable con cada uno. Asimismo, las filas representan los ligandos y es así como se puede contabilizar la cantidad de residuos que interaccionan favorablemente con cada ligando. A golpe de vista se desprende que los principales aminoácidos responsables de anclar los ligandos al sitio activo son: Arg197, Ile182, Val168, Val166, Asp165, Thr164, Pro163 y Ala104. Si bien, en general, los candidatos no parecen interaccionar directamente con la Cys184 o la His120, en su mayoría ocupan la cavidad que el fragmento LPXTG debe ocupar y en particular, los provenientes de la base “Clean lead-like” siempre presentan una mayor afinidad que el análogo LPATG.

### 3 INTERACCIÓN ENTRE DT Y eEF2

#### 3.1 Estructuras

Para realizar el estudio de la interacción entre la toxina diftérica y el factor de elongación eucariótico 2 se emplearon 1TOX y 1ZM4 respectivamente de RCSB-PDB<sup>1</sup>.

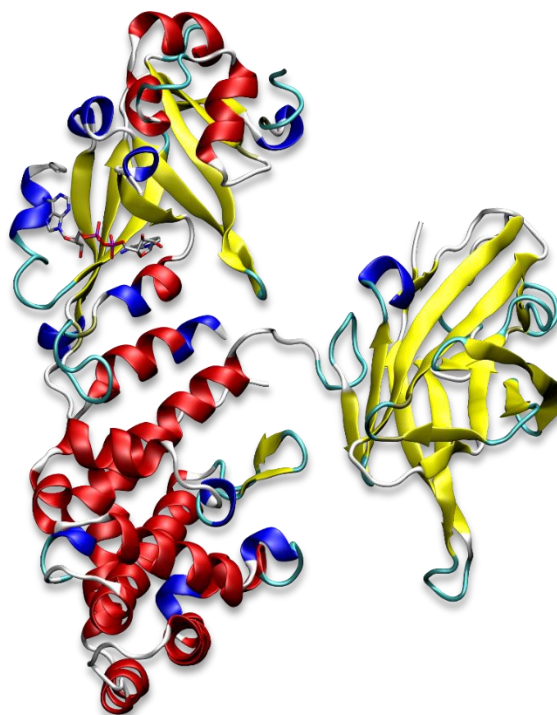


Figura IV. 8 – Estructura de la DT, NAD<sup>+</sup> en modelo de tubos. PDB 1TOX (cadena A).



1TOX es una estructura dimérica, obtenida por medio de estudios de difracción de rayos X y cuya resolución es de 2,3 Å (Figura IV. 8). Ambas cadenas presentan los tres dominios estructurales presentes en la toxina y además fueron cristalizadas junto a su cofactor NAD<sup>+</sup>. Siendo esta última la razón por la cual fue seleccionada. Durante el desarrollo de los estudios de la presente tesis utilizamos únicamente el dominio catalítico (aminoácidos 1 al 193) de la cadena A que se encuentra unido al resto de la cadena por medio de un puente disulfuro.

La estructura del factor de elongación que seleccionamos para realizar el presente trabajo pertenece a 1ZM4 proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*. La misma forma parte de un multímero y es producto de un estudio de difracción de rayos X, cuya resolución es de 2,9 Å (Figura IV. 9). En este caso eEF2 fue co-cristalizado junto a exotoxina A (ETA) y β-TAD que es un análogo a NAD<sup>+</sup> cofactor de la última. Para nuestros estudios utilizamos las cadenas A (eEF2) y B (ETA). ETA y DT pertenecen a la misma familia de toxinas y si bien sus secuencias difieren bastante, sus estructuras tridimensionales son muy semejantes poseyendo muchos aminoácidos conservados en el sitio de unión a NAD<sup>+</sup>, que es además la zona de interface entre eEF2 y estas.

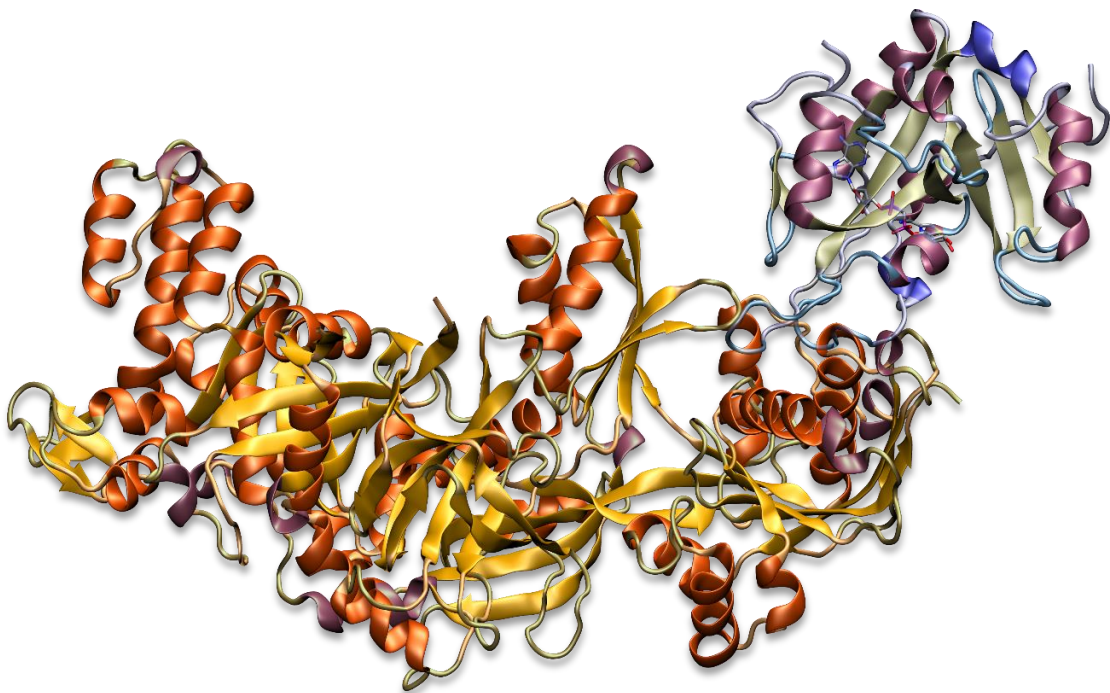


Figura IV. 9 – Estructura del eEF2 (cadena A en tonos anaranjados), ETA (cadena B en tonos violáceos) y β-TAD en modelo de tubos. PDB 1ZM4.

### 3.2 Modelado por homología

Tanto 1ZM4 como 1TOX presentan porciones de su estructura no resueltas. Esto sucede en los estudios de difracción de rayos X, cuando las mismas son de tal movilidad que al ocurrir la cristalización sus coordenadas difieren de forma notoria en la celda unidad cristalina. Generando así una respuesta con un alto nivel de ruido, que dificulta/ la determinación de posiciones atómicas concretas. Generalmente se observa en lazos o

fragmentos terminales. En estos casos en particular se trata de un lazo en cada una de las estructuras, desde Lys39 a Tyr46 en 1TOX (L3) y desde Ala49 a Arg66 en 1ZM4, seis aminoácidos en el extremo C-terminal de 1TOX y el residuo aminoacídico N-terminal en 1ZM4. A modo de referencia visual estos se presentan en la Figura IV. 10-A y la Figura IV. 11-A.

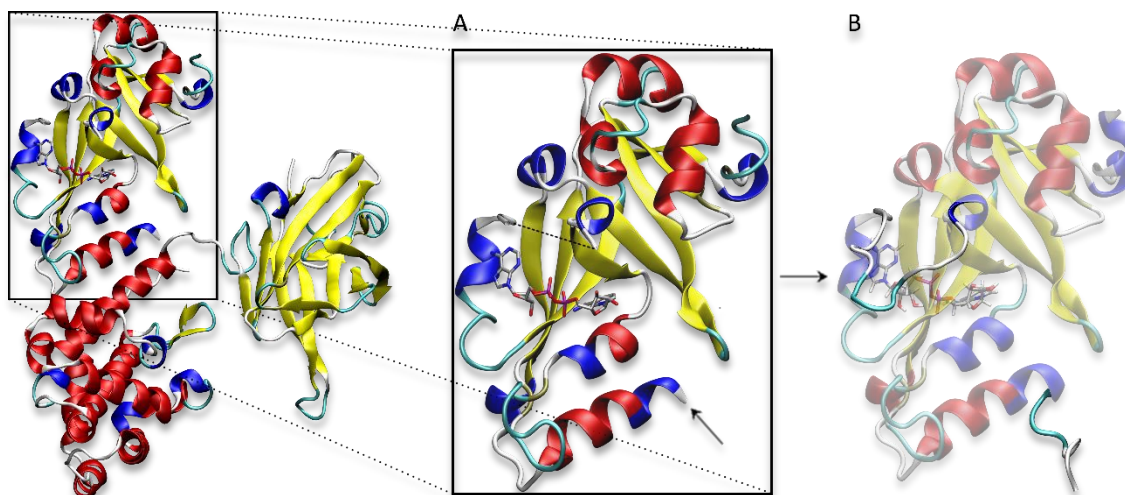


Figura IV. 10 – Modelo final de la DT partiendo de 1TOX.

El modelo por homología de DT (Figura IV. 10-B) se obtuvo empleando el paquete de software YASARA<sup>21</sup>. Para el mismo se utilizó 1TOX como estructura de partida y la secuencia aminoacídica en formato FASTA. Para ello recurrimos al protocolo de modelado que brinda el software en su velocidad lenta (con el fin de obtener el mejor resultado posible) y con sus parámetros por defecto (Tabla IV. 3).<sup>22</sup>

Tabla IV. 3 – Parámetros del modelado por homología.

Parámetro	Valor
Velocidad de Modelado	Lenta
Numero de iteraciones de PSI-BLAST en la búsqueda de moldes	6
Máximo valor E de PSI-BLAST para considerar como molde	0,5
Máximo número de moldes a utilizar	5
Máximo número de moldes con la misma secuencia	1
Máximo estado de oligomerización	4 (tetramérica)
Máximo número de variaciones de alineamiento por molde	5
Máximo número de conformaciones probadas por lazo	100
Máximo número de residuos terminales a agregar	10

El resultado del modelo fue en general, bueno. El detalle se puede observar en la Tabla IV. 4. El *Z-score* “general” se calcula según promedios ponderados de los individuales, por medio de la fórmula:

$$\text{General} = 0,145 * \text{Diedros} + 0,390 * \text{Empaquetamiento 1D} + 0,465 * \text{Empaquetamiento 3D}$$

En el caso del eEF2 también se realizó un modelado por homología de la estructura partiendo de 1ZM4 y la secuencia en formato FASTA con las mismas condiciones que para la DT (Tabla IV. 3). Si bien el resultado general fue relativamente satisfactorio como se puede ver en la Tabla IV. 5, no fue el modelo utilizado para el resto de los estudios ya que no nos era posible retener la estructura de la ETA a la que se encuentra unida y que nos resultaba de suma utilidad.

Tabla IV. 4 – Resultado modelado por Homología DT.

Tipo de chequeo	Calidad del Z-score	Comentario
Diedros	2,109	Óptimo
Empaquetamiento 1D	-0,329	Bueno
Empaquetamiento 3D	-0,808	Bueno
General	-0,198	Bueno

Tabla IV. 5 – Resultado modelado por Homología eEF2.

Tipo de chequeo	Calidad del Z-score	Comentario
Diedros	1,472	Óptimo
Empaquetamiento 1D	-2,225	Pobre
Empaquetamiento 3D	-1,709	Satisfactorio
General	-1,449	Satisfactorio

Una vez descartado el modelo homológico recurrimos a la construcción del lazo faltante por medio de la utilidad incluida también en YASARA<sup>21</sup>, la cual partiendo de su secuencia busca en una biblioteca de lazos y crea un modelo. Como el mismo se encuentra a una distancia importante de la zona donde se da la interacción entre las proteínas y no intervendría en ella decidimos inclinarnos por esta opción. Siendo que además las estructuras iban a ser sometidas a dinámicas moleculares lo cual permitiría su relajación. El residuo faltante en el extremo N-terminal fue agregado durante su preparación. En la Figura IV. 11-B se presenta el modelo utilizado.

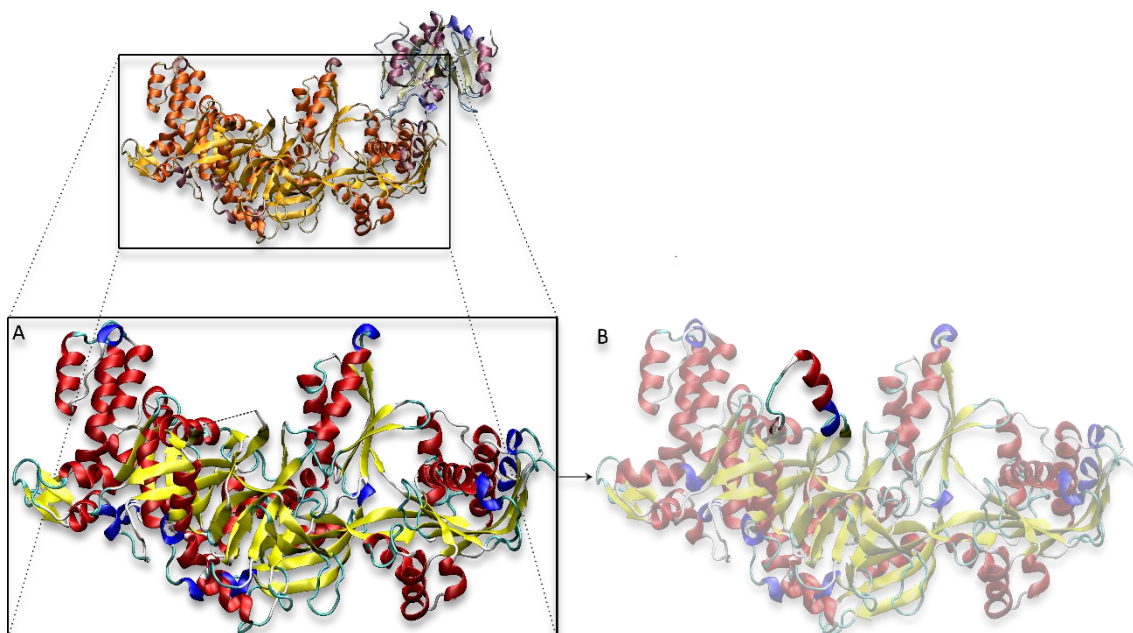


Figura IV. 11 – Modelo final del eEF2 partiendo de 1ZM4.

### 3.3 Superposición DT eEF2

Nuestra meta era estudiar la interacción entre la DT y el eEF2 por medio de DM. Pero para poder hacerlo necesitábamos un punto de partida que describiese coherentemente las posiciones relativas entre ellas. A tales efectos tomamos como primera aproximación la cadena de ETA que retuvimos en el modelo de eEF2 proveniente de la estructura 1ZM4 y a la cual superpusimos la DT empleando el software MOE<sup>2</sup>. El mismo se encargó de alinear las secuencias y posteriormente realizar la superposición utilizando todos los átomos de todos los residuos, acentuando coincidencias de estructura

secundaria y refinando las distancias con ponderaciones gaussianas. El RMSD de la estructura total fue 8,858 Å, el cual era de esperar ya que como sabíamos las secuencias de ETA y DT difieren de forma significativa. Pero al superponerlas teniendo en cuenta principalmente sus sitios activos el RMSD entre estos es tan solo de 1,793 Å. Un valor más que aceptable teniendo en cuenta que esa zona es nuestra zona de interés. El resultado de la superposición se puede observar en la Figura IV. 12.

El valor de RMSD (*Root-Mean-Square Deviation* en inglés) o desviación de la media cuadrática es una medida de la diferencia media entre dos cantidades, en el presente trabajo, generalmente, distancias entre átomos.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|a_i - b_i\|^2}$$

Donde **n** es el número total de átomos, **a** y **b** las coordenadas de los átomos de las diferentes cadenas.

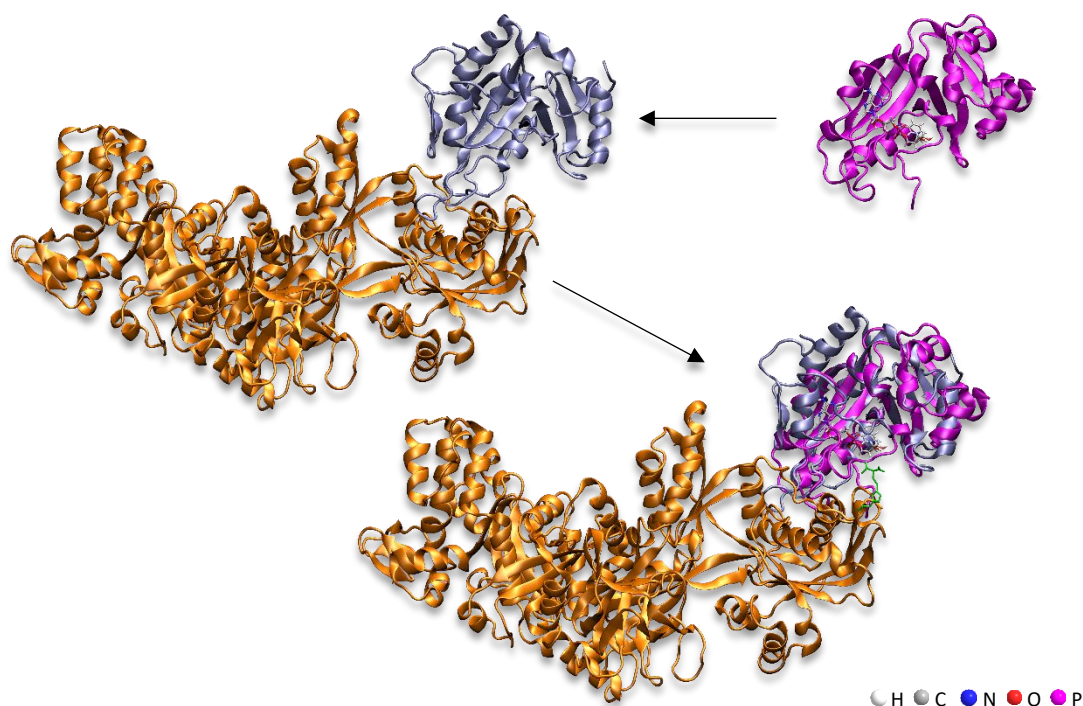


Figura IV. 12 – Superposición entre DT y ETA en modelo de eEF2. DT en magenta, ETA en gris violáceo, eEF2 en anaranjado, DTA en tubos verdes y NAD<sup>+</sup> en tubos.

### 3.4 Parametrización

A fin de poder realizar los estudios de DM es necesario agregar los parámetros correspondientes a los grupos moleculares no presentes en el campo de fuerzas. En nuestro caso, los referentes a DTA, DTI, ACP, NAD<sup>+</sup>, Nicotinamida y ADP-ribosa. Para DTA, DTI y ACP se emplearon los parámetros de un trabajo previo del grupo.<sup>23</sup> Los de NAD<sup>+</sup> provienen de la base de datos de parámetros de la Universidad de Manchester.<sup>24-26</sup> En tanto que los de Nicotinamida y ADP-ribosa se obtuvieron calculando las cargas RESP en el paquete de software Gaussian 09<sup>27</sup> utilizando HF/6-31G\* como método de cálculo y funciones de base respectivamente. Los parámetros geométricos se obtuvieron de átomos similares utilizando Antechamber y Xleap dos utilidades de AmberTools<sup>28</sup> y las unidades fueron transformadas a las empleadas por GROMACS<sup>29</sup> mediante un script de Python<sup>30</sup>. En el Anexo B se recopilan estos juegos de parámetros.

### 3.5 Procedimiento DM

Las dinámicas moleculares se realizaron en el paquete de software GROMACS<sup>29</sup> empleando el campo de fuerzas AMBER99SB-ILDN<sup>3, 31</sup>. El mismo se basa en la versión amberf99<sup>3</sup> con ángulos de torsión  $\psi$  y  $\phi$  de la cadena principal actualizados (SB) y cuenta también con potenciales de torsión de las cadenas laterales mejorados (ILDN)<sup>31</sup>.

El procedimiento general fue el siguiente: en primera instancia se protonaron las estructuras a pH 7, posteriormente se generó la caja de solvatación de forma cúbica y de un tamaño apropiado para no correr el riesgo de introducir efectos de periodicidad no deseados (1 nm de distancia de la estructura a las paredes de la caja). Luego se introdujo el disolvente, en nuestro caso H<sub>2</sub>O, empleando el modelo TIP3P. Las cargas se neutralizaron empleando contraiones Na<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup> según fuese necesario. Una vez culminada esta fase se realizó una minimización energética con el fin de optimizar parámetros geométricos del sistema. A modo de preparación para la corrida de producción y de forma que se relajasen y equilibrasen tanto las estructuras proteicas, como los cofactores y el disolvente se realizaron dos pequeñas corridas DM de 100 ps primero una con ensamble NVT y luego otra con ensamble NPT. Finalmente se realiza la corrida de producción de 50 ns con las condiciones que se presentan en la Tabla IV. 6.



Tabla IV. 6 – Parámetros de las DM.

## Parámetros de corrida

Parámetro	Valor	Comentario
<b>Integrator</b>	Md	Leap-frog
<b>Dt</b>	0,002	2 fs
<b>Nsteps</b>	25000000	2 fs x 25000000 = 50 ns

## Parámetros de enlace

Parámetro	Valor	Comentario
<b>constraint algorithm</b>	lincs	Restricciones holonómicas
<b>constraints</b>	all-bonds	Todos los enlaces restringidos
<b>lincs iter</b>	1	Precisión de LINCS
<b>lincs order</b>	4	También relacionado con la precisión

## Ensamble NPT

Parámetro	Valor	Comentario
<b>Pcoupl</b>	Parinello-Rahman	Acoplamiento de presión encendido en NPT
<b>pcoupltype</b>	isotrópico	Escalamiento uniforme de los vectores de la caja

## Presión

Parámetro	Valor	Comentario
<b>tau p</b>	2,0	Constante de tiempo (ps)
<b>compressibility</b>	4,5e-5	Compresibilidad isoterma del agua (1/bar)
<b>ref p</b>	1,0	Presión de referencia (bar)

## Acoplamiento de temperatura Noose-Hover

Parámetro	Valor	Comentario
<b>tcoupl</b>	V-rescale	Termostato de Berendsen modificado
<b>tc-grps</b>	Protein Non-Protein	Se acoplan dos grupos por separado
<b>tau t</b>	0,1 0,1	Constante de tiempo para cada grupo (ps)
<b>ref t</b>	300 300	Temperatura de referencia (K)

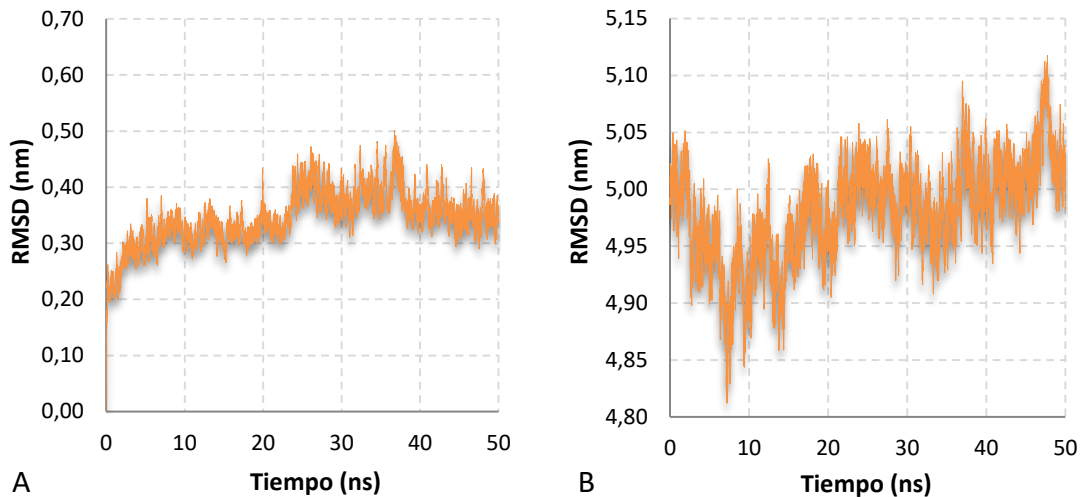
## Adición Malla-Partícula de Ewald (PME)

Parámetro	Valor	Comentario
<b>coulombtype</b>	PME	PME para cálculos electrostáticos de largo rango
<b>ns type</b>	grid	Buscar en las celdas de la cuadrícula vecina
<b>nslist</b>	5	10 fs
<b>rvdw</b>	1,0	Corte de interacciones de van der Waals (nm)
<b>Rlist</b>	1,0	Corte de la lista de vecinos de cercanos (nm)
<b>coulomb</b>	1,0	Corte de interacciones electrostáticas (nm)
<b>Fourierspacing</b>	0,16	Espaciado de red para transformada de Fourier
<b>pme order</b>	4	Interpolación cúbica

### 3.6 Primera aproximación al modelo de interacción

Como primera aproximación al modelo de interacción entre DT y eEF2 (incluyendo DTA) realizamos una DM partiendo de la superposición discutida en el punto 3.3 sin ningún tipo de modificación. El RMSD de las cadenas principales para dicha corrida se presenta en el Gráfico IV. 3-A.

Gráfico IV. 3 – RMSD cadenas principales de eEF2 (DTA) y DT primera aproximación. (A) primera corrida (B) segunda corrida.



Como se puede observar la estabilización ocurre rápidamente y la dinámica puede ser considerada casi en su totalidad. Pero al visualizar la trayectoria notamos como DT y eEF2 comienzan a alejarse (Figura IV. 13) la distancia entre DTA y NAD<sup>+</sup> se encuentra en el entorno de 17 Å.

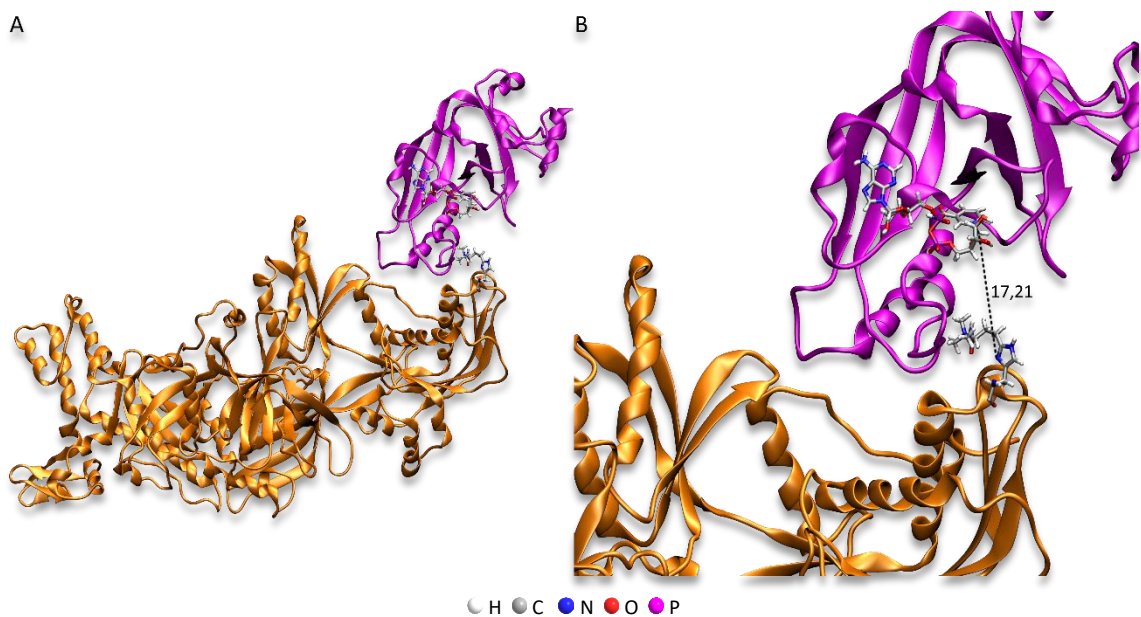


Figura IV. 13 – (A) DT y eEF2 al finalizar una DM de 50 ns. (B) Acercamiento de la imagen A donde se puede observar la distancia entre el nitrógeno  $\delta$  (ND1) de DTA y el carbono C1D de NAD<sup>+</sup>. NAD<sup>+</sup> y DTA en representación de tubos.

Desde la estructura final de la primera corrida se lanzó una nueva DM de 50 ns con el fin de verificar si lo ocurrido respondía a una falta de ajuste entre DT y eEF2 y si esto podía ser subsanado extendiendo el tiempo total de simulación. En el Gráfico IV. 3-B se presenta el RMSD de la misma.

Esta vez los RMSD empeoraron notoriamente. Dado que no solo las cadenas prosiguieron alejándose, sino que además se comenzó a notar una rotación de una respecto a la otra a lo largo del eje longitudinal entre las mismas. Concomitantemente la distancia entre  $\text{NAD}^+$  y DTA continuó aumentando (Figura IV. 14).

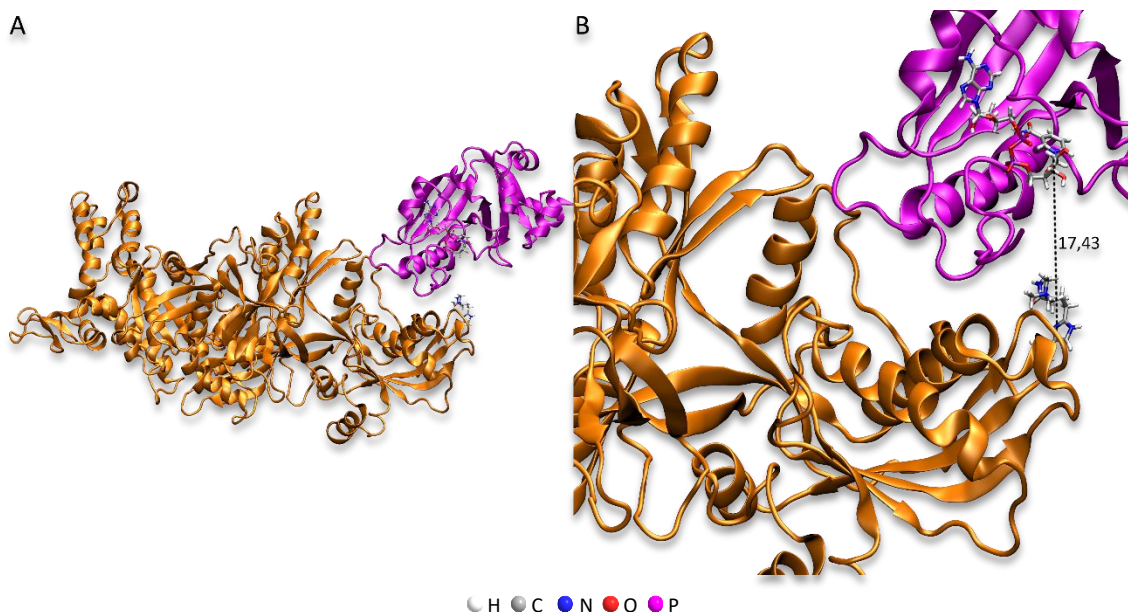


Figura IV. 14 – (A) DT y eEF2 al finalizar la segunda DM de 50 ns. (B) Acercamiento de la imagen A donde se puede observar la distancia entre el nitrógeno  $\delta$  (ND1) de DTA y el carbono C1D de  $\text{NAD}^+$ .  $\text{NAD}^+$  y DTA en representación de tubos.

Estos resultados nos llevaron a reevaluar el modelo. Al estudiar las estructuras con detenimiento notamos un lazo (L4 - desde Ser66 hasta Gly78) en la DT que se encontraba retraído y al parecer impedía el acercamiento entre las cadenas a lo largo de las trayectorias de DM. Más aún, en la estructura de ETA se puede observar un lazo análogo que se encuentra extendido y ocupando una hendidura de eEF2 (Figura IV. 15).

Dado que el dominio catalítico de la DT proviene de una estructura cristalina en la que además están presentes los dominios R y T, es posible que la conformación del lazo en cuestión no corresponda con la cristalográfica una vez que dicho dominio esté actuando libremente en el citoplasma de la célula hospedera. Analizando la 1TOX se puede observar que Leu73 y Ser74 (que forman parte del lazo) presentan interacciones con Glu298 (perteneciente al dominio T), esta situación, además, puede ser producto del empaquetamiento cristalino (Figura IV. 16).



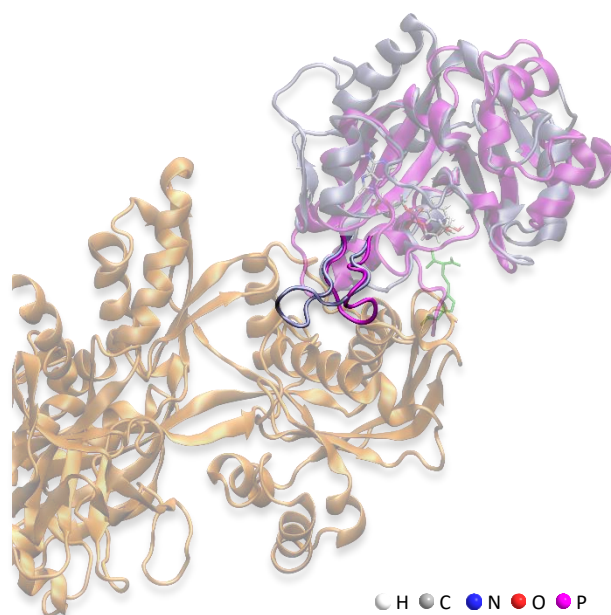


Figura IV. 15 – Superposición DT-ETA, se resaltan los lazos de la interfaz con eEF2. NAD<sup>+</sup> y DTA (en verde) en representación de tubos.

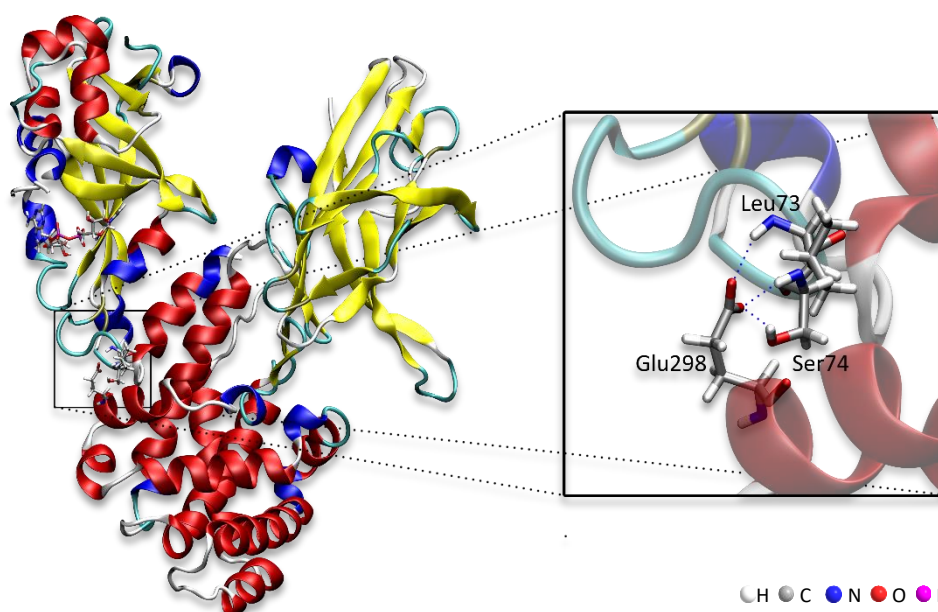


Figura IV. 16 – Interacción entre el dominio T y L4. Residuos destacados en representación de tubos.

Por estas razones es factible que su conformación sea semejante a la que presenta el lazo de la ETA en 1ZM4. De esta manera decidimos eliminarlo y permitir que el paquete software YASARA<sup>21</sup> lo reconstruyese (accediendo a la ya mencionada biblioteca de lazos) teniendo en cuenta además la estructura del eEF2. Todas las opciones que nos presentó el programa correspondían a conformaciones extendidas (apenas con pequeñas variaciones) que ocupaban la misma hendidura que ocupaba la ETA, de las cuales seleccionamos una. En la Figura IV. 17 se puede observar la modificación realizada.

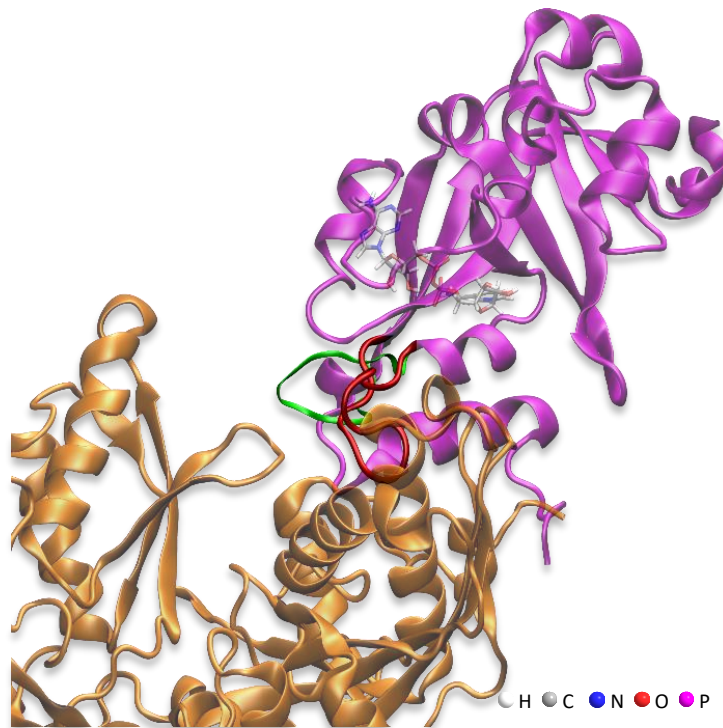


Figura IV. 17 – Reconstrucción del L4 del dominio catalítico de la DT. En rojo el lazo de la estructura cristalográfica (1TOX.A), en verde el producto de la reconstrucción en YASARA<sup>21</sup>.

### 3.7 DM DT-eEF2 (DTA)

La primera dinámica realizada con la nueva conformación del lazo L4 fue la correspondiente al eEF2 con DTA. En el Gráfico IV. 4 se presenta la variación del RMSD de las cadenas principales a lo largo de la DM. En este se observa que las mismas se estabilizan en torno a los 5 ns, es a partir de este momento que se considera finalizada la etapa de estabilización del sistema y el comienzo de la etapa de producción.

Gráfico IV. 4 – RMSD cadenas principales de eEF2 (DTA) y DT con L4 modificado.

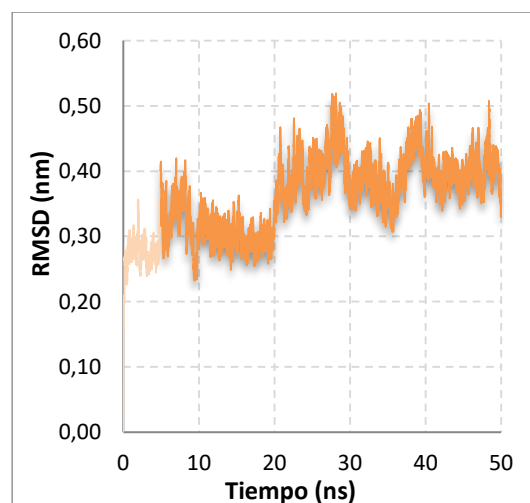


Gráfico IV. 5 – RMSD de DTA.

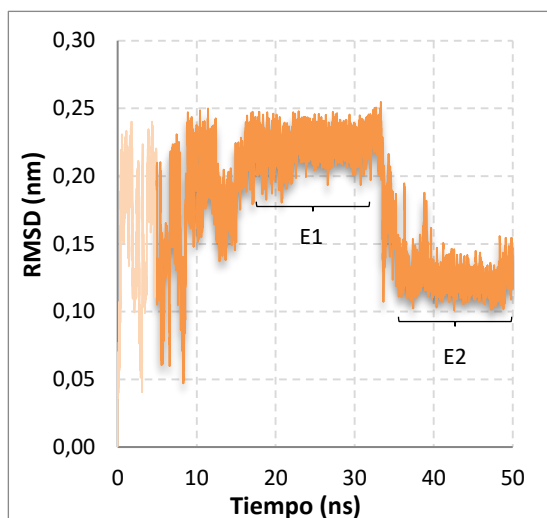
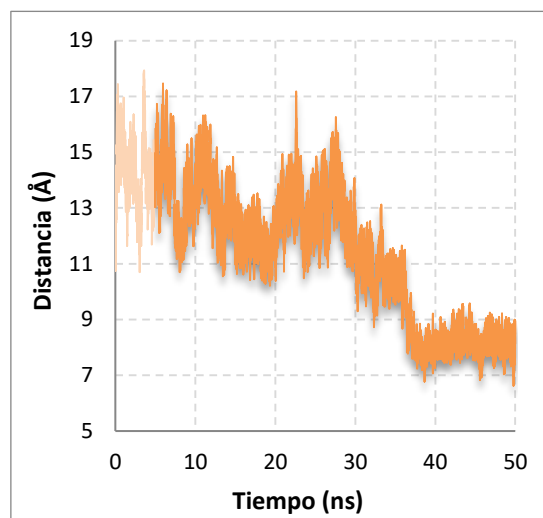


Gráfico IV. 6 – Distancia entre ND1 de DTA y C1D de NAD<sup>+</sup>.



Al analizar la variación del RMSD del DTA a lo largo de la DM (Gráfico IV. 5) se observan dos conformaciones o estados claramente diferenciados E1 y E2. En el Gráfico IV. 6 se puede ver cómo disminuye la distancia comenzando en el entorno de los 15 Å y culminando en torno a los 8 Å. Esta caída acompaña al cambio de conformación. Con el fin de entender mejor este comportamiento es que realizamos un análisis completo de las interacciones de DTA a lo largo de la trayectoria.

### 3.7.1 Análisis de interacciones

En la Tabla IV. 7 se describen los enlaces de hidrógeno que DTA establece a lo largo de la trayectoria y el porcentaje de ocupación de los mismos. El criterio para que fuesen considerados como tales fue que la distancia entre dador y aceptor fuese menor a 3 Å y que el ángulo dador-H-aceptor no superase los 20°.

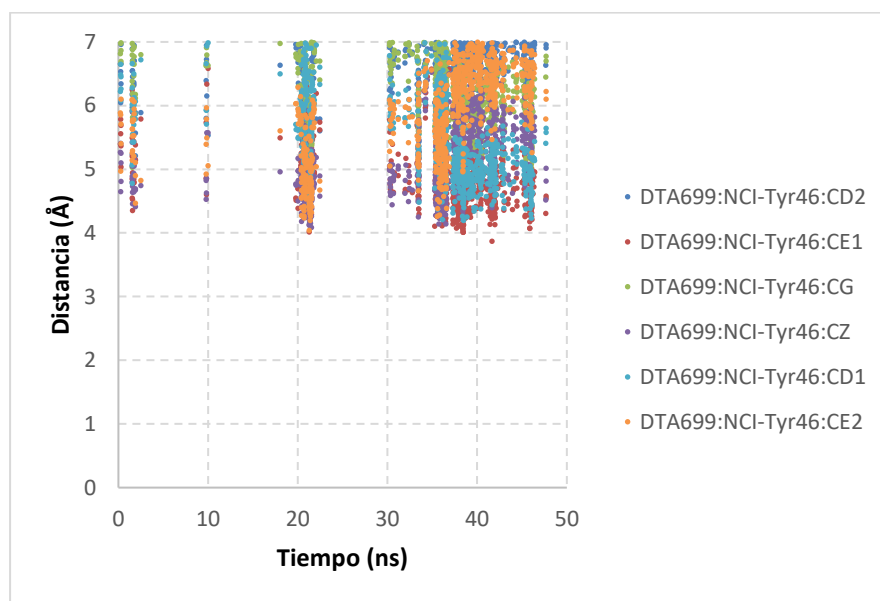
Tabla IV. 7 – Enlaces de Hidrógeno establecidos por DTA (DTA699) a lo largo de la DM. CP – cadena principal, CL – cadena lateral.

Dador	Aceptor	Ocupación (%)	Dador	Aceptor	Ocupación (%)
eEF2-Asn584 (CL)	eEF2-DTA699 (CP)	37,77	eEF2-Asn581 (CL)	eEF2-DTA699 (CP)	0,06
eEF2-DTA699 (CP)	eEF2-Asp696 (CP)	4,33	eEF2-DTA699 (CL)	eEF2-Gln704 (CL)	0,01
eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-DTA699 (CP)	0,33	eEF2-DTA699 (CL)	DT-Asn69 (CL)	0,04
eEF2-DTA699 (CL)	DT-Tyr46 (CL)	0,14	eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-DTA699 (CL)	5,00
DT-Tyr46 (CL)	eEF2-DTA699 (CL)	0,37	eEF2-DTA699 (CL)	NAD <sup>+</sup>	0,22
DT-Asn45 (CL)	eEF2-DTA699 (CL)	0,11	DT-Asn69 (CL)	eEF2-DTA699 (CL)	0,01
eEF2-DTA699 (CP)	eEF2-Asp696 (CL)	0,11	eEF2-DTA699 (CL)	eEF2-Asn581 (CL)	0,12
eEF2-Asn581 (CL)	eEF2-DTA699 (CL)	4,78	NAD <sup>+</sup>	eEF2-DTA699 (CL)	4,88
eEF2-DTA699 (CL)	eEF2-Asp696 (CL)	0,51	eEF2-DTA699 (CL)	DT-Trp50 (CP)	0,01

En nuestro análisis consideraremos relevantes únicamente los enlaces de hidrógeno que forma la cadena lateral de DTA y que superan al 1% de ocupación. Estos son los enlaces que establece como aceptor con el O3D (OH) de la porción ribosa de  $\text{NAD}^+$  mediante el carbonilo de su amida (OAG), así como los que establece con Asn581 y Gln704 como aceptor (también mínimamente como dador en condiciones opuestas) mediante el mismo carbonilo con la amina de la carboxamida de las cadenas laterales de dichos residuos (ND2 y NE2 respectivamente). Estos últimos se corresponden con la posición “cerrada” que se observó en estudios previos del grupo.<sup>23</sup>

Además de los enlaces de hidrógeno existe otra interacción muy importante que ocurre a lo largo de la trayectoria y escapa a lo antes expuesto. Esta es una interacción catión -  $\pi$  entre el trimetil-amonio (nitrógeno NCB) de la DTA y la Tyr46 del L3 de la DT. Se consideraron como interacciones todos los casos en los que las distancias entre el catión y cada carbono del anillo de la tirosina eran menores a 7 Å.<sup>32</sup> En este caso, la ocupación relativa a esta interacción es de 8,42%. En el Gráfico IV. 7 se presenta el resultado de dicho análisis.

Gráfico IV. 7 – Interacción catión -  $\pi$ , DTA - Tyr46.



En la Figura IV. 18 se pueden observar DTA,  $\text{NAD}^+$  y los aminoácidos responsables de las principales interacciones. En los Gráfico IV. 8 y Gráfico IV. 9 se presentan las mismas en función del tiempo de corrida.

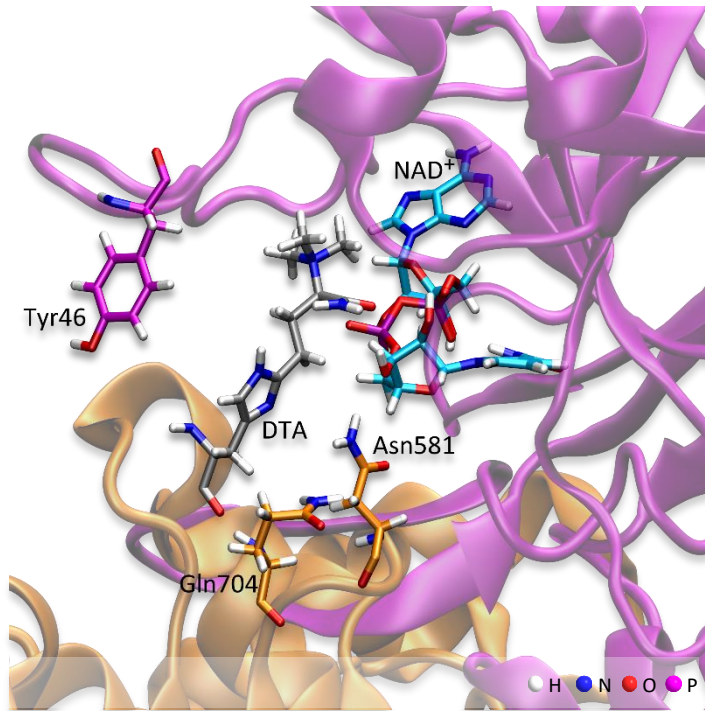
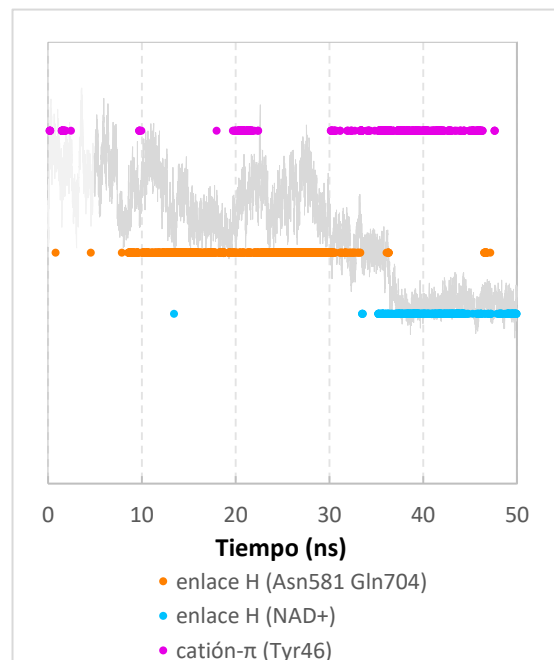
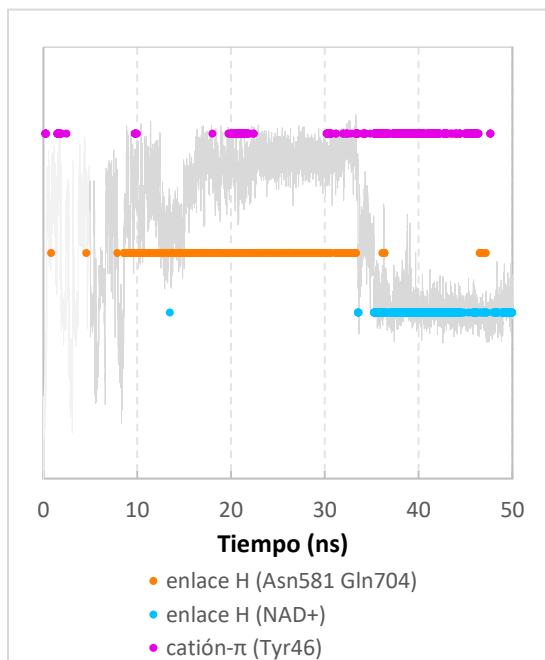


Figura IV. 18 – DTA y compuestos con los cuáles interacciona. El color de los C se corresponde con los gráficos de interacciones.

Gráfico IV. 8 – Interacciones de la DTA en función del tiempo de la DM (de fondo en gris el RMSD de la DTA).

Gráfico IV. 9 – Interacciones de la DTA en función del tiempo de la DM (de fondo en gris la distancia ND1 – C1D).



Como evidencian los Gráfico IV. 8 y Gráfico IV. 9 la interacción tanto con NAD<sup>+</sup> como con Tyr46 de la DT impulsan el cambio conformacional de la estructura “cerrada” E1 (interacciones con Gln704 y Asn581) a la abierta E2 lo cual a su vez impulsa el acercamiento entre los átomos ND1 y C1D. La Tyr46 parece encargarse de realizar la



transición, extendiendo la estructura de la DTA y ocasionando que el carbonilo OAG deje de interactuar con Gln704 y Asn581 y comience a hacerlo con uno de los OH (O3D) del NAD<sup>+</sup>. Esto aproximará las estructuras y en última instancia con la ayuda de Gln704 y Asn581 (que también interactúan con dicho OH pero como dadores de enlace de H) posicionarán a ND1 y CD1 para que ocurra la reacción. La distancia entre ambos al culminar la DM como se observa en la Figura IV. 19-B es aún de 7,95 Å, aunque esto es de esperar ya que se postula un mecanismo de reacción de tipo S<sub>N</sub>1, por lo que primero debería romperse el enlace entre la nicotinamida y la ADP-ribosa.

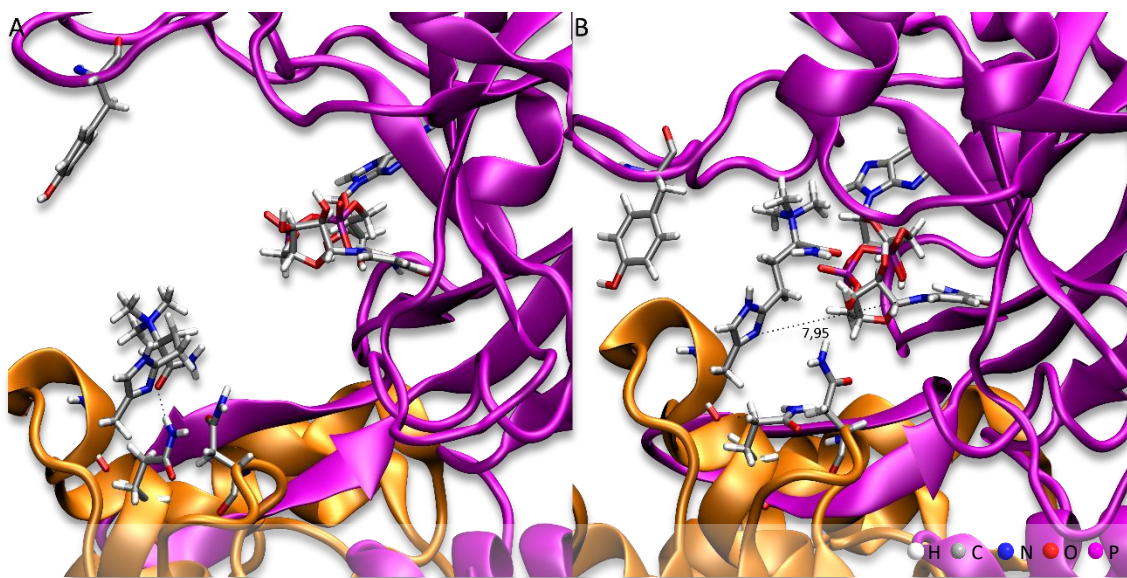
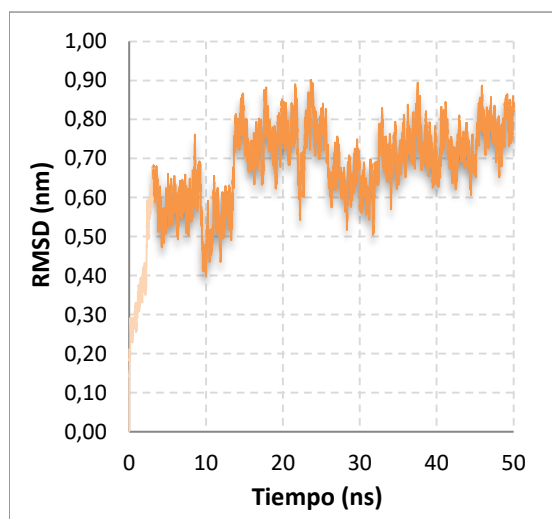


Figura IV. 19 – Instantánea de la DM de DTA a los (A) 25 ns de corrida (B) 50 ns de corrida. Residuos destacados en representación de tubos.

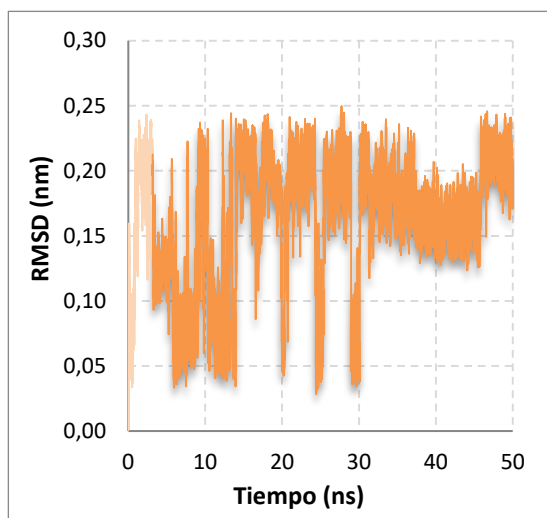
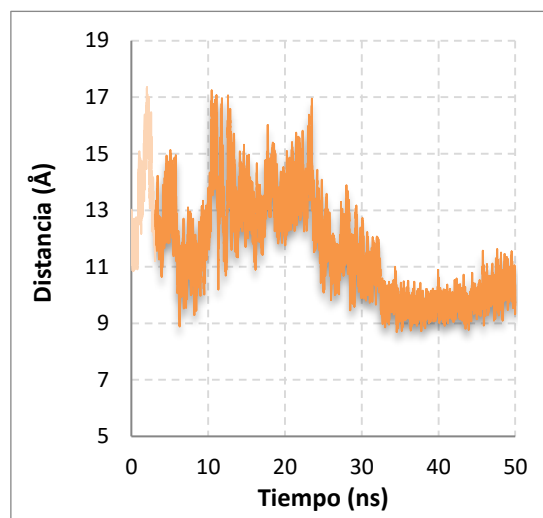
### 3.8 DM DT-eEF2 (DTI)

Gráfico IV. 10 – RMSD cadenas principales de eEF2 (DTI) y DT con L4 modificado.



En el Gráfico IV. 10 se presenta el RMSD de las cadenas principales del eEF2 (con DTI) y la DT. Consideramos que la etapa de estabilización culmina a los 3,16 ns y lo que resta de trayectoria sería producción. En el caso de la DTI (Gráfico IV. 11) no se observan tendencias tan claras en cuanto al RMSD del aminoácido como ocurría en el caso de la DTA. Si bien hay un acercamiento entre los átomos ND1 y C1D al final de la DM nos encontramos en el entorno de los 10-11 Å luego de haber estado cerca de los 9-10 Å y de un aparente cambio conformacional (Gráfico IV. 12).

Gráfico IV. 11 – RMSD de DTI.

Gráfico IV. 12 – Distancia entre ND1 de DTI y C1D de NAD<sup>+</sup>.

### 3.8.1 Análisis de interacciones

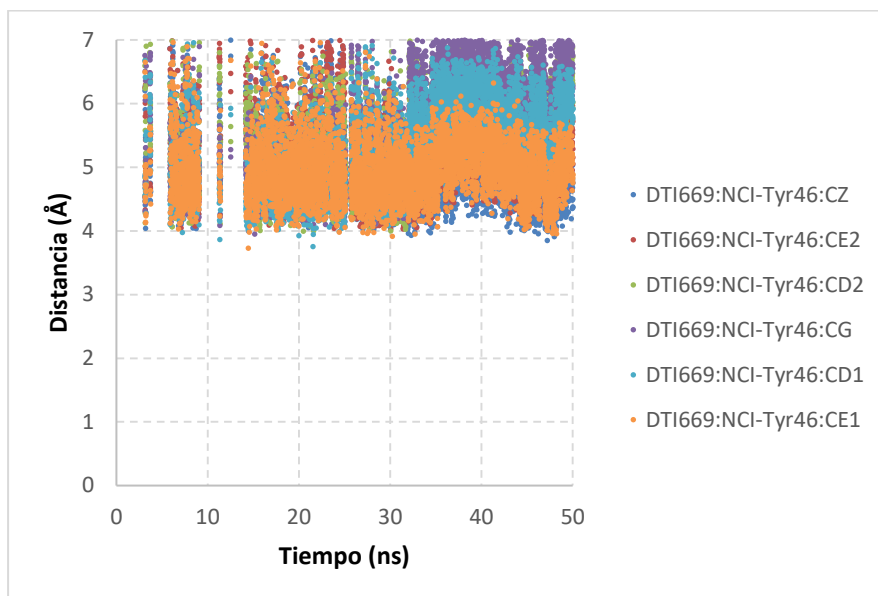
En la Tabla IV. 8 se presentan los enlaces de hidrógeno que DTI establece a lo largo de la DM y el porcentaje de ocupación de los mismos.

Tabla IV. 8 – Enlaces de Hidrógeno establecidos por DTI (DTI699) a lo largo de la DM. CP – cadena principal, CL – cadena lateral.

Dador	Aceptor	Ocupación (%)	Dador	Aceptor	Ocupación (%)
eEF2-Asn584 (CL)	eEF2-DTI699 (CP)	28,63	eEF2-HIS583 (CL)	eEF2-DTI699 (CL)	1,97
eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-DTI699 (CL)	0,47	eEF2-HIS694 (CL)	eEF2-DTI699 (CL)	0,14
eEF2-DTI699 (CP)	eEF2-Asp696 (CP)	1,41	NAD <sup>+</sup>	eEF2-DTI699 (CL)	13,47
DT-Asn69 (CL)	eEF2-DTI699 (CL)	0,83	DT-GLY44 (CP)	eEF2-DTI699 (CL)	0,26
eEF2-Asn581 (CL)	eEF2-DTI699 (CL)	6,46	DT-Gln43 (CL)	eEF2-DTI699 (CL)	2,16
eEF2-DTI699 (CP)	eEF2-Asp696 (CL)	0,33	DT-Asn45 (CP)	eEF2-DTI699 (CL)	0,09
eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-DTI699 (CP)	0,03	eEF2-GLY701 (CP)	eEF2-DTI699 (CP)	0,01
eEF2-DTI699 (CL)	eEF2-HIS583 (CL)	0,76			

Nuevamente consideramos únicamente los enlaces en los que participa la cadena lateral de DTI y que presentan una ocupación mayor al 1%. Los mismos son como aceptor de enlaces de hidrógeno, por medio de su grupo carboxilato frente a las cadenas laterales Asn581 e His583 de eEF2 en sus átomos ND2 y NE2 respectivamente, así como con Gln43 (NE2) de DT y nuevamente con O3D de uno de los grupos OH de NAD<sup>+</sup>.

La DTI posee el mismo grupo trimetil-amonio que DTA, por lo que realizamos una vez más el análisis de distancias entre su nitrógeno catiónico NCB y los carbonos del anillo de la Tyr46. Los resultados se pueden ver en el Gráfico IV. 13.

Gráfico IV. 13 – Interacción catión –  $\pi$ , DTI - Tyr46.

En este caso la interacción con la Tyr46 se da a lo largo de casi toda la trayectoria con un porcentaje de ocupación de 72,07%. Esto se debe seguramente a que el catión de trimetil-amonio se encuentra más ávido de electrones al haber un grupo carboxilato a un carbono de distancia, en lugar del carbonilo del grupo amida presente en DTA. Esta interacción provocará que la DTI se mantenga extendida durante casi toda la trayectoria o al menos “tironeada” por la tirosina del L3.

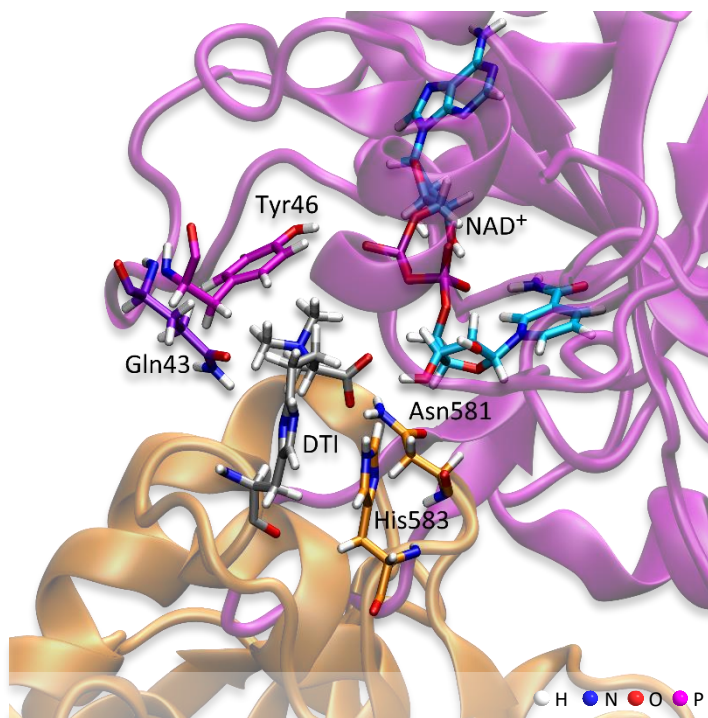


Figura IV. 20 – DTI y compuestos con los cuáles interacciona. El color de los C se corresponde con los gráficos de interacciones.



En la Figura IV. 20 se pueden observar DTI, NAD<sup>+</sup> y los aminoácidos responsables de las principales interacciones. En los Gráfico IV. 14 y Gráfico IV. 15 se presentan las mismas en función del tiempo de corrida.

Gráfico IV. 14 – Interacciones de la DTI en función del tiempo de la DM (de fondo en gris el RMSD de la DTI).

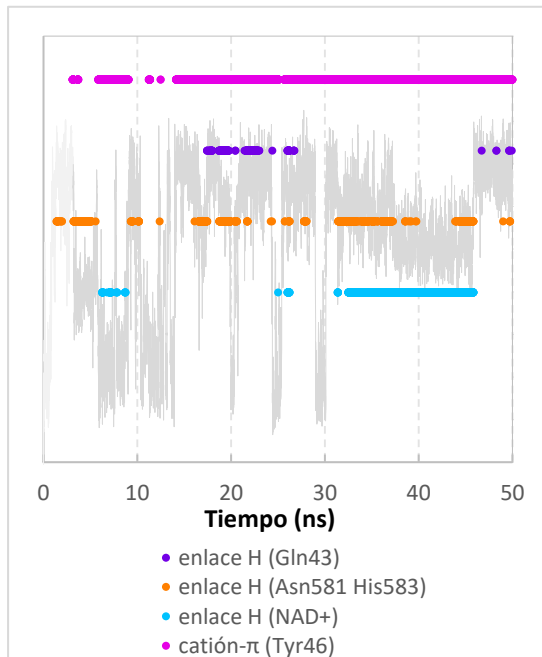
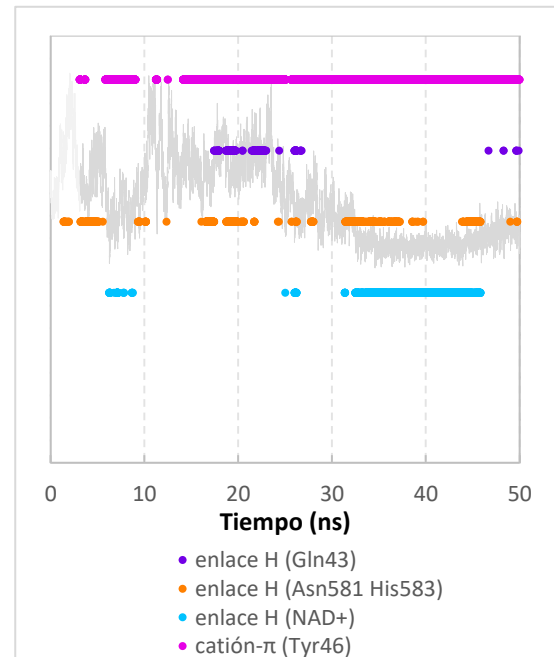


Gráfico IV. 15 – Interacciones de la DTI en función del tiempo de la DM (de fondo en gris la distancia ND1 – C1D).



Como se puede ver en los gráficos el grupo carboxilato de la DTI le permite interactuar tanto con Asn581 e His583 del eEF2, así como con NAD<sup>+</sup> y Gln43 del L3 de la DT. La interacción con la Tyr46 provoca que la DTI no se pueda anclar completamente como sucedía con la DTA y así el carboxilato tiene relativa libertad para girar en torno al carbono que lo une al trimetil-amonio. Esto es lo que ocasiona los saltos en el RMSD y cuando esto es acompañado con la formación del enlace de Hidrógeno con la Gln43 se genera el alejamiento entre ND1 y C1D. Si bien las interacciones con Asn581 e His583 son intermitentes, hay momentos en los que DTI se logra aproximar lo suficiente al NAD<sup>+</sup> como para establecer interacciones por periodos bastante extensos. Si a esto le sumamos que DTI se encuentra extendida por causa de la tirosina, seguramente sea posible que ocurra la reacción de ribosilación. Aunque la ventana para que esto ocurra probablemente sea más corta debido al alejamiento que provoca la acción de la Gln43 sobre el carboxilo de la DTI. En la Figura IV. 21 se presenta el último paso de la DM.

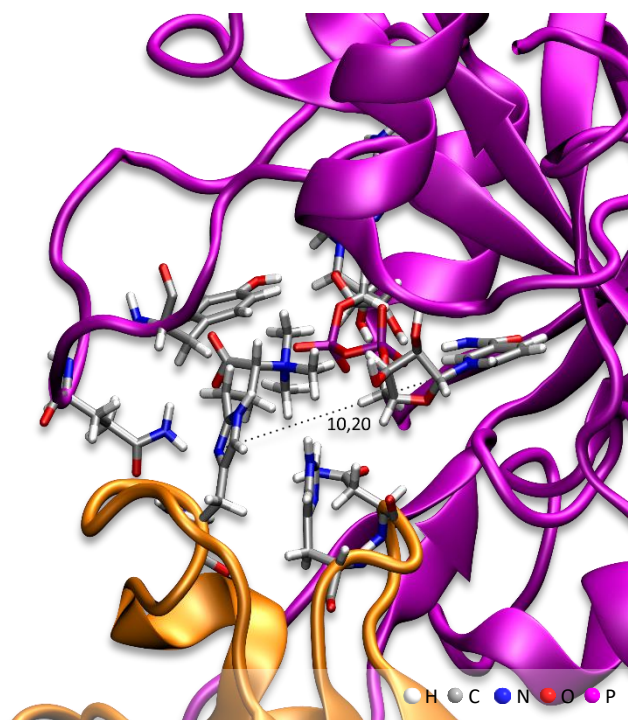
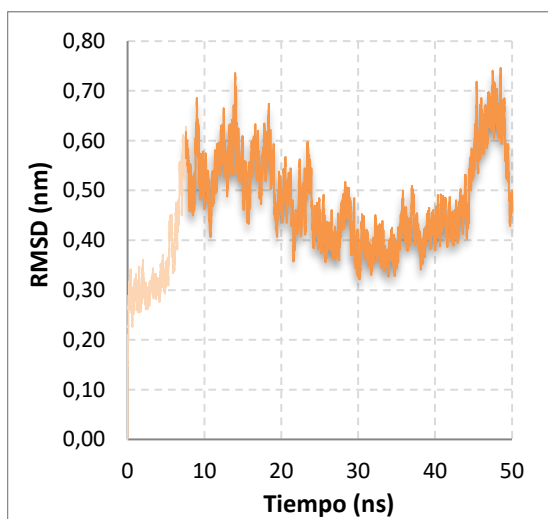


Figura IV. 21 – Instantánea de la DM de DTA a los 50 ns de corrida. Residuos destacados en representación de tubos.

### 3.9 DM DT-eEF2 (ACP)

Gráfico IV. 16 – RMSD cadenas principales de eEF2 (ACP) y DT con L4 modificado.



El RMSD de las cadenas principales a lo largo de la corrida de DM se presenta en el Gráfico IV. 16. Asumimos que la estabilización de las mismas culmina a los 7,58 ns y que lo que le sigue es la etapa de producción. En torno de los 48 ns se puede observar un salto, que lo atribuimos a una leve rotación de una cadena respecto a la otra y que culmina con ambas estructuras en la misma posición relativa previa a dicho movimiento.

En los Gráfico IV. 17 y Gráfico IV. 18 se puede observar el RMSD del aminoácido ACP y la distancia entre el ND1 (ACP) y C1D (NAD<sup>+</sup>) a lo largo de la corrida respectivamente. El RMSD tiene una tendencia descendente, lo que tal vez, pueda implicar que el ACP con el avance de la corrida se encuentre cada vez más retenido. La distancia en tanto parece estabilizarse rápidamente en el entorno de 9 a 10 Å, con excepción del salto al cual hacíamos referencia previamente.

Gráfico IV. 17 – RMSD de ACP.

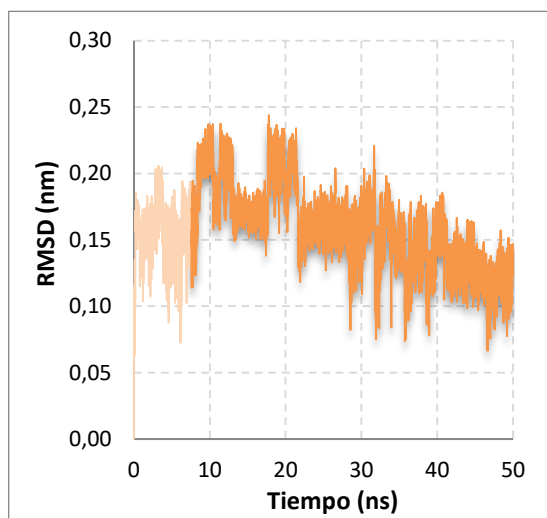
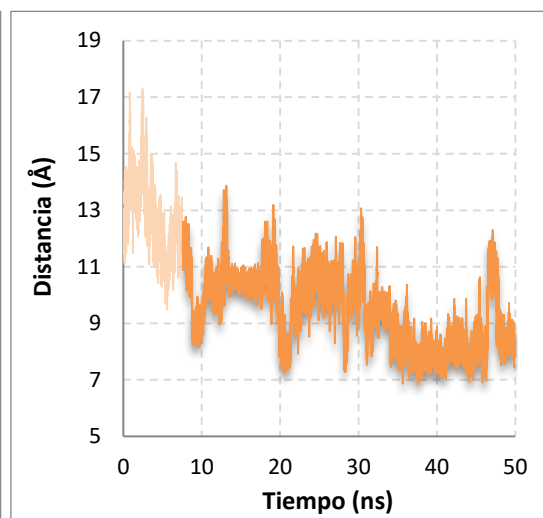


Gráfico IV. 18 – Distancia entre ND1 de ACP y C1D de NAD<sup>+</sup>.



### 3.9.1 Análisis de Interacciones

En la Tabla IV. 9 se presentan los enlaces de hidrógeno que ACP establece a lo largo de la DM y el porcentaje de ocupación de los mismos.

Tabla IV. 9 – Enlaces de Hidrógeno establecidos por ACP (ACP699) a lo largo de la DM. CP – cadena principal, CL – cadena lateral.

Dador	Aceptor	Ocupación (%)
eEF2-Asn584 (CL)	eEF2-ACP699 (CP)	38,11
eEF2-ACP699 (CL)	eEF2-Asp696 (CL)	1,97
eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-ACP699 (CP)	0,2
DT-Tyr46 (CL)	eEF2-ACP699 (CL)	0,08
eEF2-ACP699 (CL)	DT-Asn45 (CL)	2,27
eEF2-ACP699 (CL)	DT-Tyr46 (CL)	0,04
eEF2-ACP699 (CL)	DT-Asn45 (CP)	1,59
eEF2-His694 (CL)	eEF2-ACP699 (CL)	0,95
eEF2-ACP699 (CP)	eEF2-Asp696 (CP)	3,39
eEF2-Asn581 (CL)	eEF2-ACP699 (CL)	3,07
eEF2-His583 (CL)	eEF2-ACP699 (CL)	0,74
eEF2-ACP699 (CL)	eEF2-Asn581 (CL)	3,55

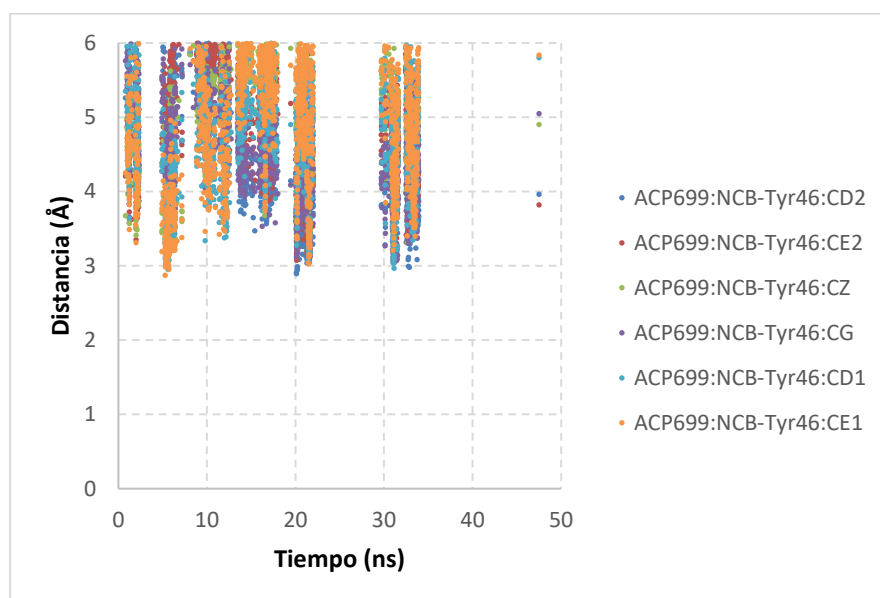
Dador	Aceptor	Ocupación (%)
DT-Asn45 (CL)	eEF2-ACP699 (CL)	23,82
NAD <sup>+</sup>	eEF2-ACP699 (CL)	3,55
eEF2-ACP699 (CP)	eEF2-Asp696 (CL)	0,17
eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-ACP699 (CL)	2,38
eEF2-ACP699 (CL)	NAD <sup>+</sup>	6,39
eEF2-ACP699 (CL)	eEF2-Ile698 (CP)	3,78
DT-GLY44 (CP)	eEF2-ACP699 (CL)	2,69
DT-Tyr46 (CP)	eEF2-ACP699 (CL)	0,34
DT-Asn45 (CP)	eEF2-ACP699 (CL)	10,51
DT-Gln43 (CL)	eEF2-ACP699 (CL)	0,03
eEF2-ACP699 (CL)	DT-Gln43 (CL)	0,05
eEF2-ACP699 (CL)	DT-Thr42 (CP)	2,04

En el caso de ACP la red de enlaces de Hidrógeno relevantes (con ocupaciones mayores al 1%) que conforma, es más intrincada/compleja que para la DTA o la DTI. Y se compone de la siguiente manera: en forma de dador, por medio de los hidrógenos de su grupo amonio con Asp696 (grupo carboxilato), Asn581 (grupo carbonilo, cadena lateral) e Ile698 (grupo carbonilo, cadena principal) del eEF2; Asn45 (grupos carbonilos de cadena lateral y principal) y Thr42 (grupo carbonilo, cadena principal) del L3 de la DT

y con  $\text{NAD}^+$  (con el O3D de uno de sus OH y con O2N de uno de sus grupos fosfato). Como aceptor con su grupo carboxilo con: Asn581 (grupo amina, cadena lateral) y Gln704 (grupo amina, cadena lateral) del eEF2; Asn45 (grupos amina, cadenas lateral y principal) y Gly44 (grupo amina, cadena principal) del L3 de la DT y con  $\text{NAD}^+$  (con el O3D de uno de sus OH). También en forma de dador por medio del ND1 de su porción histidina con el grupo amina lateral de Gln704.

ACP posee un catión amonio en lugar del trimetil amonio que presentaban tanto la DTA como la DTI. El cual también es susceptible de establecer interacciones del tipo catión  $-\pi$  con la Tyr46 del L3. Es así que nuevamente realizamos el análisis correspondiente, pero en esta ocasión con la condición de que las distancias fuesen menores a 6 Å, en concomitancia con el cambio en el grupo catiónico.<sup>33</sup> El mismo se presenta en el Gráfico IV. 19.

Gráfico IV. 19 – Interacción catión  $-\pi$ , ACP - Tyr46.



Las principales interacciones catión  $-\pi$  se concentran en la primera mitad de la corrida y en menor medida que en el caso de la DTI. Este hecho se ve reflejado en el porcentaje de ocupación, el cual es de 17,32%. Como hemos planteado previamente la función de Tyr46 en los casos de la DTA y la DTI era extender dichas cadenas promoviendo el cambio de conformación cerrada a abierta. En el presente caso el número de enlaces de hidrogeno que establece la ACP es tal que un cambio de esta clase promovido por una única interacción de tipo catión  $-\pi$  difícilmente sea viable.

En la Figura IV. 22 se pueden observar ACP,  $\text{NAD}^+$  y los aminoácidos responsables de las principales interacciones. En el Gráfico IV. 20 y el Gráfico IV. 21 se presentan las mismas en función del tiempo de corrida.

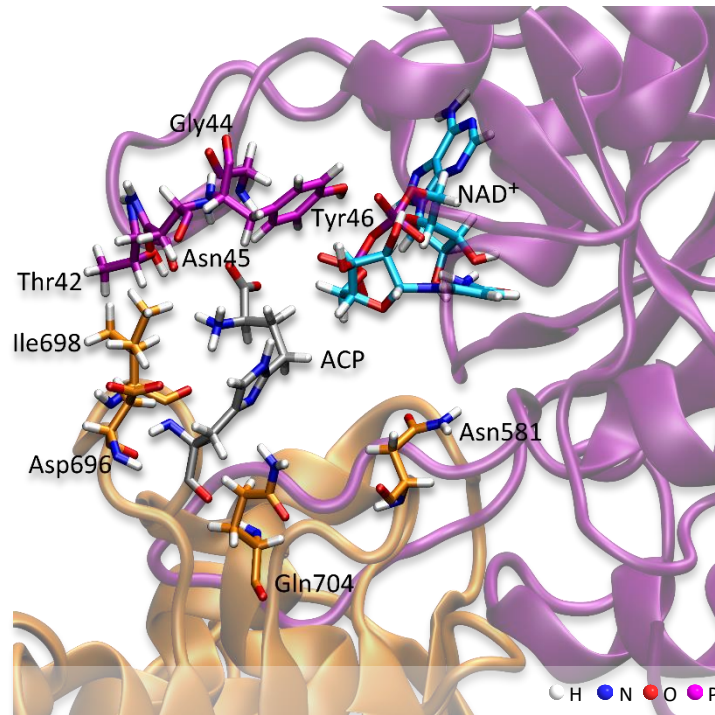
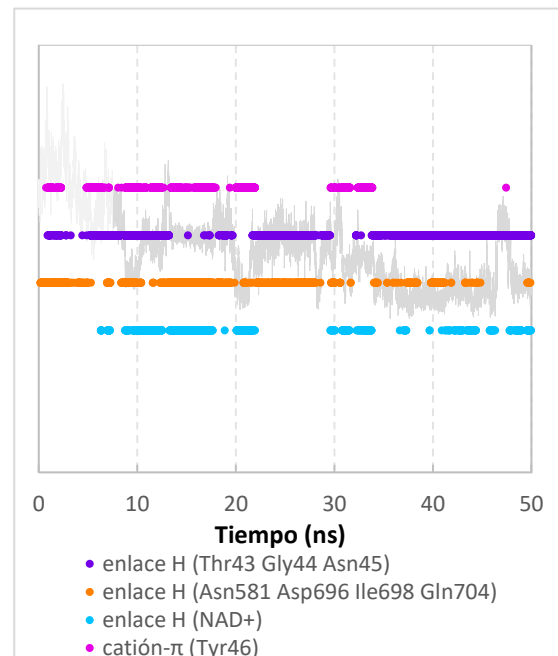
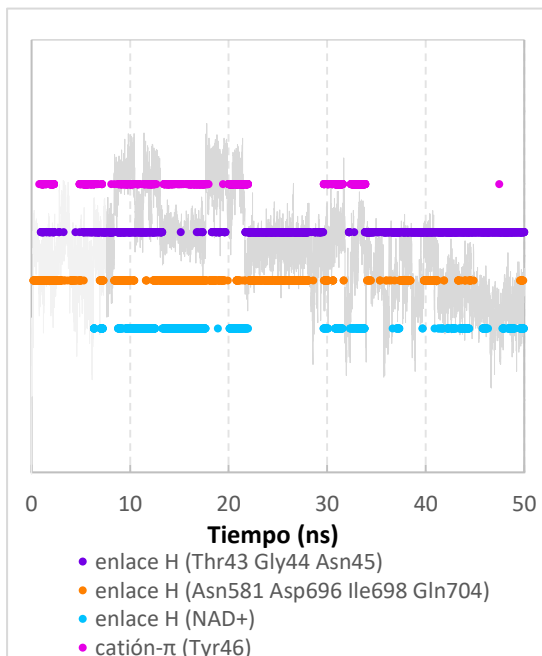


Figura IV. 22 – ACP y compuestos con los cuáles interacciona. El color de los C se corresponde con los gráficos de interacciones.

Gráfico IV. 20 – Interacciones de la ACP en función del tiempo de la DM (de fondo en gris el RMSD de la DTI).

Gráfico IV. 21 – Interacciones de la ACP en función del tiempo de la DM (de fondo en gris la distancia ND1 – C1D).



Como se puede observar, ACP establece un alto número de interacciones a lo largo de la mayor parte de la trayectoria. Su RMSD tiende a disminuir a medida que transcurre la simulación debido a que la cadena lateral del residuo se ve cada vez más limitada en cuanto a su posibilidad de movimiento. La falta de los metilos que se encontraban en

el amonio (en la DTA y la DTI) le permite establecer nuevas interacciones tanto con las cadenas laterales de los aminoácidos del eEF2 y con los del L3 de la DT. Además, su impedimento estérico se ve reducido, posibilitándole posicionarse de forma más favorable dentro del espacio interproteico. En la Figura IV. 23 se puede observar uno de los últimos pasos de la DM, se destaca la forma en la que la cadena lateral se encuentra retenida y la presencia del enlace de Hidrógeno entre el Nitrógeno ND1 y Gln704.

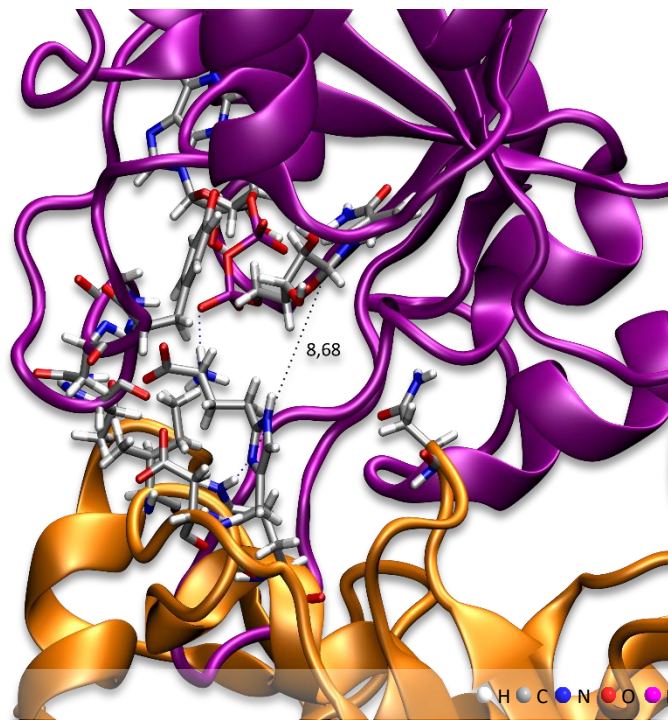
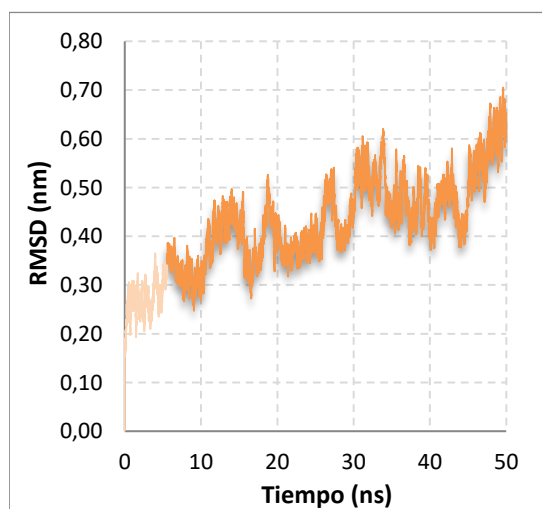


Figura IV. 23 – Instantánea de la DM de ACP a los 50 ns de corrida. Residuos destacados en representación de tubos.

### 3.10 DM DT-eEF2 (HIS)

Gráfico IV. 22 – RMSD cadenas principales de eEF2 (HIS) y DT con L4 modificado.



El valor de RMSD (Gráfico IV. 22) tiene una tendencia ascendente a lo largo de toda la dinámica, a partir de los 5,5 ns consideramos que la estructura se encuentra estabilizada. Esta tendencia se debe a que ambas cadenas se alejan de forma constante durante el tiempo de simulación, hecho que se evidencia en el Gráfico IV. 24.

En el Gráfico IV. 23 se observa como la HIS se mueve libremente durante toda la trayectoria, lo que indica que seguramente no establezca interacciones significativas que la



retengan, entendemos que como consecuencia de esto es que tal vez la DT no consiga aproximarse al eEF2. Otra característica de la que carece es de la presencia de un catión amonio como en el caso los residuos modificados (DTA, DTI y ACP), que como hemos visto establecía una importante interacción con la Tyr46 del L3 de la DT.

Gráfico IV. 23 – RMSD de HIS

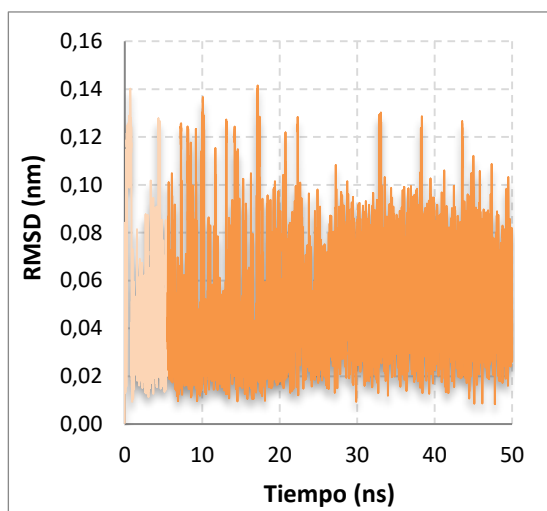
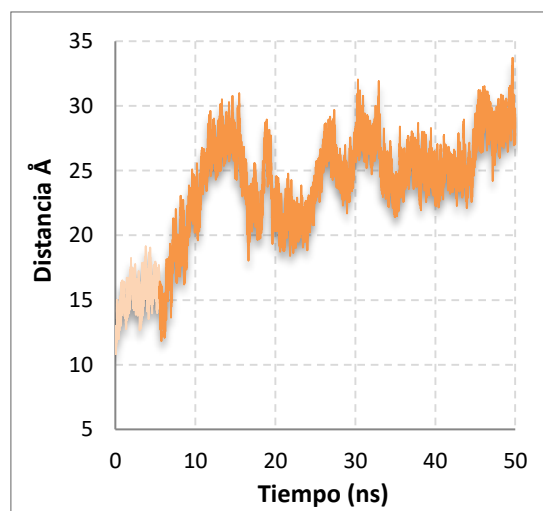


Gráfico IV. 24 – Distancia entre ND1 de HIS y C1 de NAD<sup>+</sup>



### 3.10.1 Análisis de interacciones

En la Tabla IV. 10 se presentan los enlaces de hidrógeno que HIS establece a lo largo de la DM y el porcentaje de ocupación de los mismos.

Tabla IV. 10 – Enlaces de Hidrógeno establecidos por HIS (HIE699) a lo largo de la DM. CP – cadena principal, CL – cadena lateral.

Dador	Aceptor	Ocupación (%)	Dador	Aceptor	Ocupación (%)
eEF2-HIE699 (CP)	eEF2-Asp696 (CP)	2,25	eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-HIE699 (CP)	0,05
eEF2-Asn584 (CL)	eEF2-HIE699 (CP)	38,62	eEF2-HIE699 (CL)	eEF2-His583 (CL)	0,05
eEF2-Asn581 (CL)	eEF2-HIE699 (CL)	0,03	eEF2-HIE699 (CP)	eEF2-Asp696 (CL)	0,53
eEF2-Gln704 (CL)	eEF2-HIE699 (CL)	0,03	eEF2-Asp696 (CP)	eEF2-HIE699 (CL)	0,01

Como se puede ver la HIS no establece ningún tipo de enlace de hidrógeno relevante (mayor al 1%) por medio de su cadena lateral a lo largo de la simulación. De hecho, no establece ningún tipo de interacción, ya que tampoco posee un catión por medio del cual interactuar con la Tyr46.

En la Figura IV. 24-A se muestra la estructura inicial de la DM, comparándola con la instantánea del final de la simulación (Figura IV. 24-B) se ve claramente cómo ambas cadenas se separan y que la distancia entre la HIS y el NAD<sup>+</sup> es cercana a los 30 Å. Estudiando con detenimiento la DM se puede observar como al principio de la corrida la Tyr46 permanece suspendida sobre el área donde se encuentra la HIS y se mueve en

esta zona por alrededor de unos 7 ns, luego se retira sin haber logrado establecer ningún tipo de interacción, no como sí lo hacía con los cationes amonio de DTA, DTI y ACP. Este alejamiento provoca que todo el L3 se desplace, generando un cambio en la estructura de la DT que a su vez pareciera ser la razón del distanciamiento de las cadenas.

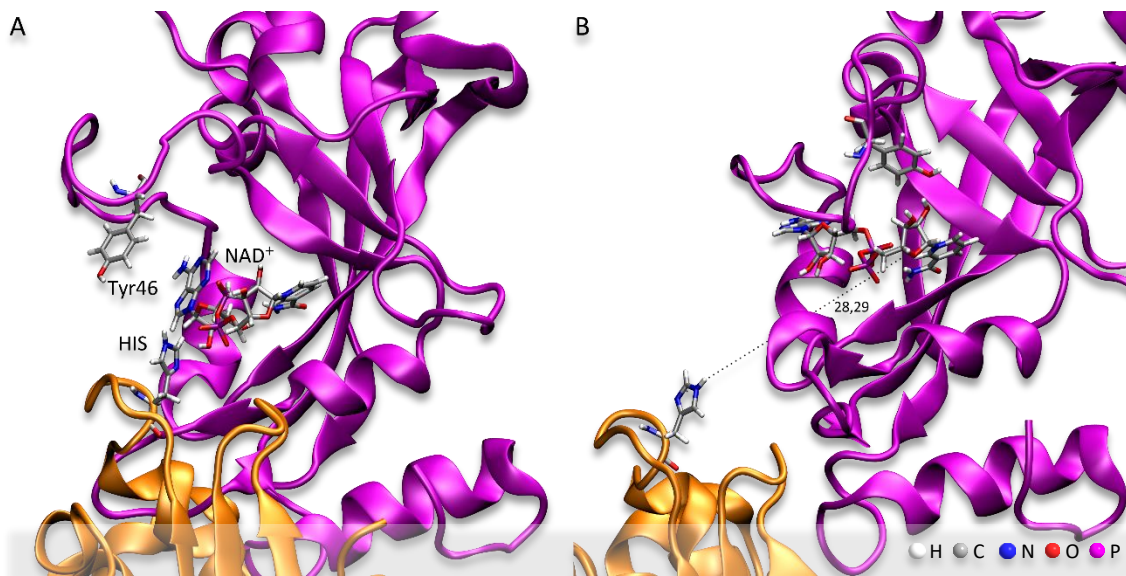
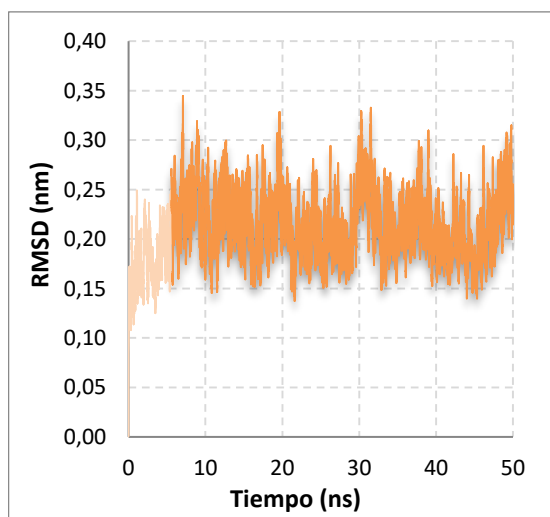


Figura IV. 24 – (A) Estructura inicial de HIS. (B) Instantánea de la DM de HIS a los 50 ns de corrida. Residuos destacados en representación de tubos.

### 3.11 DM DT (ADP-R/NIC) – eEF2 (DTA)

Gráfico IV. 25 – RMSD cadenas principales de eEF2 (DTA) y DT (ADP-R y NIC) con L4 modificado.



Pretendiendo profundizar nuestros estudios respecto al sistema realizamos una nueva corrida partiendo del último paso de la DM realizada en 3.7, pero rompiendo el enlace entre la ADP-ribosa (ADP-R) y la nicotinamida (NIC) del  $\text{NAD}^+$ . De esta manera es que intentamos aproximarnos a la representación de lo que ocurriría si la reacción de ADP-ribosilación transcurriese por medio de un mecanismo de tipo  $\text{S}_{\text{N}}1$ , como se postula. En el Gráfico IV. 25 se presenta el RMSD de las cadenas principales en función del tiempo de simulación. Consideramos que el sistema se estabilizó luego de los 5 ns y que de allí

en más nos encontramos en la etapa de producción de la dinámica.



Como se observa en el Gráfico IV. 26 la distancia entre ND1 y C1D se mantiene la mayor parte de la trayectoria en el entorno de los 7 Å. Aunque hay momentos en los que la misma es cercana a 5 Å, e incluso llega a aproximarse a los 4 Å. Como evidencia la Figura IV. 25-A la posición de los átomos (ND1 y C1D) sería adecuada como para que pudiese llegar eventualmente a ocurrir la reacción entre ellos. Este sería un buen punto de partida para estudios QM o QM/MM. Consideramos esto como un indicio más de que el tipo de mecanismo que se propone es el indicado. En la Figura IV. 25-B se presenta la posible vía de salida de la nicotinamida.

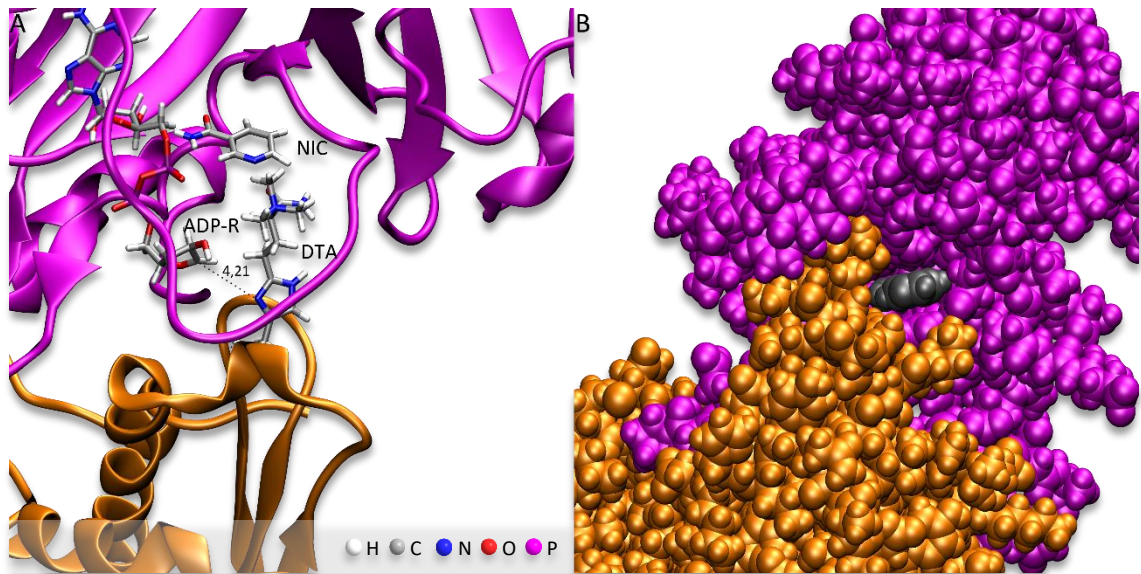
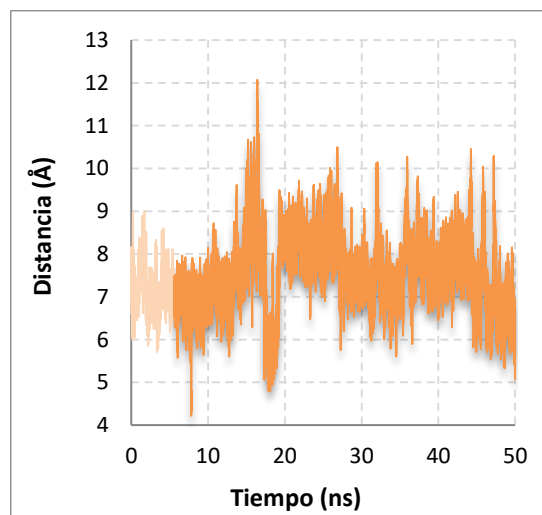


Figura IV. 25 – (A) Distancia entre ND1 de DTA y C1D de ADP-R. Residuos destacados en representación de tubos. (B) Posible vía de salida de NIC (en gris). Representación VdW.

Gráfico IV. 26 – Distancia entre ND1 de DTA y C1D de ADP-R.



## 4 BASE DE DATOS DE DIANAS BIOLÓGICAS

Con el fin de proveer un marco de prueba para identificar la posible toxicidad u efectos colaterales de los candidatos a inhibidores que derivan de estudios de VHTS es que nos propusimos generar una base de datos de dianas biológicas para ser utilizada en estudios de *docking* inverso.

Para su elaboración seleccionamos de forma individual estructuras candidatas pertenecientes a la base de datos RCSB-PDB,<sup>1</sup> teniendo en cuenta que proviniesen de *Homo sapiens*, que no contuviesen mutaciones y que se conociesen efectos secundarios producto de su inhibición<sup>34</sup>. En esta primera etapa recolectamos 1103 pdb en total, entre los cuales podía haber más de una estructura por clase de proteína. Prepararlas todas carecía de sentido, ya que no solo el proceso de *docking* crecería en complejidad y con ello el costo computacional, sino que, además, obtendríamos información redundante. Por ello en una segunda etapa realizamos un filtrado con el objetivo de retener únicamente la mejor representante de cada grupo. La selección priorizó; estructuras con inhibidor o sustrato, así como que fuesen producto de estudios de RMN sobre difracción de rayos X y mejor resolución cuando corresponda. Como resultado de este proceso culminamos con los 111 pdb de las proteínas que conforman nuestra base de datos.

Estas 111 estructuras fueron preparadas con el *Protein Preparation Wizard* incluido en Maestro, parte del paquete de software Schrödinger.<sup>35</sup> Posteriormente se generaron las cuadrículas que representan sus sitios activos con *Receptor Grid Generator* (Maestro). En los casos que se contaba con inhibidores o sustratos estos fueron tomados como referencia. En los que no, se utilizó *Site Finder* del software MOE<sup>2</sup> para identificar las zonas más relevantes y sobre las que luego se generaron las cuadrículas.

El listado de las estructuras incluidas en la base de datos y su clasificación está disponible en el Anexo C. Allí mismo también se puede encontrar un grupo de proteínas para las cuales no se encontraron estructuras que cumpliesen con los criterios de selección, pero que consideramos importante incluir en una futura versión.

## 5 DOCKING INVERSO

Habiendo culminado la base de datos de dianas biológicas estaríamos en condiciones de comenzar los estudios de *docking* inverso. Sin embargo, aún no hemos logrado discernir una manera concreta para normalizar los resultados de *score* de forma que sean comparables entre las diferentes estructuras proteicas. Se decidió, por lo tanto, no comenzar a realizar pruebas a tuestas, ya que implicarían una cantidad de tiempo de trabajo considerable y probablemente el desperdicio de valiosos recursos computacionales. Si bien conocemos métodos de normalización de *score*, estos son para receptores con sitios activos semejantes,<sup>36</sup> lo que carece de validez para un grupo de proteínas tan diversas como el comprendido en nuestra base de datos.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E., The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.
2. *Molecular Operating Environment*, version 2011.10; Montreal, QC, 2011.
3. Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A., How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049-1074.
4. Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G., ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757-1768.
5. Suree, N.; Liew, C. K.; Villareal, V. A.; Thieu, W.; Fadeev, E. A.; Clemens, J. J.; Jung, M. E.; Clubb, R. T., The structure of the *Staphylococcus aureus* sortase-substrate complex reveals how the universally conserved LPXTG sorting signal is recognized. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 24465-24477.
6. Mazmanian, S. K.; Liu, G.; Hung, T. T.; Schneewind, O., *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **1999**, *285*, 760-763.
7. Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Faull, K. F.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH<sub>2</sub>-Gly(3) substrates. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9876-9881.
8. Mazmanian, S. K.; Hung, I. T.; Schneewind, O., Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **2001**, *40*, 1049-1057.
9. Perry, A. M.; Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—III. Lipid II is an in vivo peptidoglycan substrate for sortase-catalyzed surface protein anchoring. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16241-16248.
10. Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Alksne, L.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 7447-7452.
11. Marraffini, L. A.; Ton-That, H.; Zong, Y. N.; Narayana, S. V. L.; Schneewind, O., Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*—a conserved arginine residue is required for efficient catalysis of sortase A. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37763-37770.
12. Frankel, B. A.; Kruger, R. G.; Robinson, D. E.; Kelleher, N. L.; McCafferty, D. G., *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA: insight into the kinetic mechanism and evidence for a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry* **2005**, *44*, 11188-11200.

13. Frankel, B. A.; Tong, Y.; Bentley, M. L.; Fitzgerald, M. C.; McCafferty, D. G., Mutational analysis of active site residues in the *Staphylococcus aureus* transpeptidase SrtA. *Biochemistry* **2007**, 46, 7269-7278.
14. Bentley, M. L.; Lamb, E. C.; McCafferty, D. G., Mutagenesis studies of substrate recognition and catalysis in the sortase A transpeptidase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 14762-14771.
15. *Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2: Glide*, 6.7; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2015.
16. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S., Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1739-1749.
17. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L., Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1750-1759.
18. Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T., Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6177-6196.
19. Banks, J. L.; Beard, H. S.; Cao, Y.; Cho, A. E.; Damm, W.; Farid, R.; Felts, A. K.; Halgren, T. A.; Mainz, D. T.; Maple, J. R.; Murphy, R.; Philipp, D. M.; Repasky, M. P.; Zhang, L. Y.; Berne, B. J.; Friesner, R. A.; Gallicchio, E.; Levy, R. M., Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1752-1780.
20. *Small-Molecule Drug Discovery Suite 2013-1: Glide*, 5.9; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2013.
21. Krieger, E. *Yet Another Scientific Artificial Reality Application (YASARA)*, 2004.
22. <http://www.yasara.org/homologymodeling.htm>
23. Billod, J.-M.; Saenz-Mendez, P.; Blomberg, A.; Eriksson, L. A., Structures, Properties, and Dynamics of Intermediates in eEF2-Diphthamide Biosynthesis. *Journal of chemical information and modeling* **2016**, 56, 1776-1786.
24. Walker, R. C.; de Souza, M. M.; Mercer, I. P.; Gould, I. R.; Klug, D. R., Large and fast relaxations inside a protein: Calculation and measurement of reorganization energies in alcohol dehydrogenase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106, 11658-11665.
25. Pavelites, J. J.; Gao, J.; Bash, P. A.; Mackerell Jr, A. D., A molecular mechanics force field for NAD<sup>+</sup> NADH, and the pyrophosphate groups of nucleotides. *Journal of computational chemistry* **1997**, 18, 221-239.
26. Ryde, U., On the role of Glu-68 in alcohol dehydrogenase. *Protein science* **1995**, 4, 1124-1132.

27. Frisch, M.; Trucks, G.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G.; Robb, M.; Cheeseman, J.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G., Gaussian 09, revision a. 02, gaussian. Inc., Wallingford, CT **2009**, 200.
28. Case, D.; Babin, V.; Berryman, J.; Betz, R.; Cai, Q.; Cerutti, D.; Cheatham III, T.; Darden, T.; Duke, R.; Gohlke, H., In; 2014.
29. Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E., GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, 1, 19-25.
30. VanRossum, G.; Drake, F. L., *The python language reference*. Python Software Foundation Amsterdam, Netherlands: 2010.
31. Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J. L.; Dror, R. O.; Shaw, D. E., Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2010**, 78, 1950-1958.
32. Grauffel, C. d.; Yang, B.; He, T.; Roberts, M. F.; Gershenson, A.; Reuter, N., Cation- $\pi$  interactions as lipid-specific anchors for phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135, 5740-5750.
33. Burley, S.; Petsko, G., Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS letters* **1986**, 203, 139-143.
34. Chen, Y.; Ung, C., Prediction of potential toxicity and side effect protein targets of a small molecule by a ligand-protein inverse docking approach. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2001**, 20, 199-218.
35. Release, S., 2, maestro, version 10.2, Schrödinger, LLC, New York, 2015. *There is no corresponding record for this reference* **2015**.
36. Saenz-Méndez, P.; Eriksson, M.; Eriksson, L. A., Ligand Selectivity between the ADP-Ribosylating Toxins: An Inverse-Docking Study for Multitarget Drug Discovery. *ACS Omega* **2017**, 2, 1710-1719.



---

# CAPÍTULO V

---

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS





## 1 SORTASA A

Se obtuvieron cuatrocientos candidatos a inhibidores de SrtA. Estos son el resultado del VHTS de dos subconjuntos de la base de datos ZINC (“Clean Fragment-like” y Clean Lead-like”), los cuales constan de 7.076.569 (a la fecha de descarga 05/11/2013) estructuras, frente a dos modelos del sitio activo. Los mismos contemplan las tres posibilidades que se especulan sobre el funcionamiento del mecanismo de acción de la sortasa. En general todos estos ligandos superan en *score* a LPATG y a LPAT\*.

Producto de los estudios de VHTS hemos desarrollado sendos modelos farmacofóricos y mapas de interacción, estos datos nos proporcionan nociones bastante claras de que características son deseables o importantes en un eventual inhibidor. Además son de gran utilidad a la hora de realizar filtrados de nuevas bases de datos de posibles ligandos, así como para desarrollar/modificar potenciales candidatos.

Los residuos más importantes de SrtA a considerar referentes a su inhibición parecen ser: Arg197, Ile182, Val168, Val166, Asp165, Thr164, Pro163 y Ala104

Poseemos modelos y protocolos claros que nos facilitan, de ser necesaria, la realización de nuevos estudios de VHTS en SrtA.

## 2 TOXINA DIFTÉRICA

Hemos obtenido un modelo que explica razonablemente la interacción entre la DT y el eEF2, además establecimos la importancia de los lazos (L3 y L4) de la toxina a la hora de desarrollar su actividad frente al eEF2.

La modificación de la conformación del L4, respecto a la que presenta la estructura cristalina (1TOX), nos permitió describir correctamente la interacción entre la DT y el eEF2 dando muestra de la relevancia que tiene para la misma. De esta manera, se presenta como un posible blanco a tener en cuenta a la hora de intentar impedir la acción de la toxina.

La Tyr46 que forma parte del L3 ha demostrado ser de vital importancia para el mecanismo de acción de la DT. Siendo la responsable de la transición entre las conformaciones abierta y cerrada de la DTA y de la DTI. La interacción catión –  $\pi$  que establece con los cationes amonio de los diferentes residuos (DTA, DTI y ACP), se encuentra en un delicado equilibrio con los diferentes enlaces de hidrógeno que estos logran formar con Gln704 y Asn581 (entre otros en la cercanía) y que en última instancia son los responsables de la existencia de conformación cerrada del aminoácido. Al parecer, este equilibrio es la clave para que la DT pueda llevar a cabo la reacción de ADP-ribosilación de forma efectiva, en tanto que los extremos parecen obstaculizarla (el caso de la DTI) e incluso hasta impedirla (ACP). Pero ciertamente la Tyr46 debe ser capaz en primera instancia de instaurar ese tipo de interacción para que ambas estructuras permanezcan unidas y posteriormente de extender el residuo para que la

reacción pueda transcurrir. Intentar interferir con la acción de esta tirosina puede ser otro ángulo a tener en cuenta al momento de desarrollar estrategias que tengan como objetivo inhibir la función de este agente bacteriano.

La DTI metilada quedo fuera de nuestros estudios dado que su identificación es relativamente reciente. Habiendo discernido de manera relativamente clara el método de acción de la de la DT es que nos sentimos en condiciones de incorporarla a fin de vaticinar su comportamiento.

Los resultados arrojados por la dinámica que carecía de enlace entre la nicotinamida y la ADP-ribosa de  $\text{NAD}^+$ , en principio estarían confirmando el mecanismo de reacción  $\text{S}_{\text{N}}1$  propuesto. Si bien no son definitivos, poseemos un punto de partida más que aceptable para estudios de QM o QM/MM.

Contamos con un modelo adecuado de la DT y bastante información sobre su mecanismo de acción frente al eEF2 como para realizar futuros estudios de VHTS con el mismo. Asimismo con estos resultados realizamos un manuscrito que ya está pronto para ser enviado.

### 3 BASE DE DATOS DE DIANAS BIOLÓGICAS

Construimos una base de datos de dianas biológicas que contiene 111 proteínas humanas de las cuales se conocen efectos negativos producto de su inhibición. La misma está lista para ser utilizada en estudios de *docking* molecular. Tanto como para verificar la posibilidad de toxicidad de un candidato farmacológico producto de los presentes estudios, así como de futuros.

La misma se encuentra en constante revisión y se pretende mantenerla y ampliarla.

### 4 DOCKING INVERSO

Si bien aún no hemos podido completar estos estudios por falta de una estrategia de normalización de *scores* clara para un grupo de receptores tan diverso, continuamos trabajando para desarrollarla y obtener resultados relevantes. Además pretendemos implementar una solución de software propia para el procesamiento de los resultados.

---

# ANEXO A

---

RESULTADOS VHTS SCHRÖEDINGER



## 1 CONTENIDO

2	ABREVIATURAS.....	97
3	MODELO 1 – CLEAN FRAGMENT LIKE .....	98
4	MODELO 1 – CLEAN LEAD LIKE .....	100
5	MODELO 2 – CLEAN FRAGMENT LIKE .....	102
6	MODELO 2 – CLEAN LEAD LIKE .....	105





## 2 ABREVIATURAS

GL-1	glide ligand efficiency
GL-2	glide ligand efficiency sa
GL-3	glide ligand efficiency ln
GL-4	glide evdw
GL-5	glide ecoul
GL-6	glide energy
GL-7	glide einternal
GL-8	glide emodel
XP-1	XP HBond
XP-2	XP PhobEnHB
XP-3	XP LowMW
XP-4	XP RotPenal
XP-5	XP LipophilicEvdW
XP-6	XP Electro
XP-7	XP Sitemap
XP-8	XP ExposPenal



## 3 MODELO 1 – CLEAN FRAGMENT LIKE

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
1	ZINC66323423	-7,729	-0,429	-1,125	-1,987	-23,907	-6,271	-30,178	1,564	-35,763	-2,499	-1,5	-0,5	0,125	-2,298	-0,47	-0,592	0,005
2	ZINC09476846	-7,39	-0,528	-1,272	-2,031	-16,815	-7,508	-24,324	0,559	-32,579	-2,645	-1,481	-0,5	0,19	-2,391	-0,563	0	0
3	ZINC13310997	-7,28	-0,52	-1,253	-2	-13,709	-20,679	-34,387	8,859	-41,936	-4,673	0	-0,5	0,491	-0,801	-1,551	-0,4	0,153
4	ZINC36047638	-7,023	-0,413	-1,062	-1,832	-20,206	-11,201	-31,407	2,884	-41,61	-2,684	-1,5	-0,5	0,263	-1,372	-0,84	-0,577	0,188
5	ZINC21960998	-6,808	-0,454	-1,119	-1,836	-18,636	-12,017	-30,653	0,786	-35,106	-2,427	-1,5	-0,5	0,472	-1,65	-0,901	-0,45	0,149
6	ZINC49582158	-6,777	-0,424	-1,067	-1,796	-15,855	-7,23	-23,085	3,433	-26,774	-1,778	-1,5	-0,5	0,314	-2,419	-0,542	-0,4	0,048
7	ZINC19702183	-6,588	-0,439	-1,083	-1,777	-22,796	-8,22	-31,016	0	-36,478	-1,58	-1,5	-0,5	0	-2,112	-0,616	-0,308	0,028
8	ZINC16025885	-6,566	-0,386	-0,993	-1,713	-28,442	-7,128	-35,569	0,539	-44,972	-1,625	-1,5	-0,5	0,264	-2,169	-0,535	-0,502	0
9	ZINC00359169	-6,558	-0,468	-1,129	-1,802	-20,124	-7,823	-27,948	4,653	-32,079	-2,497	-1,5	-0,5	0,352	-1,644	-0,587	-0,433	0,249
10	ZINC21985719	-6,54	-0,467	-1,126	-1,797	-19,281	-8,101	-27,382	0,227	-35,468	-2,049	-1,01	-0,5	0	-2,167	-0,608	-0,27	0,063
11	ZINC36047476	-6,483	-0,432	-1,066	-1,748	-20,988	-10,951	-31,939	0,789	-41,909	-2,427	-1,5	-0,5	0,139	-1,261	-0,821	-0,315	0,203
12	ZINC00394746	-6,453	-0,359	-0,94	-1,659	-24,291	-6,912	-31,203	3,404	-41,168	-2,7	0	-0,5	0,255	-2,873	-0,518	-0,117	0
13	ZINC04008783	-6,446	-0,46	-1,11	-1,771	-21,791	-7,745	-29,536	1,552	-38,908	-2,072	-1,5	-0,5	0	-0,872	-0,581	-0,991	0,07
14	ZINC05349662	-6,351	-0,397	-1	-1,683	-21,937	-8,677	-30,614	2,309	-40,367	-1,6	-1,5	-0,5	0,131	-1,304	-0,651	-0,927	0
15	ZINC00182954	-6,279	-0,483	-1,136	-1,761	-21,435	-8,149	-29,584	1,886	-36,791	-1,94	-1,5	-0,5	0,202	-1,678	-0,611	-0,305	0,053
16	ZINC00517324	-6,278	-0,349	-0,914	-1,614	-24,272	-11,77	-36,042	1,675	-46,475	-2,5	0	-0,5	0,243	-1,614	-0,883	-1,024	0
17	ZINC12520176	-6,276	-0,418	-1,032	-1,693	-21,231	-8,563	-29,795	0,586	-34,091	-1,6	-1,5	-0,5	0,166	-1,178	-0,642	-1,022	0
18	ZINC13827997	-6,255	-0,368	-0,946	-1,632	-27,836	-7,362	-35,198	0,786	-46,724	-1,625	-1,5	-0,5	0,264	-2,007	-0,552	-0,549	0,213
19	ZINC91692221	-6,252	-0,391	-0,985	-1,657	-16,419	-9,953	-26,372	5,84	-32,502	-2,7	0	-0,5	0,406	-1,912	-0,746	-0,799	0
20	ZINC20062128	-6,248	-0,446	-1,076	-1,717	-21,518	-8,372	-29,89	3,54	-36,556	-1,762	-1,5	-0,5	0,364	-1,989	-0,628	-0,291	0,058
21	ZINC49538672	-6,236	-0,346	-0,908	-1,603	-26,171	-7,055	-33,226	1,159	-42,768	-1,49	-1,5	-0,5	0,123	-1,551	-0,529	-1,058	0,269
22	ZINC01700210	-6,188	-0,413	-1,017	-1,669	-18,838	-11,635	-30,472	0,662	-39,761	-2,193	0	-0,5	0	-2,633	-0,873	0	0,011
23	ZINC01066238	-6,188	-0,413	-1,017	-1,669	-22,193	-7,441	-29,634	3,245	-35,318	-1,841	-1,302	-0,5	0,157	-0,982	-0,558	-1,162	0
24	ZINC15919415	-6,129	-0,34	-0,892	-1,575	-26,661	-7,816	-34,478	2,165	-44,683	-2,963	0	-0,5	0,372	-2,128	-0,586	-0,388	0,064
25	ZINC72120002	-6,123	-0,51	-1,168	-1,757	-19,208	-6,273	-25,481	6,274	-29,572	-1,569	-1,5	-0,5	0	-1,434	-0,47	-0,649	0
26	ZINC00319716	-6,104	-0,339	-0,889	-1,569	-22,436	-12,965	-35,401	0,582	-45,869	-2,466	0	-0,5	0,38	-2,546	-0,972	0	0
27	ZINC46087777	-6,093	-0,339	-0,887	-1,566	-29,514	-2,209	-31,723	4,758	-40,989	-0,637	-1,5	-0,5	0,377	-2,669	-0,166	-0,999	0
28	ZINC66323423	-6,076	-0,338	-0,885	-1,562	-24,12	-8,062	-32,182	2,022	-39,618	-2,333	0	-0,5	0,126	-2,249	-0,605	-0,52	0,006
29	ZINC25444312	-6,074	-0,337	-0,884	-1,561	-25,391	-6,048	-31,439	0,092	-47,038	-1,382	-1,5	-0,5	0,375	-2,626	-0,454	-0,077	0,09
30	ZINC03954290	-6,06	-0,356	-0,917	-1,581	-29,53	-4,518	-34,048	5,153	-44,155	-1,238	-1,5	-0,5	0,278	-1,701	-0,339	-1,061	0
31	ZINC66054188	-6,06	-0,466	-1,096	-1,7	-16,471	-6,519	-22,989	0,008	-29,968	-1,672	-1,5	-0,5	0	-1,628	-0,489	-0,272	0
32	ZINC00403617	-6,049	-0,504	-1,154	-1,736	-20,833	-7,098	-27,93	0,218	-35,371	-1,661	-1,5	-0,5	0	-1,552	-0,532	-0,304	0
33	ZINC11730299	-6,039	-0,377	-0,951	-1,601	-19,685	-7,626	-27,312	0,573	-34,786	-2,613	0	-0,5	0,149	-2,196	-0,572	-0,4	0,093
34	ZINC02765676	-6,014	-0,401	-0,989	-1,622	-22,236	-8,085	-30,322	1,044	-36,667	-1,546	-1,283	-0,5	0	-1,875	-0,606	-0,29	0,086
35	ZINC38342108	-6,005	-0,375	-0,946	-1,592	-18,619	-7,905	-26,524	0,933	-33,836	-1,6	-1,5	-0,5	0,152	-2,003	-0,593	-0,28	0,318
36	ZINC71250382	-5,999	-0,461	-1,085	-1,683	-19,091	-10,187	-29,278	0,057	-35,582	-2,7	0	-0,5	0,345	-2,38	-0,764	0	0
37	ZINC05919422	-5,986	-0,399	-0,984	-1,614	-22,881	-10,111	-32,992	3,49	-39,764	-2,423	0	-0,5	0,287	-2,194	-0,758	-0,4	0,002
38	ZINC72128134	-5,979	-0,315	-0,84	-1,516	-30,198	-3,971	-34,169	0,728	-47,209	-0,7	-1,5	-0,5	0,121	-2,82	-0,298	-0,541	0,26
39	ZINC45820819	-5,969	-0,497	-1,139	-1,713	-18,931	-5,82	-24,751	0,095	-31,799	-1,499	-1,426	-0,5	0	-1,805	-0,436	-0,302	0
40	ZINC21729587	-5,966	-0,351	-0,902	-1,556	-30,262	-2,88	-33,142	2,241	-44,231	-0,7	-1,5	-0,5	0,272	-3,322	-0,216	0	0
41	ZINC39213079	-5,924	-0,494	-1,13	-1,7	-15,997	-5,059	-21,056	0	-30,08	-0,963	-1,465	-0,5	0	-2,33	-0,379	-0,287	0
42	ZINC05162954	-5,923	-0,329	-0,862	-1,522	-29,98	-5,455	-35,435	4,823	-45,857	-0,906	-1,5	-0,5	0,257	-1,896	-0,409	-0,968	0
43	ZINC12660693	-5,92	-0,395	-0,973	-1,596	-21,791	-6,585	-28,376	0,223	-37,795	-1,261	-1,5	-0,5	0	-1,116	-0,494	-1,049	0
44	ZINC45957091	-5,915	-0,37	-0,931	-1,568	-28,721	-3,002	-31,723	2,47	-40,163	-0,7	-1,5	-0,5	0,154	-2,846	-0,225	-0,297	0



N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
45	ZINC19735561	-5,913	-0,394	-0,972	-1,595	-23,42	-10,802	-34,222	1,587	-45,099	-2,7	0	-0,5	0,143	-1,396	-0,81	-0,65	0
46	ZINC32497006	-5,909	-0,394	-0,971	-1,593	-20,079	-11,768	-31,847	1,583	-40,267	-2,7	0	-0,5	0,146	-1,141	-0,883	-1,028	0,197
47	ZINC04353492	-5,905	-0,328	-0,86	-1,518	-30,866	-3,683	-34,549	8,35	-42,876	-0,7	-1,5	-0,5	0,259	-2,545	-0,276	-0,643	0
48	ZINC04454411	-5,902	-0,328	-0,859	-1,517	-21,594	-12,8	-34,394	0,953	-45,826	-2,602	0	-0,5	0,37	-2,049	-0,96	-0,16	0
49	ZINC06865168	-5,891	-0,368	-0,928	-1,561	-22,53	-14,613	-37,144	0,532	-47,123	-2,5	0	-0,5	0,259	-1,276	-1,096	-0,936	0,158
50	ZINC83328575	-5,868	-0,326	-0,854	-1,508	-22,03	-5,463	-27,493	3,052	-35,134	-1,806	0	-0,5	0,362	-3,013	-0,41	-0,501	0
51	ZINC00168399	-5,865	-0,326	-0,854	-1,508	-24,528	-12,716	-37,244	1,778	-49,364	-2,35	0	-0,5	0,364	-2,501	-0,954	0	0,075
52	ZINC18210781	-5,851	-0,418	-1,007	-1,608	-21,375	-7,089	-28,464	0,353	-32,859	-1,6	-1,5	-0,5	0	-1,475	-0,532	-0,294	0,05
53	ZINC21548877	-5,845	-0,325	-0,851	-1,503	-30,762	-3,533	-34,295	2,823	-42,194	-1,141	-1,5	-0,5	0,362	-2,195	-0,265	-0,898	0,292
54	ZINC34926410	-5,822	-0,342	-0,881	-1,519	-17,71	-15,136	-32,846	4,577	-41,981	-2,585	0	-0,5	0,257	-2,214	-1,135	-0,09	0,444
55	ZINC00303652	-5,81	-0,342	-0,879	-1,516	-20,411	-11,769	-32,18	4,975	-39,914	-2,5	0	-0,5	0,266	-2,289	-0,883	-0,14	0,236
56	ZINC14455607	-5,806	-0,447	-1,05	-1,629	-21,429	-3,78	-25,209	0	-33,818	-0,682	-1,5	-0,5	0	-2,214	-0,283	-0,627	0
57	ZINC36532832	-5,804	-0,363	-0,914	-1,538	-22,016	-11,226	-33,242	2,428	-42,943	-2,588	0	-0,5	0,454	-2,587	-0,842	0	0,259
58	ZINC00406431	-5,799	-0,446	-1,049	-1,627	-13,104	-8,186	-21,29	2,039	-26,203	-2,594	0	-0,5	0	-1,446	-0,614	-0,685	0,04
59	ZINC00407090	-5,786	-0,482	-1,104	-1,66	-14,868	-5,063	-19,931	1,152	-25,744	-1,328	-1,5	-0,5	0	-2,078	-0,38	0	0
60	ZINC00156031	-5,781	-0,385	-0,95	-1,559	-18,426	-8,217	-26,644	3,105	-32,813	-2,08	0	-0,5	0	-2,593	-0,616	0	0,008
61	ZINC12505891	-5,772	-0,412	-0,994	-1,586	-16,652	-12,322	-28,974	0,368	-36,529	-2,5	0	-0,5	0	-2,049	-0,924	0	0,201
62	ZINC02574453	-5,768	-0,339	-0,872	-1,505	-20,602	-8,996	-29,598	0,601	-34,805	-1,8	0	-0,5	0,274	-2,951	-0,675	-0,116	0
63	ZINC43879028	-5,765	-0,339	-0,872	-1,504	-21,803	-8,626	-30,429	5,586	-35,609	-2	0	-0,5	0,266	-2,779	-0,647	-0,283	0,177
64	ZINC66054268	-5,762	-0,384	-0,947	-1,554	-22,586	-4,592	-27,178	2,246	-34,692	-1,053	-1,5	-0,5	0	-2,16	-0,344	-0,269	0,065
65	ZINC43879166	-5,749	-0,319	-0,837	-1,478	-23,894	-9,881	-33,775	4,365	-39,632	-1,8	0	-0,5	0,253	-2,74	-0,741	-0,47	0,249
66	ZINC14982400	-5,74	-0,478	-1,095	-1,647	-23,183	-2,538	-25,721	0	-34,182	-0,677	-1,5	-0,5	0	-3,163	-0,19	0	0,291
67	ZINC00064822	-5,739	-0,319	-0,836	-1,475	-21,887	-9,812	-31,699	2,718	-36,31	-1,8	0	-0,5	0,125	-2,597	-0,736	-0,231	0
68	ZINC02574428	-5,737	-0,319	-0,835	-1,475	-22,343	-8,821	-31,164	1,626	-38,66	-1,8	0	-0,5	0,245	-3,11	-0,662	-0,133	0,223
69	ZINC20444581	-5,736	-0,337	-0,868	-1,496	-20,603	-6,736	-27,339	4,886	-32,608	-2	0	-0,5	0,13	-2,308	-0,505	-0,553	0
70	ZINC38810097	-5,731	-0,478	-1,093	-1,645	-21,734	-2,172	-23,906	0	-31,135	-0,654	-1,5	-0,5	0	-2,985	-0,163	0	0,071
71	ZINC05234693	-5,719	-0,336	-0,865	-1,492	-23,402	-8,885	-32,288	0,261	-42,1	-2,387	0	-0,5	0,135	-2,3	-0,666	0	0
72	ZINC02512925	-5,715	-0,381	-0,94	-1,541	-10,962	-8,798	-19,76	0,522	-27,854	-2,218	0	-0,5	0,176	-2,222	-0,66	-0,291	0
73	ZINC12769435	-5,705	-0,336	-0,863	-1,488	-22,335	-9,048	-31,383	3,325	-38,125	-2,7	0	-0,5	0,27	-2,273	-0,679	-0,016	0,192
74	ZINC35261362	-5,704	-0,439	-1,032	-1,6	-23,647	-2,44	-26,087	0	-33,717	-0,648	-1,5	-0,5	0	-3,134	-0,183	0	0,261
75	ZINC03999633	-5,699	-0,317	-0,83	-1,465	-22,357	-7,062	-29,419	8,041	-33,145	-2	0	-0,5	0,248	-2,718	-0,53	-0,225	0,026
76	ZINC35287635	-5,695	-0,316	-0,829	-1,464	-29,069	-2,552	-31,62	0,388	-44,247	-0,7	-1,5	-0,5	0,248	-2,677	-0,191	-0,375	0
77	ZINC02574427	-5,694	-0,335	-0,861	-1,485	-20,671	-9,37	-30,04	0,241	-36,66	-1,8	0	-0,5	0,266	-2,661	-0,703	-0,297	0
78	ZINC08581272	-5,69	-0,438	-1,029	-1,596	-25,695	-3,989	-29,684	0	-35,409	-0,676	-1,5	-0,5	0,184	-1,984	-0,299	-0,915	0
79	ZINC02540590	-5,688	-0,335	-0,86	-1,484	-26,447	-3,482	-29,93	2,017	-41,091	-0,901	-1,5	-0,5	0,272	-3,342	-0,261	0	0,544
80	ZINC13306196	-5,687	-0,379	-0,935	-1,534	-16,281	-13,239	-29,52	0,905	-36,703	-2,651	0	-0,5	0,162	-1,706	-0,993	0	0
81	ZINC06412034	-5,685	-0,355	-0,895	-1,507	-19,794	-7,032	-26,826	1,478	-29,086	-1,775	0	-0,5	0	-2,887	-0,527	0	0,004
82	ZINC71792007	-5,682	-0,355	-0,895	-1,506	-18,271	-9,296	-27,567	0	-35,917	-2,93	0	-0,5	0,27	-1,961	-0,697	0	0,136
83	ZINC47937781	-5,68	-0,334	-0,859	-1,482	-25,016	-13,001	-38,017	1,696	-48,749	-1,912	0	-0,5	0,661	-2,627	-0,975	-0,327	0
84	ZINC00245868	-5,675	-0,334	-0,858	-1,481	-18,018	-8,738	-26,755	2,036	-34,179	-1,894	0	-0,5	0,139	-2,767	-0,655	0	0,002
85	ZINC14401180	-5,675	-0,437	-1,026	-1,592	-17	-5,17	-22,17	0,144	-30,389	-1,402	-1,5	-0,5	0	-1,645	-0,388	-0,256	0,017
86	ZINC15809988	-5,673	-0,355	-0,893	-1,504	-28,473	-6,067	-34,539	1,224	-42,983	-1,268	-1,483	-0,5	0,447	-2,372	-0,455	-0,28	0,24
87	ZINC13207440	-5,671	-0,378	-0,932	-1,529	-20,867	-6,944	-27,811	0,15	-36,002	-2	0	-0,5	0	-2,595	-0,521	-0,164	0,108
88	ZINC64033453	-5,667	-0,354	-0,893	-1,502	-22,79	-8,167	-30,958	0,072	-40,704	-2,383	0	-0,5	0,151	-2,566	-0,613	0	0,243
89	ZINC04727858	-5,666	-0,354	-0,892	-1,502	-23,155	-6,663	-29,818	5,916	-36,323	-2	0	-0,5	0,132	-2,798	-0,5	0	0
90	ZINC42689479	-5,664	-0,515	-1,145	-1,667	-22,829	-4,277	-27,106	0	-33,308	-0,692	-1,5	-0,5	0	-2,406	-0,321	-0,245	0

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
91	ZINC45054777	-5,663	-0,315	-0,825	-1,456	-27,776	-5,243	-33,018	0,271	-46,804	-1,056	-1,5	-0,5	0,248	-2,388	-0,393	-0,321	0,247
92	ZINC08715639	-5,655	-0,314	-0,823	-1,454	-24,076	-4,739	-28,815	0,911	-38,7	-1,535	0	-0,5	0,241	-3,005	-0,355	-0,511	0,01
93	ZINC66324216	-5,652	-0,353	-0,89	-1,498	-20,194	-3,271	-23,465	0,081	-33,115	-0,947	-1,329	-0,5	0,305	-2,999	-0,245	0	0,063
94	ZINC72482090	-5,651	-0,514	-1,142	-1,663	-20,57	-3,157	-23,727	0	-27,92	-0,685	-1,5	-0,5	0	-2,729	-0,237	0	0
95	ZINC02511046	-5,65	-0,377	-0,929	-1,524	-13,662	-8,534	-22,196	1,577	-27,425	-2,416	0	-0,5	0	-1,397	-0,64	-0,791	0,095
96	ZINC43878997	-5,65	-0,332	-0,855	-1,474	-22,372	-7,675	-30,047	0,446	-37,297	-1,986	0	-0,5	0,274	-3,021	-0,576	0	0,159
97	ZINC19094057	-5,648	-0,314	-0,822	-1,452	-23,657	-4,575	-28,232	8,182	-37,02	-1,848	0	-0,5	0,375	-2,932	-0,343	-0,4	0
98	ZINC66054330	-5,648	-0,353	-0,889	-1,497	-21,043	-4,921	-25,964	0,633	-33,918	-0,999	-1,5	-0,5	0	-2,036	-0,369	-0,273	0,029
99	ZINC40448781	-5,642	-0,513	-1,141	-1,66	-22,118	-4,237	-26,355	0	-32,439	-0,694	-1,5	-0,5	0	-2,386	-0,318	-0,244	0
100	ZINC44185345	-5,64	-0,434	-1,02	-1,582	-20,601	-3,085	-23,686	0	-30,251	-0,7	-1,5	-0,5	0	-2,488	-0,231	-0,221	0

## 4 MODELO 1 – CLEAN LEAD LIKE

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
1	ZINC94241080	-8,742	-0,437	-1,186	-2,188	-26,795	-12,227	-39,022	5,527	-50,603	-3,126	-1,5	-0,5	0,198	-2,569	-0,917	-0,4	0,071
2	ZINC17164709	-8,729	-0,416	-1,147	-2,158	-30,681	-11,348	-42,029	7,752	-52,146	-3,346	-1,5	-0,452	0,242	-1,853	-0,851	-0,969	0
3	ZINC05613348	-8,724	-0,415	-1,146	-2,157	-32,804	-10,648	-43,451	1,469	-55,184	-3,347	-1,5	-0,452	0,242	-1,909	-0,799	-0,959	0
4	ZINC74825986	-8,413	-0,337	-0,984	-1,994	-35,258	-11,984	-47,242	8,019	-65,151	-1,89	-1,421	-0,369	0,352	-3,85	-0,899	-0,337	0
5	ZINC37244785	-8,194	-0,41	-1,112	-2,051	-25,097	-9,692	-34,789	2,546	-49,743	-2,947	-1,5	-0,5	0,206	-2,991	-0,727	0	0,265
6	ZINC37244759	-8,165	-0,43	-1,147	-2,07	-23,458	-6,502	-29,96	0,816	-44,177	-2,49	-1,376	-0,5	0,228	-3,48	-0,488	-0,122	0,062
7	ZINC05613346	-8,13	-0,387	-1,068	-2,01	-31,582	-10,52	-42,102	1,326	-53,96	-2,866	-1,5	-0,452	0,242	-1,841	-0,789	-0,965	0,042
8	ZINC37244788	-8,099	-0,405	-1,099	-2,027	-24,985	-11,728	-36,713	5	-49,232	-2,67	-1,5	-0,5	0,307	-2,89	-0,88	-0,025	0,059
9	ZINC94745267	-8,062	-0,403	-1,094	-2,018	-25,254	-9,276	-34,529	0,659	-44,279	-2,7	-1,5	-0,5	0,205	-2,108	-0,696	-0,955	0,193
10	ZINC91625140	-7,987	-0,347	-0,988	-1,931	-26,715	-9,826	-36,541	0	-44,706	-2,489	-1,5	-0,459	0,245	-2,965	-0,737	-0,332	0,25
11	ZINC84201611	-7,98	-0,319	-0,933	-1,892	-36,254	-7,753	-44,007	5,162	-62,275	-1,234	-1,5	-0,375	0,356	-4,431	-0,581	-0,295	0,081
12	ZINC37450052	-7,948	-0,397	-1,079	-1,989	-25,107	-11,503	-36,61	2,023	-50,398	-2,994	-1,5	-0,5	0,292	-2,281	-0,863	-0,351	0,249
13	ZINC92783556	-7,939	-0,397	-1,078	-1,987	-25,46	-13,679	-39,139	3,28	-51,253	-2,831	-1,5	-0,5	0,297	-2,044	-1,026	-0,4	0,064
14	ZINC93017308	-7,925	-0,466	-1,199	-2,067	-26,17	-9,389	-35,559	5,695	-43,056	-2,7	-1,5	-0,5	0,238	-1,785	-0,704	-0,973	0
15	ZINC91757945	-7,916	-0,377	-1,04	-1,957	-25,428	-13,141	-38,569	3,209	-52,595	-3,13	-1,5	-0,5	0,178	-1,881	-0,986	-0,301	0,203
16	ZINC37450051	-7,847	-0,392	-1,065	-1,964	-22,294	-16,097	-38,391	1,646	-53,548	-3,013	-1,115	-0,5	0,292	-2,033	-1,207	-0,454	0,182
17	ZINC92780981	-7,795	-0,39	-1,058	-1,951	-25,931	-15,288	-41,219	5,281	-57,968	-2,669	-1,5	-0,5	0,296	-1,779	-1,147	-0,543	0,047
18	ZINC94704817	-7,738	-0,407	-1,087	-1,962	-26,23	-9,479	-35,71	5,957	-43,965	-2,7	-1,5	-0,5	0,42	-2,516	-0,711	-0,298	0,067
19	ZINC94747080	-7,703	-0,385	-1,045	-1,928	-26,324	-8,908	-35,232	1,009	-43,816	-2,7	-1,5	-0,5	0,292	-2,334	-0,668	-0,292	0
20	ZINC39467679	-7,685	-0,334	-0,95	-1,858	-34,756	-10,344	-45,1	2,394	-59,743	-1,598	-1,5	-0,455	0,405	-3,467	-0,776	-0,347	0,054
21	ZINC90141887	-7,68	-0,32	-0,923	-1,838	-36,063	-6,982	-43,045	4,136	-58,082	-1,194	-1,474	-0,395	0,294	-3,915	-0,524	-0,472	0
22	ZINC91455726	-7,599	-0,292	-0,866	-1,785	-45,465	-10,09	-55,555	3,861	-78,388	-1,05	-1,5	-0,339	0,403	-3,712	-0,757	-1,065	0,42
23	ZINC91753312	-7,59	-0,361	-0,997	-1,877	-22,885	-11,075	-33,96	1,35	-47,102	-2,59	-1,5	-0,5	0,271	-2,14	-0,831	-0,432	0,131
24	ZINC94242303	-7,559	-0,378	-1,026	-1,892	-26,141	-7,455	-33,596	5,903	-32,886	-2,714	-1,5	-0,5	0,288	-2,488	-0,559	-0,306	0,22
25	ZINC66961233	-7,546	-0,314	-0,907	-1,806	-31,434	-10,071	-41,505	3,288	-58,646	-1,717	-1,5	-0,352	0,274	-3,239	-0,755	-0,4	0,143
26	ZINC08627300	-7,528	-0,443	-1,139	-1,964	-23,362	-12,529	-35,891	1,609	-43,535	-2,619	-1,5	-0,5	0,238	-1,715	-0,94	-0,783	0,29
27	ZINC47403228	-7,523	-0,313	-0,904	-1,801	-37,734	-7,646	-45,38	6,425	-61,649	-1,266	-1,5	-0,419	0,305	-2,836	-0,573	-1,258	0,024
28	ZINC93370438	-7,521	-0,301	-0,88	-1,783	-42,289	-7,547	-49,836	2,085	-70,519	-1,012	-1,5	-0,375	0,498	-4,582	-0,566	-0,249	0,265
29	ZINC40351595	-7,495	-0,394	-1,053	-1,9	-27,82	-14,116	-41,936	0,207	-56,688	-2,279	-1,5	-0,5	0,099	-1,738	-1,059	-0,518	0
30	ZINC09060245	-7,461	-0,298	-0,873	-1,768	-40,159	-7,041	-47,2	3,39	-62,432	-1,234	-1,5	-0,365	0,28	-2,896	-0,528	-1,324	0,107
31	ZINC94745265	-7,45	-0,372	-1,011	-1,864	-30,258	-7,349	-37,607	0,171	-49,371	-1,923	-1,5	-0,5	0,205	-2,278	-0,551	-0,95	0,048

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
32	ZINC04340289	-7,448	-0,355	-0,979	-1,842	-30,579	-7,599	-38,178	1,395	-53,052	-2,626	-1,5	-0,5	0,178	-2,046	-0,57	-0,46	0,076
33	ZINC37244761	-7,423	-0,391	-1,043	-1,882	-23,328	-11,169	-34,497	2,366	-45,989	-2,436	-1,474	-0,5	0,228	-3,099	-0,838	-0,073	0,768
34	ZINC94227008	-7,423	-0,391	-1,042	-1,882	-23,361	-8,813	-32,174	1,698	-30,666	-2,7	-1,5	-0,5	0,315	-2,171	-0,661	-0,336	0,13
35	ZINC91757762	-7,406	-0,353	-0,973	-1,831	-28,891	-14,222	-43,112	4,192	-54,069	-2,427	-1,5	-0,5	0,178	-2,22	-1,067	-0,314	0,444
36	ZINC72323985	-7,4	-0,336	-0,943	-1,809	-29,571	-11,868	-41,44	1,078	-56,281	-2,416	0	-0,5	0,179	-3,821	-0,89	-0,134	0,182
37	ZINC69780406	-7,399	-0,322	-0,915	-1,789	-30,03	-7,437	-37,467	1,166	-57,075	-1,359	-1,5	-0,442	0,238	-2,852	-0,558	-0,926	0
38	ZINC91753282	-7,381	-0,388	-1,037	-1,871	-25,944	-10,755	-36,699	3,2	-46,762	-2,5	-1,5	-0,5	0,215	-2,019	-0,807	-0,331	0,06
39	ZINC94681720	-7,381	-0,388	-1,037	-1,871	-21,277	-17,993	-39,271	0,439	-52,703	-3,13	0	-0,5	0,34	-2,742	-1,35	0	0
40	ZINC92098307	-7,362	-0,368	-0,999	-1,842	-24,094	-10,978	-35,072	2,113	-45,56	-2,33	-1,5	-0,5	0,206	-1,947	-0,823	-0,699	0,232
41	ZINC05948825	-7,36	-0,294	-0,861	-1,745	-28,452	-12,883	-41,335	3,318	-53,917	-3,327	-1,5	-0,362	0,209	-1,898	-0,966	-0,479	0,963
42	ZINC37244802	-7,359	-0,35	-0,967	-1,819	-29,517	-10,486	-40,003	3,291	-54,804	-2,581	0	-0,5	0,287	-3,797	-0,786	-0,14	0,159
43	ZINC75276784	-7,332	-0,293	-0,858	-1,738	-39,682	-8,413	-48,094	7,687	-62,469	-1,266	-1,5	-0,382	0,36	-2,714	-0,631	-1,366	0,168
44	ZINC94242302	-7,329	-0,386	-1,029	-1,858	-23,954	-8,69	-32,644	9,223	-35,385	-2,7	-1,5	-0,5	0,315	-2,309	-0,652	-0,288	0,305
45	ZINC35083794	-7,305	-0,384	-1,026	-1,852	-26,027	-8,145	-34,171	4,883	-38,036	-2,364	-1,5	-0,5	0,321	-2,3	-0,611	-0,359	0,008
46	ZINC94743859	-7,273	-0,346	-0,956	-1,798	-24,049	-12,342	-36,392	4,786	-47,772	-3,274	0	-0,5	0,275	-3,049	-0,926	-0,166	0,366
47	ZINC93411782	-7,269	-0,363	-0,987	-1,819	-25,922	-5,904	-31,826	1,374	-46,767	-2,074	-1,5	-0,5	0,186	-2,022	-0,443	-0,94	0,023
48	ZINC90218747	-7,264	-0,303	-0,873	-1,739	-34,295	-4,411	-38,706	9,526	-49,026	-0,933	-1,374	-0,409	0,3	-4,779	-0,331	0	0,26
49	ZINC91753346	-7,262	-0,403	-1,057	-1,867	-23,481	-13,025	-36,506	0,139	-47,862	-2,492	-1,5	-0,5	0,236	-1,87	-0,977	-0,328	0,167
50	ZINC91948163	-7,261	-0,382	-1,02	-1,841	-25,176	-11,004	-36,18	2,316	-45,686	-2,53	-1,321	-0,5	0,442	-2,087	-0,825	-0,502	0,061
51	ZINC93369164	-7,261	-0,29	-0,849	-1,721	-40,273	-5,488	-45,761	3,133	-67,245	-0,96	-1,5	-0,369	0,493	-4,267	-0,412	-0,247	0
52	ZINC94224082	-7,261	-0,382	-1,02	-1,841	-21,981	-9,506	-31,487	6,664	-37,839	-2,5	-1,5	-0,5	0,195	-1,673	-0,713	-0,719	0,15
53	ZINC93353035	-7,245	-0,302	-0,871	-1,734	-27,685	-9,732	-37,417	2,815	-46,302	-1,57	-1,43	-0,372	0,354	-3,142	-0,73	-0,441	0,086
54	ZINC07344294	-7,245	-0,329	-0,923	-1,771	-36,153	-9,492	-45,645	7,442	-63,003	-1,323	-1,5	-0,455	0,324	-2,987	-0,712	-0,721	0,129
55	ZINC88418444	-7,204	-0,3	-0,866	-1,724	-37,204	-9,992	-47,196	10,77	-67,529	-1,936	0	-0,392	0,512	-3,935	-0,749	-0,702	0
56	ZINC94702347	-7,196	-0,36	-0,977	-1,801	-25,098	-9,608	-34,706	6,835	-45,22	-3,18	0	-0,5	0,493	-3,175	-0,721	-0,146	0,033
57	ZINC37244773	-7,184	-0,359	-0,975	-1,798	-26,443	-11,439	-37,881	2,072	-50,599	-2,5	0	-0,5	0,309	-3,567	-0,858	-0,08	0,012
58	ZINC71748323	-7,183	-0,326	-0,915	-1,756	-25,214	-10,187	-35,401	5,328	-46,414	-2,3	-1,5	-0,486	0,256	-1,619	-0,764	-0,837	0,067
59	ZINC79596670	-7,168	-0,299	-0,862	-1,716	-40,466	-6,552	-47,018	5,498	-66,017	-1,15	-1,5	-0,412	0,377	-3,137	-0,491	-0,966	0,112
60	ZINC93368088	-7,165	-0,299	-0,861	-1,715	-38,446	-7,141	-45,586	2,082	-65,619	-0,975	-1,5	-0,422	0,46	-3,942	-0,536	-0,251	0
61	ZINC40051461	-7,158	-0,377	-1,005	-1,815	-23,165	-10,003	-33,168	2,712	-43,81	-2,96	0	-0,5	0,303	-3,25	-0,75	0	0
62	ZINC93852135	-7,157	-0,377	-1,005	-1,815	-30,045	-11,784	-41,829	0,346	-57,107	-1,617	-1,5	-0,5	0,198	-1,922	-0,884	-0,949	0,016
63	ZINC37164146	-7,151	-0,397	-1,041	-1,838	-20,86	-13,131	-33,992	7,34	-41,086	-2,903	-1,5	-0,5	0,409	-1,756	-0,985	-0,113	0,196
64	ZINC95429744	-7,15	-0,311	-0,884	-1,729	-37,1	-7,26	-44,36	0	-65,537	-1,192	-1,5	-0,482	0,424	-3,311	-0,544	-0,649	0,105
65	ZINC71287556	-7,149	-0,34	-0,939	-1,768	-30,102	-12,827	-42,93	1,41	-59,437	-2,498	0	-0,468	0,248	-3,017	-0,962	-0,474	0,022
66	ZINC69812483	-7,143	-0,286	-0,836	-1,693	-32,63	-9,427	-42,057	1,911	-56,497	-1,46	-1,277	-0,375	0,356	-3,513	-0,707	-0,296	0,129
67	ZINC37244730	-7,136	-0,357	-0,969	-1,786	-25,163	-8,396	-33,559	9,666	-42,204	-2,572	0	-0,5	0,309	-3,619	-0,63	-0,124	0
68	ZINC94218342	-7,134	-0,34	-0,937	-1,764	-22,29	-9,4	-31,69	4,58	-44,257	-2,745	0	-0,5	0,176	-2,927	-0,705	-0,605	0,172
69	ZINC70451147	-7,133	-0,324	-0,909	-1,744	-27,602	-6,371	-33,973	4,41	-46,877	-2,304	0	-0,482	0,17	-3,151	-0,478	-0,887	0
70	ZINC77376976	-7,121	-0,285	-0,833	-1,688	-35,895	-7,327	-43,222	12,182	-54,872	-1,271	-1,5	-0,355	0,414	-3,311	-0,55	-0,549	0
71	ZINC89729171	-7,108	-0,338	-0,934	-1,757	-27,382	-6,704	-34,086	2,709	-42,576	-1,217	-1,5	-0,5	0,186	-3,575	-0,503	0	0
72	ZINC44377307	-7,104	-0,284	-0,831	-1,684	-38,558	-9,21	-47,768	2,989	-69,293	-1,672	0	-0,349	0,614	-4,687	-0,691	-0,32	0
73	ZINC94743432	-7,099	-0,338	-0,933	-1,755	-33,717	-8,436	-42,153	0,194	-58,585	-2,175	-1,5	-0,5	0,271	-2,447	-0,633	-0,353	0,238
74	ZINC71287990	-7,095	-0,355	-0,963	-1,776	-28,411	-13,077	-41,489	2,145	-56,252	-2,5	0	-0,5	0,305	-2,935	-0,981	-0,485	0
75	ZINC80787661	-7,091	-0,355	-0,962	-1,775	-31,295	-5,975	-37,269	0,405	-41,993	-1,279	-1,5	-0,5	0,206	-2,917	-0,448	-0,653	0
76	ZINC91753201	-7,089	-0,338	-0,931	-1,753	-12,69	-14,46	-27,15	10,395	-33,59	-2,41	-1,5	-0,5	0,179	-1,335	-1,085	-0,438	0

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
77	ZINC14408967	-7,087	-0,322	-0,903	-1,732	-33,922	-8,482	-42,404	1,838	-64,221	-1,215	-1,5	-0,455	0,405	-2,884	-0,636	-0,987	0,186
78	ZINC12523690	-7,086	-0,417	-1,072	-1,849	-25,925	-8,922	-34,848	2,277	-40,928	-2,619	-1,42	-0,5	0,232	-1,673	-0,669	-0,548	0,112
79	ZINC94217731	-7,08	-0,337	-0,93	-1,751	-25,512	-8,909	-34,421	5,689	-48,223	-2,7	0	-0,489	0,258	-2,494	-0,668	-1,091	0,105
80	ZINC86277338	-7,076	-0,322	-0,901	-1,73	-33,774	-6,131	-39,905	4,175	-57,21	-1,208	-1,5	-0,5	0,364	-3,854	-0,46	-0,016	0,097
81	ZINC94222661	-7,068	-0,372	-0,993	-1,792	-25,651	-10,17	-35,821	6,958	-50,014	-2,292	-1,5	-0,5	0,217	-2,078	-0,763	-0,4	0,249
82	ZINC40051502	-7,058	-0,371	-0,991	-1,789	-23,378	-14,624	-38,003	5,699	-44,894	-2,76	0	-0,5	0,301	-2,782	-1,097	-0,221	0
83	ZINC92781009	-7,058	-0,336	-0,927	-1,745	-30,592	-10,274	-40,866	0,192	-60,52	-1,825	-1,5	-0,5	0,276	-2,391	-0,771	-0,4	0,052
84	ZINC47509220	-7,047	-0,306	-0,871	-1,704	-36,198	-6,771	-42,969	0,613	-58,526	-1,205	-1,5	-0,459	0,326	-2,754	-0,508	-0,965	0,017
85	ZINC71279843	-7,043	-0,352	-0,956	-1,763	-25,335	-9,761	-35,096	2,547	-47,025	-1,447	-1,5	-0,5	0,313	-3,176	-0,732	0	0
86	ZINC11693088	-7,037	-0,352	-0,955	-1,761	-22,799	-10,873	-33,672	0,028	-44,443	-2,334	-1,5	-0,5	0,101	-1,624	-0,816	-0,504	0,139
87	ZINC93368914	-7,031	-0,306	-0,869	-1,7	-37,866	-7,105	-44,97	4,061	-65,435	-0,977	-1,5	-0,405	0,448	-3,816	-0,533	-0,247	0
88	ZINC58315444	-7,027	-0,281	-0,822	-1,666	-38,988	-6,587	-45,575	3,919	-66,106	-1,224	-1,5	-0,339	0,336	-2,74	-0,494	-1,322	0,256
89	ZINC48999313	-7,025	-0,37	-0,987	-1,781	-29,107	-7,537	-36,643	0	-48,306	-2,323	-1,5	-0,5	0,213	-1,942	-0,565	-0,457	0,05
90	ZINC72364321	-7,023	-0,334	-0,923	-1,736	-32,453	-6,361	-38,814	0,343	-48,838	-1,33	-1,5	-0,5	0,095	-2,999	-0,477	-0,312	0
91	ZINC92722840	-7,02	-0,334	-0,922	-1,736	-26,27	-7,275	-33,544	1,63	-45,203	-2,303	-1,5	-0,5	0,276	-2,385	-0,546	-0,289	0,226
92	ZINC47402734	-7,02	-0,319	-0,894	-1,716	-36,063	-6,273	-42,335	3,214	-57,51	-1,167	-1,5	-0,444	0,239	-2,694	-0,47	-0,982	0
93	ZINC73966470	-7,015	-0,334	-0,922	-1,734	-35,049	-9,489	-44,538	1,848	-60,91	-1,369	-1,5	-0,489	0,343	-2,44	-0,712	-0,849	0
94	ZINC40051462	-7,011	-0,369	-0,985	-1,777	-20,193	-12,051	-32,244	4	-43,731	-2,96	0	-0,5	0,303	-3,058	-0,904	0	0,107
95	ZINC91516848	-7,01	-0,351	-0,951	-1,754	-22,025	-13,318	-35,343	1,036	-49,717	-2,7	0	-0,5	0,294	-2,776	-0,999	-0,546	0,217
96	ZINC85602703	-7,008	-0,28	-0,82	-1,661	-33,414	-7,356	-40,769	4,972	-61,637	-2,086	0	-0,365	0,56	-4,205	-0,552	-0,36	0
97	ZINC40351593	-6,995	-0,368	-0,982	-1,773	-31,118	-7,905	-39,022	0	-47,784	-1,929	-1,5	-0,5	0,099	-2,113	-0,593	-0,458	0
98	ZINC81759889	-6,989	-0,291	-0,84	-1,673	-36,883	-3,865	-40,748	3,108	-61,682	-0,781	-1,5	-0,442	0,238	-3,911	-0,29	-0,302	0
99	ZINC94746304	-6,986	-0,333	-0,918	-1,727	-18,731	-13,678	-32,409	5,414	-42,657	-3,079	0	-0,5	0,273	-2,382	-1,026	-0,509	0,238
100	ZINC12114883	-6,974	-0,279	-0,816	-1,653	-35,325	-10,863	-46,188	7,038	-62,261	-1,896	0	-0,375	0,427	-4,08	-0,815	-0,235	0

## 5 MODELO 2 – CLEAN FRAGMENT LIKE

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
1	ZINC34552323	-6,134	-0,613	-1,321	-1,857	-7,844	-13,74	-21,59	3,288	-25,3	-2,339	0	-0,5	0	-0,353	-3,031	0	0,089
2	ZINC06445421	-5,91	-0,348	-0,894	-1,542	-20,57	-8,103	-28,67	0,135	-37,79	-2,449	0	-0,5	0,264	-2,196	-0,608	-0,422	0
3	ZINC19929667	-5,846	-0,344	-0,884	-1,525	-20,48	-8,135	-28,61	1,923	-35,66	-2,34	0	-0,5	0,266	-2,282	-0,61	-0,399	0,018
4	ZINC65347757	-5,319	-0,295	-0,774	-1,367	-20,08	-9,724	-29,81	5,779	-36,33	-1,454	0	-0,5	0,128	-2,234	-0,729	-0,529	0
5	ZINC19735743	-5,272	-0,439	-1,006	-1,513	-14,86	-9,787	-24,65	0	-26,73	-1,25	0	-0,5	0	-0,803	-2,734	-0,142	0,157
6	ZINC16947578	-5,268	-0,31	-0,797	-1,374	-19,62	-8,269	-27,89	2,726	-35,64	-1,334	0	-0,5	0,282	-2,907	-0,62	-0,19	0
7	ZINC00239904	-5,252	-0,292	-0,765	-1,35	-24,42	-7,955	-32,37	0,683	-40,51	-1,324	0	-0,5	0,245	-3,076	-0,597	0	0
8	ZINC12954308	-5,223	-0,435	-0,996	-1,499	-17,12	-8,477	-25,59	2,447	-30,37	-1,7	0	-0,5	0	-2,138	-0,636	-0,249	0
9	ZINC02163989	-5,204	-0,325	-0,82	-1,379	-17,01	-8,734	-25,74	1,528	-31,56	-1,598	0	-0,5	0	-2,593	-0,655	-0,138	0,28
10	ZINC15768436	-5,186	-0,324	-0,817	-1,375	-16,32	-11,1	-27,42	2,724	-31,35	-2,076	0	-0,5	0,149	-1,617	-0,833	-0,309	0
11	ZINC14988494	-5,17	-0,304	-0,782	-1,349	-21,29	-9,319	-30,61	2,59	-37,48	-2,174	0	-0,5	0,268	-1,851	-0,699	-0,44	0,225
12	ZINC00123791	-5,165	-0,287	-0,752	-1,328	-25,2	-7,925	-33,13	4,777	-38,75	z	0	-0,5	0,245	-2,966	-0,594	0	0
13	ZINC36589700	-5,159	-0,322	-0,813	-1,368	-19,44	-8,477	-27,92	2,027	-35,08	-1,933	0	-0,5	0,298	-2,144	-0,636	-0,244	0
14	ZINC26476477	-5,159	-0,287	-0,751	-1,326	-24,28	-3,072	-27,35	0,002	-34,97	-1,18	0	-0,5	0	-3,249	-0,23	0	0
15	ZINC00074311	-5,145	-0,429	-0,982	-1,476	-16,2	-8,458	-24,65	1,972	-29,45	-1,733	0	-0,5	0	-2,029	-0,634	-0,249	0
16	ZINC15768378	-5,134	-0,321	-0,809	-1,361	-18,78	-8,428	-27,21	1,28	-28,57	-1,733	0	-0,5	0,132	-2,323	-0,632	-0,218	0,14
17	ZINC20282193	-5,096	-0,283	-0,742	-1,31	-22,88	-8,951	-31,83	0,236	-40,92	-1,25	0	-0,5	0,125	-2,67	-0,671	-0,13	0

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
18	ZINC12274238	-5,093	-0,3	-0,77	-1,329	-19,43	-9,006	-28,44	4,835	-32,6	-1,587	0	-0,5	0	-2,074	-0,675	-0,377	0,121
19	ZINC00135779	-5,086	-0,424	-0,97	-1,46	-16,4	-7,523	-23,93	1,616	-28,9	-1,86	0	-0,5	0	-1,883	-0,564	-0,279	0
20	ZINC00169296	-5,084	-0,282	-0,74	-1,307	-18,65	-9,315	-27,97	0,005	-31,88	-1,855	0	-0,5	0	-2,03	-0,699	0	0
21	ZINC01143617	-5,074	-0,298	-0,768	-1,324	-22,88	-4,911	-27,79	0,022	-33,19	-0,9	0	-0,5	0	-3,061	-0,368	-0,246	0
22	ZINC03172196	-5,068	-0,317	-0,798	-1,343	-20,4	-8,472	-28,87	4,109	-33,63	-1,733	0	-0,5	0,13	-2,271	-0,635	-0,16	0,101
23	ZINC00134858	-5,064	-0,298	-0,766	-1,321	-19,77	-6,755	-26,52	2,966	-33,05	-1,25	0	-0,5	0,284	-2,794	-0,507	-0,297	0
24	ZINC27644619	-5,063	-0,298	-0,766	-1,321	-25,34	-5,649	-30,99	1,845	-38,65	-1,084	0	-0,5	0,257	-3,346	-0,424	0	0,034
25	ZINC06283190	-5,055	-0,316	-0,796	-1,34	-15,53	-10,86	-26,39	1,793	-35,37	-2,23	0	-0,5	0,128	-1,297	-0,814	-0,363	0,022
26	ZINC40433876	-5,05	-0,297	-0,764	-1,318	-19,51	-8,432	-27,95	0,22	-36,98	-1,6	0	-0,5	0,14	-2,23	-0,632	-0,228	0
27	ZINC02025526	-5,045	-0,315	-0,794	-1,337	-15,53	-6,36	-21,89	0,359	-25,04	-1,253	0	-0,5	0	-1,845	-0,477	-0,969	0
28	ZINC02559760	-5,036	-0,336	-0,828	-1,358	-21,83	-5,924	-27,75	5,994	-32,44	-1,44	0	-0,5	0,172	-2,234	-0,444	-0,59	0
29	ZINC12404863	-5,036	-0,336	-0,828	-1,358	-17,45	-6,527	-23,97	0,234	-30,07	-0,784	0	-0,5	0	-2,814	-0,49	-0,484	0,036
30	ZINC03888559	-5,036	-0,296	-0,762	-1,314	-23,49	-9,833	-33,32	0,641	-37,46	-1,25	0	-0,5	0,132	-2,484	-0,737	-0,196	0
31	ZINC00156987	-5,006	-0,385	-0,905	-1,404	-15,17	-6,649	-21,82	1,65	-25,98	-1,28	0	-0,5	0	-1,87	-0,499	-0,857	0
32	ZINC00133271	-4,979	-0,293	-0,753	-1,299	-23,07	-9,308	-32,37	2,753	-39,9	-1,278	0	-0,5	0,135	-2,581	-0,698	-0,058	0
33	ZINC00092058	-4,974	-0,383	-0,9	-1,395	-16,21	-8,191	-24,4	1,991	-29,48	-1,788	0	-0,5	0,21	-2,209	-0,614	-0,262	0,19
34	ZINC26507888	-4,96	-0,276	-0,722	-1,275	-24,75	-3,787	-28,54	1,53	-34,73	-0,9	0	-0,5	0,123	-3,179	-0,284	-0,22	0
35	ZINC19513436	-4,956	-0,354	-0,853	-1,362	-17,33	-10,62	-27,95	3,392	-35,84	-2,035	0	-0,5	0,368	-1,981	-0,796	-0,209	0,197
36	ZINC00404044	-4,942	-0,291	-0,748	-1,289	-20,3	-5,188	-25,49	1,583	-31,43	-1,421	0	-0,5	0	-2,515	-0,389	-0,117	0
37	ZINC00405102	-4,942	-0,38	-0,894	-1,386	-14,18	-7,951	-22,13	1,681	-26,65	-1,44	0	-0,5	0	-1,781	-0,596	-0,626	0
38	ZINC49467239	-4,939	-0,274	-0,719	-1,27	-23,31	-10,7	-34,01	0,695	-45,04	-1,481	0	-0,5	0,372	-2,283	-0,803	-0,408	0,162
39	ZINC08510804	-4,937	-0,274	-0,719	-1,269	-21,88	-5,772	-27,65	0,22	-35,46	-1,105	0	-0,5	0	-2,899	-0,433	0	0
40	ZINC03881816	-4,937	-0,29	-0,747	-1,288	-17,54	-10,29	-27,83	0,596	-29,61	-1,8	0	-0,5	0,137	-2,024	-0,771	0	0,021
41	ZINC00082870	-4,931	-0,274	-0,718	-1,267	-18,31	-10,24	-28,55	0,365	-37,27	-1,507	0	-0,5	0	-1,838	-0,768	-0,317	0
42	ZINC40162950	-4,928	-0,29	-0,745	-1,286	-12,13	-10,5	-22,63	1,926	-27,63	-2,227	0	-0,5	0	-1,527	-0,787	-0,193	0,306
43	ZINC00056673	-4,912	-0,289	-0,743	-1,281	-23,5	-6,728	-30,23	2,294	-36,99	-1,283	0	-0,5	0,27	-2,895	-0,505	0	0
44	ZINC05234693	-4,91	-0,289	-0,743	-1,281	-19,92	-9,162	-29,09	1,211	-34,63	-1,481	0	-0,5	0,135	-2,246	-0,687	-0,172	0,042
45	ZINC11692947	-4,896	-0,306	-0,771	-1,298	-19,41	-7,702	-27,11	0,498	-32,5	-0,9	0	-0,5	0	-2,577	-0,578	-0,342	0
46	ZINC14628884	-4,889	-0,288	-0,739	-1,275	-21,27	-2,472	-23,74	1,396	-30,15	-1,461	0	-0,5	0,276	-3,051	-0,185	-0,115	0,148
47	ZINC00133272	-4,88	-0,287	-0,738	-1,273	-24,64	-8,622	-33,27	1,253	-39,64	-1,265	0	-0,5	0,135	-2,523	-0,647	-0,08	0
48	ZINC01577689	-4,872	-0,325	-0,801	-1,314	-20,71	-6,363	-27,07	0,521	-25,61	-0,781	0	-0,5	0,172	-3,08	-0,477	-0,243	0,037
49	ZINC12371133	-4,865	-0,27	-0,708	-1,251	-23,84	-6,005	-29,85	4,471	-33,28	-1,727	0	-0,5	0,243	-1,996	-0,45	-0,467	0,032
50	ZINC00167605	-4,857	-0,324	-0,798	-1,31	-19,51	-5,11	-24,62	0,654	-32,17	-1,913	0	-0,5	0,242	-2,056	-0,383	-0,316	0,069
51	ZINC02381669	-4,853	-0,373	-0,878	-1,361	-16,34	-5,947	-22,28	0,896	-26,67	-0,9	0	-0,5	0	-2,222	-0,446	-0,785	0
52	ZINC02384150	-4,85	-0,404	-0,925	-1,392	-14,5	-6,801	-21,3	0,556	-25,56	-1,257	0	-0,5	0	-1,941	-0,51	-0,643	0
53	ZINC02581007	-4,849	-0,269	-0,706	-1,247	-23,24	-5,252	-28,5	3,051	-33,32	-0,9	0	-0,5	0,255	-2,991	-0,394	-0,32	0
54	ZINC22010202	-4,847	-0,303	-0,763	-1,285	-14,24	-6,872	-21,11	2,676	-25,6	-1,38	0	-0,5	0,27	-1,912	-0,515	-0,811	0
55	ZINC02572704	-4,84	-0,323	-0,796	-1,305	-20,13	-5,789	-25,92	0,459	-30,48	-0,812	0	-0,5	0,168	-3,021	-0,434	-0,241	0
56	ZINC04644738	-4,837	-0,302	-0,762	-1,282	-19,44	-11,16	-30,61	1,825	-37	-1,76	0	-0,5	0,253	-1,778	-0,837	-0,216	0
57	ZINC04975449	-4,831	-0,268	-0,703	-1,242	-21,57	-7,603	-29,17	7,973	-34,02	-1,094	0	-0,5	0,364	-2,787	-0,57	-0,451	0,206
58	ZINC09368011	-4,826	-0,268	-0,703	-1,241	-25,35	-4,725	-30,07	4,078	-34,97	-1,05	0	-0,5	0,128	-3,103	-0,354	-0,165	0,218
59	ZINC00176851	-4,821	-0,301	-0,759	-1,278	-17,59	-9,642	-27,23	1,643	-33,67	-1,6	0	-0,5	0,3	-2,114	-0,723	-0,184	0
60	ZINC63110788	-4,809	-0,283	-0,727	-1,255	-16,76	-9,147	-25,91	0,125	-33,79	-1,05	0	-0,5	0,136	-1,423	-2,686	-0,204	0,917
61	ZINC00224248	-4,809	-0,267	-0,7	-1,236	-25,36	-9,89	-35,25	8,74	-39,75	-1,181	0	-0,5	0,241	-2,393	-0,742	-0,436	0,202
62	ZINC37858481	-4,808	-0,37	-0,87	-1,349	-18,75	-3,458	-22,21	0,049	-26,32	-1,529	0	-0,5	0	-2,519	-0,259	0	0

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
63	ZINC08701735	-4,799	-0,3	-0,756	-1,272	-22,78	-5,192	-27,98	0,089	-33,95	-0,9	0	-0,5	0,154	-2,961	-0,389	-0,202	0
64	ZINC19093969	-4,799	-0,282	-0,726	-1,252	-15,57	-14,92	-30,49	2,093	-37,11	-1,647	0	-0,5	0,241	-1,681	-1,119	-0,094	0
65	ZINC02584489	-4,797	-0,343	-0,826	-1,318	-17,46	-7,888	-25,34	1,863	-28,31	-1,681	0	-0,5	0	-1,74	-0,592	-0,318	0,034
66	ZINC00394705	-4,795	-0,4	-0,915	-1,376	-14,24	-8,265	-22,51	2,02	-26,69	-1,656	0	-0,5	0	-1,734	-0,62	-0,474	0,188
67	ZINC20153765	-4,793	-0,266	-0,698	-1,232	-26,23	-3,509	-29,74	0,391	-37,1	-0,9	0	-0,5	0,248	-3,071	-0,263	-0,307	0
68	ZINC00078069	-4,792	-0,299	-0,755	-1,27	-15,99	-10,37	-26,35	0,838	-34,65	-1,907	0	-0,5	0,149	-1,417	-0,778	-0,34	0
69	ZINC04819692	-4,788	-0,266	-0,697	-1,231	-24,65	-7,588	-32,24	1,644	-40,22	-1,309	0	-0,5	0,122	-2,532	-0,569	0	0
70	ZINC02025530	-4,784	-0,299	-0,753	-1,268	-11,6	-7,051	-18,65	0,902	-23,46	-1,859	0	-0,5	0	-1,428	-0,529	-0,759	0,291
71	ZINC02169773	-4,782	-0,368	-0,865	-1,341	-13,33	-8,393	-21,73	1,993	-25,95	-1,693	0	-0,5	0	-1,711	-0,63	-0,279	0,03
72	ZINC03888684	-4,777	-0,281	-0,723	-1,246	-20,89	-8,679	-29,57	0,875	-34,85	-1,25	0	-0,5	0	-2,376	-0,651	0	0
73	ZINC00405802	-4,777	-0,299	-0,752	-1,266	-18,77	-12,04	-30,81	5,865	-35,56	-1,674	0	-0,5	0,261	-1,757	-0,903	-0,204	0
74	ZINC19702650	-4,776	-0,265	-0,695	-1,228	-24,92	-4,764	-29,69	0,241	-36,42	-0,958	0	-0,5	0	-2,338	-0,357	-0,622	0
75	ZINC26507931	-4,776	-0,298	-0,752	-1,266	-22,2	-6,137	-28,33	0,057	-35,84	-0,832	0	-0,5	0	-2,763	-0,46	-0,22	0
76	ZINC00195148	-4,77	-0,298	-0,751	-1,264	-20,41	-8,971	-29,38	4,289	-35,68	-1,25	0	-0,5	0,302	-2,588	-0,673	-0,062	0
77	ZINC01701902	-4,765	-0,298	-0,75	-1,263	-21,92	-5,455	-27,37	0,196	-33,8	-0,878	0	-0,5	0,154	-2,865	-0,409	-0,267	0
78	ZINC26507899	-4,761	-0,28	-0,72	-1,242	-22,75	-4,759	-27,51	0,134	-34,41	-0,9	0	-0,5	0,134	-2,973	-0,357	-0,165	0
79	ZINC01747998	-4,759	-0,28	-0,72	-1,242	-19,66	-8,304	-27,96	3,056	-31,85	-1,25	0	-0,5	0,27	-2,541	-0,623	-0,331	0,215
80	ZINC05511905	-4,755	-0,297	-0,749	-1,26	-16,7	-5,719	-22,42	4,565	-23,96	-0,9	0	-0,5	0,131	-2,257	-0,429	-0,8	0
81	ZINC39097325	-4,743	-0,296	-0,747	-1,257	-16,93	-8,847	-25,77	0,108	-30,92	-1,33	0	-0,5	0	-2,249	-0,664	0	0
82	ZINC02528933	-4,738	-0,279	-0,717	-1,236	-19,28	-7,603	-26,88	3,793	-30,25	-0,781	0	-0,5	0,147	-2,631	-0,57	-0,402	0
83	ZINC02243336	-4,733	-0,338	-0,815	-1,301	-16,44	-5,815	-22,26	0,627	-26,71	-0,9	0	-0,5	0	-2,096	-0,436	-0,801	0
84	ZINC30769289	-4,733	-0,263	-0,689	-1,216	-22,66	-5,784	-28,44	1,729	-35,57	-0,839	0	-0,5	0,245	-2,746	-0,434	-0,483	0,025
85	ZINC02582686	-4,731	-0,315	-0,778	-1,276	-19,56	-6,704	-26,27	0,537	-30,48	-0,781	0	-0,5	0,166	-2,693	-0,503	-0,457	0,037
85	ZINC02582686	-4,731	-0,315	-0,778	-1,276	-19,56	-6,704	-26,27	0,537	-30,48	-0,781	0	-0,5	0,166	-2,693	-0,503	-0,457	0,037
86	ZINC40488481	-4,73	-0,296	-0,745	-1,254	-16,68	-10,42	-27,1	6,873	-29,31	-2,127	0	-0,5	0,151	-1,76	-0,781	0	0,287
87	ZINC02527798	-4,727	-0,364	-0,855	-1,326	-17,19	-6,016	-23,21	0,445	-27,04	-0,861	0	-0,5	0	-2,343	-0,451	-0,571	0
88	ZINC18137170	-4,724	-0,295	-0,744	-1,252	-21,71	-5,617	-27,33	0,035	-30,92	-0,9	0	-0,5	0	-2,625	-0,421	-0,278	0
89	ZINC32627476	-4,72	-0,315	-0,776	-1,273	-19	-5,534	-24,53	0,318	-30,44	-0,9	0	-0,5	0	-2,676	-0,415	-0,229	0
90	ZINC00401323	-4,72	-0,262	-0,687	-1,213	-23,85	-4,76	-28,61	7,697	-31,06	-0,897	0	-0,5	0,38	-2,965	-0,357	-0,404	0,023
91	ZINC02041690	-4,717	-0,393	-0,9	-1,354	-12,95	-7,947	-20,9	1,254	-25,41	-1,86	0	-0,5	0	-1,621	-0,596	-0,451	0,311
92	ZINC03293367	-4,717	-0,314	-0,776	-1,272	-19,98	-3,1	-23,08	1,221	-29,09	-1,686	0	-0,5	0,272	-2,084	-0,232	-0,553	0,066
93	ZINC05520986	-4,717	-0,337	-0,812	-1,296	-19,79	-8,038	-27,82	1,228	-33,64	-1,339	0	-0,5	0	-1,831	-0,603	-0,477	0,033
94	ZINC00391809	-4,709	-0,336	-0,811	-1,294	-18,92	-5,759	-24,68	0,084	-29,06	-0,805	0	-0,5	0	-2,802	-0,432	-0,206	0,036
95	ZINC00388531	-4,707	-0,392	-0,898	-1,351	-13,96	-7,043	-21,01	0,854	-24,21	-0,782	0	-0,5	0	-1,975	-0,528	-0,921	0
96	ZINC02870472	-4,697	-0,261	-0,684	-1,207	-22,68	-2,367	-25,05	2,329	-30,94	-1,353	0	-0,5	0,246	-2,782	-0,178	-0,243	0,112
97	ZINC04770572	-4,696	-0,276	-0,71	-1,225	-20,06	-9,155	-29,21	0,541	-34,75	-1,091	0	-0,5	0,137	-2,348	-0,687	-0,24	0,032
98	ZINC00128288	-4,687	-0,276	-0,709	-1,223	-23,03	-6,601	-29,63	0,053	-36,25	-0,783	0	-0,5	0	-2,742	-0,495	-0,408	0,241
99	ZINC03884042	-4,687	-0,293	-0,738	-1,242	-15,92	-12,23	-28,15	1,506	-31,37	-2,464	0	-0,5	0,152	-1,37	-0,917	0	0,412
100	ZINC00314387	-4,687	-0,293	-0,738	-1,242	-21,46	-7,416	-28,87	1,034	-33,13	-1,6	0	-0,5	0,149	-1,988	-0,556	-0,191	0

## 6 MODELO 2 – CLEAN LEAD LIKE

N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
1	ZINC00082267	-7,535	-0,377	-1,023	-1,886	-20,025	-10,665	-30,69	5,083	-37,583	-2,278	0	-0,5	0,406	-2,668	-2,8	0	0,305
2	ZINC91336390	-7,359	-0,35	-0,967	-1,819	-22,82	-8,781	-31,601	3,631	-39,494	-2	0	-0,5	0,27	-2,148	-2,659	-0,445	0,123
3	ZINC91526475	-7,219	-0,289	-0,844	-1,711	-20,902	-11,464	-32,366	1,616	-43,623	-1,624	0	-0,372	0,142	-2,187	-2,86	-0,318	0
4	ZINC91580461	-7,079	-0,373	-0,994	-1,795	-22,467	-5,091	-27,558	1,457	-34,02	-1,376	0	-0,5	0,221	-2,662	-2,382	-0,392	0,012
5	ZINC91296523	-6,774	-0,323	-0,89	-1,675	-21,32	-12,119	-33,439	3,978	-42,918	-3,221	0	-0,5	0,27	-1,933	-0,909	-0,491	0,01
6	ZINC02353151	-6,679	-0,304	-0,851	-1,633	-19,207	-13,765	-32,972	2,514	-46,443	-2,927	0	-0,489	0,258	-2,215	-1,032	-0,456	0,184
7	ZINC73738216	-6,579	-0,286	-0,813	-1,591	-29,11	-14,575	-43,685	6,525	-50,081	-2,29	0	-0,429	0,31	-2,647	-1,093	-0,43	0
8	ZINC37433236	-6,485	-0,309	-0,852	-1,603	-12,446	-14,947	-27,394	1,132	-37,2	-3,112	0	-0,5	0,278	-1,661	-1,121	-0,447	0,078
9	ZINC91581283	-6,396	-0,32	-0,868	-1,601	-18,982	-10,262	-29,243	2,955	-32,528	-1,168	0	-0,5	0,294	-2,241	-2,77	-0,163	0,151
10	ZINC05051058	-6,371	-0,29	-0,811	-1,557	-25,263	-10,187	-35,45	10,306	-40,908	-1,976	0	-0,496	0,261	-3,128	-0,764	-0,476	0,208
11	ZINC06524939	-6,362	-0,303	-0,836	-1,573	-20,835	-11,97	-32,804	3,502	-41,994	-2,76	0	-0,5	0,19	-2,439	-0,898	-0,198	0,242
12	ZINC92436811	-6,351	-0,334	-0,892	-1,61	-17,776	-9,009	-26,785	3,771	-38,221	-2,074	0	-0,5	0,305	-2,209	-0,676	-1,197	0
13	ZINC09698277	-6,343	-0,352	-0,923	-1,63	-20,271	-8,576	-28,847	1,543	-35,339	-0,994	0	-0,5	0,238	-2,013	-2,643	-0,431	0
14	ZINC25722380	-6,328	-0,352	-0,921	-1,626	-10,949	-20,198	-31,147	4,47	-36,764	-3,708	0	-0,5	0,232	-0,855	-1,515	-0,262	0,28
15	ZINC00404254	-6,324	-0,333	-0,888	-1,603	-18,586	-12,883	-31,47	1,512	-37,306	-3,274	0	-0,5	0,214	-1,532	-0,966	-0,314	0,049
16	ZINC28580296	-6,317	-0,263	-0,759	-1,512	-30,917	-11,244	-42,16	5,938	-50,133	-1,955	0	-0,342	0,27	-3,236	-0,843	-0,211	0
17	ZINC00191395	-6,275	-0,285	-0,799	-1,534	-26,448	-9,063	-35,511	5,158	-47,949	-2,396	0	-0,489	0,258	-2,875	-0,68	-0,421	0,329
18	ZINC94547481	-6,197	-0,326	-0,87	-1,571	-23,793	-4,347	-28,14	0,08	-33,353	-0,9	0	-0,5	0,112	-2,65	-2,326	-0,145	0,213
19	ZINC91829435	-6,192	-0,281	-0,789	-1,514	-16,755	-11,58	-28,335	3,278	-40,747	-2,23	0	-0,482	0,254	-2,727	-0,869	-0,252	0,114
20	ZINC91540347	-6,185	-0,309	-0,839	-1,548	-17,866	-6,257	-24,124	4,547	-29,287	-1,564	0	-0,5	0,285	-2,292	-2,469	-0,523	0,879
21	ZINC39976831	-6,183	-0,294	-0,812	-1,529	-21,224	-9,847	-31,071	2,454	-36,286	-2,5	0	-0,5	0,371	-2,626	-0,738	-0,404	0,215
22	ZINC39899407	-6,134	-0,267	-0,758	-1,483	-24,795	-9,053	-33,848	7,538	-42,237	-1,539	0	-0,376	0,214	-3,07	-0,679	-0,684	0
23	ZINC43198995	-6,128	-0,279	-0,781	-1,498	-19,501	-13,466	-32,967	3,864	-37,892	-2,886	0	-0,469	0,083	-1,549	-1,01	-0,298	0
24	ZINC95391447	-6,104	-0,277	-0,777	-1,492	-19,036	-18,737	-37,773	1,009	-47,522	-2,35	0	-0,486	0,341	-2,129	-1,405	-0,167	0,092
25	ZINC93672734	-6,094	-0,339	-0,887	-1,566	-21,864	-11,209	-33,073	4,662	-41,873	-2,414	0	-0,5	0,479	-3,002	-0,841	0	0,184
26	ZINC79050286	-6,086	-0,265	-0,753	-1,472	-21,692	-13,568	-35,259	2,661	-48,11	-2,42	0	-0,439	0,315	-2,312	-1,018	-0,4	0,187
27	ZINC02114838	-6,077	-0,289	-0,798	-1,503	-24,57	-9,335	-33,905	3,903	-41,582	-1,984	0	-0,5	0,368	-3,261	-0,7	0	0
28	ZINC92946576	-6,074	-0,289	-0,798	-1,502	-27,223	-10,576	-37,798	2,723	-45,08	-2,282	0	-0,5	0,179	-2,416	-0,793	-0,324	0,061
29	ZINC63385877	-6,072	-0,276	-0,773	-1,484	-23,151	-21,501	-44,652	0,982	-51,487	-1,555	0	-0,495	0,174	-2,778	-1,613	0	0,195
30	ZINC83237675	-6,072	-0,32	-0,853	-1,539	-16,212	-19,167	-35,379	2,334	-42,2	-2,529	0	-0,5	0,33	-1,59	-1,438	-0,345	0
31	ZINC00214784	-6,069	-0,276	-0,773	-1,484	-23,34	-10,942	-34,282	9,759	-37,953	-1,566	0	-0,496	0,347	-3,259	-0,821	-0,469	0,194
32	ZINC65339799	-6,059	-0,319	-0,851	-1,536	-19,846	-12,45	-32,295	4,479	-36,771	-1,581	0	-0,5	0,114	-2,723	-0,934	-0,435	0
33	ZINC00264377	-6,053	-0,288	-0,795	-1,497	-25,182	-11,42	-36,601	8,415	-42,497	-1,8	0	-0,5	0,283	-2,926	-0,856	-0,486	0,232
34	ZINC55211759	-6,046	-0,242	-0,707	-1,433	-29,891	-9,097	-38,989	0,867	-51,666	-1,6	0	-0,356	0,207	-3,254	-0,682	-0,466	0,106
35	ZINC38931352	-6,043	-0,288	-0,794	-1,494	-23,961	-9,008	-32,968	6,02	-35,481	-2,343	0	-0,5	0,281	-2,578	-0,676	-0,623	0,394
36	ZINC93672397	-6,043	-0,336	-0,88	-1,553	-22,381	-8,906	-31,288	8,988	-38,625	-2,86	0	-0,5	0,354	-2,313	-0,668	-0,078	0,022
37	ZINC72322478	-6,042	-0,275	-0,77	-1,477	-30,892	-6,151	-37,043	5,848	-44,418	-1,387	0	-0,5	0,181	-3,478	-0,461	-0,608	0,211
38	ZINC13731265	-6,031	-0,287	-0,792	-1,491	-22,089	-13,183	-35,272	0,314	-39,934	-2,497	0	-0,389	0	-1,881	-0,989	-0,276	0
39	ZINC95006812	-6,03	-0,335	-0,878	-1,55	-18,654	-6,389	-25,043	1,217	-32,28	-1,911	0	-0,5	0,119	-1,297	-2,479	-0,191	0,229
40	ZINC63272441	-6,027	-0,274	-0,768	-1,473	-13,809	-22,841	-36,65	0,317	-52,492	-2,15	0	-0,5	0,179	-2,131	-1,713	0	0,288
41	ZINC00258698	-6,018	-0,301	-0,817	-1,506	-21,272	-10,689	-31,961	1,983	-40,106	-2,7	0	-0,5	0,209	-2,238	-0,802	0	0,014
42	ZINC20316182	-6,013	-0,301	-0,816	-1,505	-18,358	-11,536	-29,894	2,286	-39,468	-2,701	0	-0,5	0,297	-1,796	-0,865	-0,448	0
43	ZINC92129195	-6	-0,316	-0,843	-1,521	-21,109	-8,684	-29,793	2,592	-38,206	-0,9	0	-0,5	0,457	-2,268	-2,651	-0,137	0
44	ZINC92443372	-6	-0,3	-0,814	-1,501	-24,07	-10,479	-34,549	4,509	-42,204	-1,611	0	-0,5	0,373	-2,689	-0,786	-0,829	0,042



N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
45	ZINC92778317	-5,994	-0,315	-0,842	-1,52	-18,76	-8,869	-27,629	0,365	-34,972	-1,25	0	-0,5	0,117	-1,786	-2,665	0	0,09
46	ZINC37449919	-5,993	-0,3	-0,813	-1,5	-20,678	-11,737	-32,415	3,353	-42,745	-3,03	0	-0,5	0,197	-1,813	-0,88	0	0,033
47	ZINC45953378	-5,993	-0,3	-0,813	-1,5	-16,993	-13,987	-30,981	4,542	-38,855	-2,417	0	-0,5	0,1	-1,833	-1,049	-0,455	0,162
48	ZINC02545083	-5,991	-0,26	-0,741	-1,449	-26,122	-12,884	-39,007	3,83	-46,885	-1,984	0	-0,375	0,285	-3,059	-0,966	-0,044	0,154
49	ZINC55254853	-5,986	-0,239	-0,7	-1,419	-26,48	-7,065	-33,544	4,746	-44,502	-1,429	0	-0,342	0,27	-3,504	-0,53	-0,595	0,143
50	ZINC63227159	-5,983	-0,299	-0,812	-1,497	-16,497	-22,013	-38,51	3,42	-46,37	-1,733	0	-0,5	0,108	-2,207	-1,651	0	0
51	ZINC20317100	-5,98	-0,285	-0,786	-1,478	-18,486	-11,54	-30,026	2,083	-39,866	-2,703	0	-0,5	0,273	-1,801	-0,866	-0,445	0,061
52	ZINC39976834	-5,967	-0,298	-0,81	-1,493	-22,473	-10,039	-32,512	4,309	-39,437	-2,378	0	-0,369	0,282	-2,48	-0,753	-0,465	0,196
53	ZINC36972851	-5,948	-0,283	-0,781	-1,471	-24,541	-10,496	-35,037	2,295	-48,657	-1,95	0	-0,5	0,28	-2,575	-0,787	-0,415	0
54	ZINC63385878	-5,944	-0,27	-0,757	-1,453	-23,889	-19,11	-42,999	0,868	-59,82	-1,626	0	-0,495	0,174	-2,669	-1,433	-0,061	0,167
55	ZINC71388802	-5,939	-0,247	-0,714	-1,422	-28,878	-7,849	-36,727	3,009	-48,038	-2,278	0	-0,389	0,145	-2,869	-0,589	-0,465	0,504
56	ZINC16051666	-5,921	-0,296	-0,804	-1,482	-19,012	-7,862	-26,874	5,953	-39,043	-3,128	0	-0,5	0,193	-1,322	-0,59	-0,575	0
57	ZINC45348290	-5,914	-0,257	-0,731	-1,43	-24,863	-13,654	-38,517	2,303	-47,579	-2,054	0	-0,469	0,166	-3,28	-1,024	0	0,748
58	ZINC83237657	-5,913	-0,311	-0,83	-1,499	-22,534	-9,67	-32,204	4,841	-40,943	-1,8	0	-0,5	0,293	-2,786	-0,725	-0,426	0,032
59	ZINC93909162	-5,913	-0,257	-0,731	-1,43	-25,04	-9,887	-34,927	1,58	-47,185	-2,152	0	-0,399	0,222	-2,838	-0,742	-0,203	0,199
60	ZINC92841850	-5,907	-0,295	-0,802	-1,478	-24,102	-11,033	-35,135	6,202	-43,001	-2,452	0	-0,5	0,185	-2,313	-0,827	0	0
61	ZINC02525495	-5,901	-0,311	-0,829	-1,496	-17,99	-14,973	-32,963	3,944	-39,667	-2,181	0	-0,492	0	-1,685	-1,123	-0,42	0
62	ZINC93088526	-5,888	-0,31	-0,827	-1,493	-24,032	-9,486	-33,518	4,076	-40,301	-2,566	0	-0,5	0,428	-2,412	-0,711	-0,359	0,233
63	ZINC08952459	-5,878	-0,28	-0,772	-1,453	-28,574	-8,114	-36,688	0	-47,015	-2,475	0	-0,5	0,176	-2,031	-0,609	-0,572	0,133
64	ZINC31164699	-5,873	-0,28	-0,772	-1,452	-30,126	-6,83	-36,955	0,796	-47,823	-2,094	0	-0,5	0,183	-3,033	-0,512	-0,192	0,275
65	ZINC92918207	-5,871	-0,28	-0,771	-1,452	-24,379	-11,591	-35,97	5,329	-46,534	-2,102	0	-0,452	0,161	-2,293	-0,869	-0,343	0,027
66	ZINC91581288	-5,87	-0,294	-0,797	-1,469	-19,811	-8,061	-27,872	4,828	-34,475	-0,811	0	-0,5	0,294	-2,193	-2,605	-0,226	0,171
67	ZINC92780419	-5,869	-0,293	-0,796	-1,469	-25,492	-8,486	-33,977	0,67	-41,118	-1,13	-1,5	-0,5	0,201	-2,196	-0,636	-0,398	0,291
68	ZINC64858438	-5,864	-0,267	-0,747	-1,433	-32,685	-7,879	-40,564	2,098	-49,249	-2,14	0	-0,456	0,243	-2,701	-0,591	-0,274	0,054
69	ZINC95390770	-5,859	-0,244	-0,704	-1,402	-22,061	-12,741	-34,802	1,948	-47,769	-2,5	0	-0,416	0,228	-2,096	-0,956	-0,242	0,123
70	ZINC04510633	-5,846	-0,244	-0,703	-1,399	-29,682	-8,534	-38,216	2,105	-47,318	-1,898	0	-0,342	0,338	-2,898	-0,64	-0,406	0
71	ZINC04337330	-5,846	-0,278	-0,768	-1,445	-20,176	-8,694	-28,87	1,147	-34,418	-1,738	0	-0,5	0,196	-2,83	-0,652	-0,322	0
72	ZINC91297269	-5,843	-0,278	-0,768	-1,445	-22,213	-12,47	-34,683	4,74	-40,584	-2,63	0	-0,5	0,265	-1,981	-0,935	-0,062	0
73	ZINC95370343	-5,836	-0,254	-0,722	-1,411	-19,357	-17,365	-36,722	0,661	-49,495	-2,35	0	-0,439	0,394	-1,978	-1,302	-0,172	0,012
74	ZINC95471957	-5,831	-0,307	-0,819	-1,478	-23,726	-10,294	-34,02	0,877	-42,281	-1,761	0	-0,5	0,097	-2,418	-0,772	-0,636	0,16
75	ZINC37289765	-5,814	-0,277	-0,764	-1,438	-22,354	-14,016	-36,37	4,442	-44,313	-2,837	0	-0,5	0,271	-1,532	-1,051	-0,165	0
76	ZINC78405405	-5,807	-0,29	-0,788	-1,453	-25,693	-8,17	-33,863	0,323	-44,617	-1,741	0	-0,5	0,203	-2,907	-0,613	-0,251	0
77	ZINC63376374	-5,806	-0,264	-0,739	-1,419	-20,321	-22,952	-43,273	22,296	-44,558	-1,688	0	-0,5	0,178	-2,192	-1,721	-0,168	0,285
78	ZINC94681111	-5,804	-0,29	-0,788	-1,453	-22,358	-10,14	-32,498	1,192	-43,3	-1,857	0	-0,5	0,215	-2,958	-0,761	-0,14	0,196
79	ZINC71775858	-5,799	-0,305	-0,814	-1,47	-22,552	-10,792	-33,345	6,725	-42,069	-1,985	0	-0,5	0,217	-2,721	-0,809	0	0
80	ZINC93672634	-5,796	-0,305	-0,814	-1,469	-26,553	-4,991	-31,543	4,585	-40,702	-2,267	0	-0,5	0,218	-2,784	-0,374	-0,166	0,077
81	ZINC12086730	-5,796	-0,232	-0,678	-1,374	-24,567	-9,717	-34,284	0,256	-42,815	-2,601	0	-0,342	0,068	-2,256	-0,729	-0,096	0,16
82	ZINC08715467	-5,788	-0,263	-0,737	-1,415	-28,827	-8,824	-37,652	8,961	-43,027	-1,757	0	-0,436	0,235	-2,881	-0,662	-0,287	0
83	ZINC45954288	-5,781	-0,304	-0,812	-1,466	-22,282	-11,522	-33,804	6,864	-34,938	-1,738	0	-0,5	0,099	-2,457	-0,864	-0,32	0
84	ZINC37449605	-5,778	-0,289	-0,784	-1,446	-20,916	-11,097	-32,013	2,6	-40,833	-2,526	0	-0,5	0,299	-2,201	-0,832	-0,053	0,035
85	ZINC01691305	-5,775	-0,289	-0,784	-1,445	-16,006	-17,363	-33,369	0,545	-41,598	-2,828	0	-0,439	0	-1,024	-1,302	-0,181	0
86	ZINC03953841	-5,772	-0,289	-0,783	-1,444	-24,458	-11,924	-36,382	5,14	-44,861	-2,543	0	-0,5	0,193	-1,623	-0,894	-0,405	0
87	ZINC72344049	-5,772	-0,304	-0,811	-1,463	-21,258	-12,858	-34,116	5,699	-40,505	-2,275	0	-0,5	0,221	-2,122	-0,964	-0,131	0
88	ZINC74721483	-5,77	-0,275	-0,758	-1,427	-20,207	-11,73	-31,937	6,237	-39,289	-2,265	0	-0,5	0,285	-2,41	-0,88	0	0
89	ZINC91725745	-5,767	-0,251	-0,713	-1,395	-18,879	-12,949	-31,828	3,156	-42,745	-1,942	0	-0,429	0,388	-2,687	-0,971	-0,256	0,13



N	Compuesto	Score	GL-1	GL-2	GL-3	GL-4	GL-5	GL-6	GL-7	GL-8	XP-1	XP-2	XP-3	XP-4	XP-5	XP-6	XP-7	XP-8
90	ZINC93091875	-5,767	-0,288	-0,783	-1,443	-19,103	-11,597	-30,7	2,234	-43,652	-2,334	0	-0,5	0,177	-2,285	-0,87	-0,212	0,257
91	ZINC94293248	-5,764	-0,274	-0,757	-1,425	-28,367	-9,344	-37,712	4,224	-42,928	-1,902	0	-0,5	0,36	-2,614	-0,701	-0,441	0,033
92	ZINC93672186	-5,763	-0,303	-0,809	-1,461	-27,529	-5,61	-33,14	11,122	-38,963	-2,011	0	-0,5	0,454	-3,593	-0,421	0	0,308
93	ZINC78405415	-5,761	-0,274	-0,757	-1,425	-26,209	-7,806	-34,015	2,649	-41,949	-1,8	0	-0,5	0,191	-2,881	-0,585	-0,186	0
94	ZINC93678609	-5,76	-0,288	-0,782	-1,441	-23,908	-7,844	-31,752	0,843	-42,389	-1,564	0	-0,5	0,209	-2,102	-0,588	-0,205	0,29
95	ZINC65407511	-5,756	-0,25	-0,712	-1,392	-25,504	-8,868	-34,372	1,401	-45,151	-2,199	0	-0,476	0,336	-2,966	-0,665	0	0,214
96	ZINC37433763	-5,752	-0,274	-0,756	-1,422	-28,624	-11,185	-39,808	2,431	-49,72	-1,772	0	-0,462	0,328	-2,585	-0,839	-0,608	0,186
97	ZINC72481929	-5,748	-0,274	-0,755	-1,421	-17,735	-8,303	-26,038	1,296	-36,799	-3,124	0	-0,5	0,176	-1,367	-0,623	-0,31	0
98	ZINC78405408	-5,746	-0,274	-0,755	-1,421	-24,142	-7,149	-31,291	17,942	-23,957	-1,441	0	-0,5	0,191	-2,998	-0,536	-0,462	0
99	ZINC36983862	-5,739	-0,273	-0,754	-1,419	-20,506	-13,962	-34,468	10,003	-40,298	-2,41	0	-0,445	0,399	-2,42	-1,047	0	0,186
100	ZINC65372169	-5,725	-0,286	-0,777	-1,433	-21,599	-14,098	-35,697	4,268	-40,529	-2,764	0	-0,5	0,299	-1,671	-1,057	-0,127	0,095



---

# ANEXO B

---

NUEVOS PARÁMETROS FF



## 1 CONTENIDO

2	TOPOLOGÍAS DE RESIDUOS AGREGADOS AL CAMPO DE FUERZAS.....	113
2.1	NAD.....	113
2.2	DTA.....	117
2.3	DTI.....	119
2.4	ACP.....	121
2.5	ADP-RIBOSA .....	123
2.6	NICOTINAMIDA .....	126
3	PARÁMETROS AGREGADOS AL CAMPO DE FUERZAS .....	127
3.1	TIPOS DE ENLACE.....	127
3.2	TIPOS DE ÁNGULOS.....	127
3.3	TIPOS DE DIEDROS .....	128





## 2 TOPOLOGÍAS DE RESIDUOS AGREGADOS AL CAMPO DE FUERZAS

### 2.1 NAD

[ NAD ]; NAD+ BDD MU – EB

[ atoms ]

C6N	CA	0.05510	1
H6N	H4	0.20620	2
C5N	CA	-0.26410	3
H5N	HA	0.21020	4
C4N	CA	0.13880	5
H4N	HA	0.15800	6
C3N	CA	-0.23450	7
C7N	C	0.82170	8
O7N	O	-0.54280	9
N7N	N	-0.95200	10
H7N1	H	0.42270	11
H7N2	H	0.42270	12
C2N	CA	0.03650	13
H2N	H4	0.15490	14
N1N	N*	0.08310	15
C1D	CT	0.32190	16
H1D	H2	0.07760	17
C2D	CT	0.06700	18
H2D	H1	0.09720	19
O2D	OH	-0.61390	20
HO2D	HO	0.41860	21
C3D	CT	0.20220	22
H3D	H1	0.06150	23
O3D	OH	-0.65410	24
HO3D	HO	0.43760	25
C4D	CT	0.10650	26
H4D	H1	0.11740	27
O4D	OS	-0.35480	28
C5D	CT	0.05580	29
H5D1	H1	0.06790	30
H5D2	H1	0.06790	31
O5D	OS	-0.56610	32
PN	P	1.37290	33
O1N	O2	-0.85580	34
O2N	O2	-0.85580	35
O3	OS	-0.57600	36
PA	P	1.37290	37
O1A	O2	-0.85580	38
O2A	O2	-0.85580	39
O5B	OS	-0.56610	40
C5B	CT	0.05580	41
H5B1	H1	0.06790	42
H5B2	H1	0.06790	43
C4B	CT	0.10650	44
H4B	H1	0.11740	45

O4B	OS	-0.35480	46
C3B	CT	0.20220	47
H3B	H1	0.06150	48
O3B	OH	-0.65410	49
HO3B	HO	0.43760	50
C2B	CT	0.06700	51
H2B	H1	0.09720	52
O2B	OH	-0.61390	53
HO2B	HO	0.41860	54
C1B	CT	0.03940	55
H1B	H2	0.20070	56
N9A	N*	-0.02510	57
C8A	CK	0.20060	58
H8A	H5	0.15530	59
N7A	NB	-0.60730	60
C5A	CB	0.05150	61
C6A	CA	0.70090	62
N6A	N2	-0.90190	63
H6A1	H	0.41150	64
H6A2	H	0.41150	65
N1A	NC	-0.76150	66
C2A	CQ	0.58750	67
H2A	H5	0.04730	68
N3A	NC	-0.69970	69
C4A	CB	0.30530	70

[ bonds ]

C6N	H6N
C6N	C5N
C6N	N1N
C5N	H5N
C5N	C4N
C4N	H4N
C4N	C3N
C3N	C7N
C3N	C2N
C7N	O7N
C7N	N7N
N7N	H7N1
N7N	H7N2
C2N	H2N
C2N	N1N
N1N	C1D
C1D	H1D
C1D	C2D
C1D	O4D
C2D	H2D
C2D	O2D
C2D	C3D
O2D	HO2D
C3D	H3D



C3D	O3D
C3D	C4D
O3D	HO3D
C4D	H4D
C4D	O4D
C4D	C5D
C5D	H5D1
C5D	H5D2
C5D	O5D
O5D	PN
PN	O1N
PN	O2N
PN	O3
O3	PA
PA	O1A
PA	O2A
PA	O5B
O5B	C5B
C5B	H5B1
C5B	H5B2
C5B	C4B
C4B	H4B
C4B	O4B
C4B	C3B
O4B	C1B
C3B	H3B
C3B	O3B
C3B	C2B
O3B	HO3B
C2B	H2B
C2B	O2B
C2B	C1B
O2B	HO2B
C1B	H1B
C1B	N9A
N9A	C8A
N9A	C4A
C8A	H8A
C8A	N7A
N7A	C5A
C5A	C6A
C5A	C4A
C6A	N6A
C6A	N1A
N6A	H6A1
N6A	H6A2
N1A	C2A
C2A	H2A
C2A	N3A
N3A	C4A

[ impropers ]

C6N	C2N	N1N	C1D
N1N	C3N	C2N	H2N
C2N	C4N	C3N	C7N
C3N	C5N	C4N	H4N
C4N	C6N	C5N	H5N
C5N	N1N	C6N	H6N
C3N	N7N	C7N	O7N
C7N	H7N1	N7N	H7N2
C8A	C4A	N9A	C1B
C6A	H6A1	N6A	H6A2
N7A	N9A	C8A	H8A
N1A	N3A	C2A	H2A
C5A	N1A	C6A	N6A

## 2.2 DTA

[ DDE ]; DTA – JMB – EB

[ atoms ]

N	N	-0.41570	1
H	H	0.27190	2
CA	CT	-0.01631	3
HA	H1	0.13600	4
CB	CT	0.04567	5
HB1	HC	0.02792	6
HB2	HC	0.02792	7
CG	CC	-0.02314	8
ND1	NB	-0.31057	9
CE1	CR	0.35828	10
NE2	NA	-0.41735	11
HE2	H	0.37916	12
CD2	CW	-0.17038	13
HD2	H4	0.21200	14
C	C	0.59730	15
O	O	-0.56790	16
CAT	CT	-0.35179	17
H11	HC	0.13814	18
H12	HC	0.13814	19
CAU	CT	0.21230	20
H21	HC	-0.00089	21
H22	HC	-0.00089	22
CBW	CT	-0.20866	23
H3	H2	0.16418	24
NCB	N3	-0.01823	25
CAC	CT	-0.33258	26
H71	H1	0.18157	27
H72	H1	0.18157	28
H73	H1	0.18157	29
CAA	CT	-0.33258	30
HN31	H1	0.18157	31
HN32	H1	0.18157	32
HN33	H1	0.18157	33
CAB	CT	-0.33258	34
H61	H1	0.18157	35
H62	H1	0.18157	36
H63	H1	0.18157	37
CBI	C	0.83107	38
OAG	O	-0.56609	39
NAD	N	-0.98825	40
H41	H	0.43991	41
H42	H	0.43991	42

[ bonds ]

N	H
N	CA
CA	HA

CA	CB
CA	C
CB	HB2
CB	HB1
CB	CG
CG	ND1
CG	CD2
ND1	CE1
CE1	NE2
NE2	HE2
NE2	CD2
CD2	HD2
C	O
-C	N
CE1	CAT
CAT	H11
CAT	H12
CAT	CAU
CAU	H21
CAU	H22
CAU	CBW
CBW	H3
CBW	NCB
NCB	CAC
CAC	H71
CAC	H72
CAC	H73
NCB	CAA
CAA	HN31
CAA	HN32
CAA	HN33
NCB	CAB
CAB	H61
CAB	H62
CAB	H63
CBW	CBI
CBI	OAG
CBI	NAD
NAD	H41
NAD	H42

[ impropers ]

-C	CA	N	H
CA	+N	C	O
CE1	CD2	NE2	HE2
CG	NE2	CD2	HD2
ND1	NE2	CE1	CAT
ND1	CD2	CG	CB

## 2.3 DTI

[ DTI ]; DTI – JMB – EB

[ atoms ]

N	N	-0.41570	1
H	H	0.27190	2
CA	CT	-0.007391	3
HA	H1	0.13600	4
CB	CT	-0.040924	5
HB1	HC	0.028539	6
HB2	HC	0.028539	7
CG	CC	0.203986	8
ND1	NB	-0.580825	9
CE1	CR	0.588884	10
NE2	NA	-0.382840	11
HE2	H	0.362680	12
CD2	CW	-0.347098	13
HD2	H4	0.222268	14
C	C	0.59730	15
O	O	-0.56790	16
CAT	CT	-0.524933	17
H11	HC	0.133896	18
H12	HC	0.133896	19
CAU	CT	0.375651	20
H21	HC	-0.056608	21
H22	HC	-0.056608	22
CBW	CT	-0.019938	23
H3	H2	0.061486	24
NCB	N3	0.159363	25
CAC	CT	-0.085359	26
H71	H1	0.072736	27
H72	H1	0.072736	28
H73	H1	0.072736	29
CAA	CT	-0.085359	30
HN31	H1	0.072736	31
HN32	H1	0.072736	32
HN33	H1	0.072736	33
CAB	CT	-0.085359	34
H61	H1	0.072736	35
H62	H1	0.072736	36
H63	H1	0.072736	37
CBI	C	0.749915	38
OAG	O	-0.726043	39
O5	O	-0.726043	40

## [ bonds ]

N	H
N	CA
CA	HA
CA	CB
CA	C
CB	HB2
CB	HB1
CB	CG
CG	ND1
CG	CD2
ND1	CE1
CE1	NE2
NE2	HE2
NE2	CD2
CD2	HD2
C	O
-C	N
CE1	CAT
CAT	H11
CAT	H12
CAT	CAU
CAU	H21
CAU	H22
CAU	CBW
CBW	H3
CBW	NCB
NCB	CAC
CAC	H71
CAC	H72
CAC	H73
NCB	CAA
CAA	HN31
CAA	HN32
CAA	HN33
NCB	CAB
CAB	H61
CAB	H62
CAB	H63
CBW	CBI
CBI	OAG
CBI	O5

## [ impropers ]

-C	CA	N	H
CA	+N	C	O
CE1	CD2	NE2	HE2
CG	NE2	CD2	HD2
ND1	NE2	CE1	CAT
ND1	CD2	CG	CB

## 2.4 ACP

[ ACP ] ; ACP – JMB – EB

[ atoms ]

N	N	-0.41570	1
H	H	0.27190	2
CA	CT	0.002236	3
HA	H1	0.13600	4
CB	CT	-0.062840	5
HB1	HC	0.034100	6
HB2	HC	0.034100	7
CG	CC	0.200964	8
ND1	NB	-0.584399	9
CE1	CR	0.618459	10
NE2	NA	-0.420819	11
HE2	H	0.370591	12
CD2	CW	-0.322844	13
HD2	H4	0.220142	14
C	C	0.59730	15
O	O	-0.56790	16
CAT	CT	-0.502189	17
H11	HC	0.144200	18
H12	HC	0.144200	19
CAU	CT	0.185610	20
H21	HC	-0.009948	21
H22	HC	-0.009948	22
CBW	CT	0.104007	23
H3	H2	0.063774	24
NCB	N3	-0.520668	25
HN31	H	0.320002	26
HN32	H	0.320002	27
HN33	H	0.320002	28
CBI	C	0.757675	29
OAG	O	-0.714005	30
O5	O	-0.714005	31

[ bonds ]

N	H
N	CA
CA	HA
CA	CB
CA	C
CB	HB2
CB	HB1
CB	CG
CG	ND1
CG	CD2
ND1	CE1
CE1	NE2
NE2	HE2
NE2	CD2

CD2	HD2
C	O
-C	N
CE1	CAT
CAT	H11
CAT	H12
CAT	CAU
CAU	H21
CAU	H22
CAU	CBW
CBW	H3
CBW	NCB
NCB	HN31
NCB	HN32
NCB	HN33
CBW	CBI
CBI	OAG
CBI	O5

[ impropers ]

-C	CA	N	H
CA	+N	C	O
CE1	CD2	NE2	HE2
CG	NE2	CD2	HD2
ND1	NE2	CE1	CAT
ND1	CD2	CG	CB



## 2.5 ADP-ribosa

[ ADR ] ; ADP-ribosa – EB

[ atoms ]

O3D	OH	-0.688059	1
HO3D	HO	0.427993	2
C3D	CT	0.245861	3
H3D	H1	0.077965	4
C2D	CT	0.188934	5
H2D	H1	0.079734	6
O2D	OH	-0.759157	7
HO2D	HO	0.502750	8
C1D	CM	0.894273	9
H1D	HA	0.008181	10
O4D	OS	-0.511638	11
C4D	CT	0.387158	12
H4D	H1	0.016413	13
C5D	CT	0.073708	14
H5D1	H1	0.077257	15
H5D2	H1	0.077257	16
O5D	OS	-0.450488	17
PN	P	1.115185	18
O1N	O2	-0.819912	19
O2N	O2	-0.819912	20
O3	OS	-0.378085	21
PA	P	1.160370	22
O1A	O2	-0.810948	23
O2A	O2	-0.810948	24
O5B	OS	-0.541558	25
C5B	CT	0.286372	26
H5B1	H1	0.016321	27
H5B2	H1	0.016321	28
C4B	CT	-0.081003	29
H4B	H1	0.210925	30
C3B	CT	0.351974	31
H3B	H1	-0.068642	32
O3B	OH	-0.676967	33
HO3B	HO	0.414301	34
C2B	CT	0.416005	35
H2B	H1	0.004036	36
O2B	OH	-0.706099	37
HO2B	HO	0.443310	38
O4B	OS	-0.255228	39
C1B	CT	-0.207066	40
H1B	H2	0.159382	41
N9A	N*	0.005227	42
C8A	CK	0.214430	43
H8A	H5	0.122501	44
N7A	NB	-0.604850	45
C5A	CB	-0.029131	46
C6A	CA	0.807123	47

N6A	N2	-0.987748	48
H6A1	H	0.428205	49
H6A2	H	0.428205	50
N1A	NC	-0.792485	51
C2A	CQ	0.498264	52
H2A	H5	0.077338	53
N3A	NC	-0.546525	54
C4A	CB	0.313162	55

[ bonds ]

O3D	HO3D
O3D	C3D
C3D	H3D
C3D	C2D
C3D	C4D
C2D	H2D
C2D	O2D
C2D	C1D
O2D	HO2D
C1D	H1D
C1D	O4D
O4D	C4D
C4D	H4D
C4D	C5D
C5D	H5D1
C5D	H5D2
C5D	O5D
O5D	PN
PN	O1N
PN	O2N
PN	O3
O3	PA
PA	O1A
PA	O2A
PA	O5B
O5B	C5B
C5B	H5B1
C5B	H5B2
C5B	C4B
C4B	H4B
C4B	C3B
C4B	O4B
C3B	H3B
C3B	O3B
C3B	C2B
O3B	HO3B
C2B	H2B
C2B	O2B
C2B	C1B
O2B	HO2B
O4B	C1B

C1B H1B  
C1B N9A  
N9A C8A  
N9A C4A  
C8A H8A  
C8A N7A  
N7A C5A  
C5A C6A  
C5A C4A  
C6A N6A  
C6A N1A  
N6A H6A1  
N6A H6A2  
N1A C2A  
C2A H2A  
C2A N3A  
N3A C4A

[ impropers ]

C2D H1D C1D O4D  
H8A N9A C8A N7A  
C5A N9A C4A N3A  
C5A N6A C6A N1A  
C6A H6A1 N6A H6A2  
C6A C4A C5A N7A  
H2A N1A C2A N3A  
C4A C8A N9A C1B

## 2.6 Nicotinamida

[ NIC ] ; Nicotinamida – EB

## [ atoms ]

C4N	CA	0.251457	1
H4N	HA	0.096699	2
C5N	CA	-0.510322	3
H5N	HA	0.193664	4
C6N	CA	0.480098	5
H6N	H4	0.042688	6
N1N	NC	-0.694812	7
C2N	CA	0.510718	8
H2N	H4	0.026525	9
C3N	CA	-0.498356	10
C7N	C	0.857024	11
N7N	N	-0.972251	12
H7N1	H	0.404884	13
H7N2	H	0.404884	14
O7N	O	-0.592902	15

## [ bonds ]

C4N	H4N
C4N	C5N
C4N	C3N
C5N	H5N
C5N	C6N
C6N	H6N
C6N	N1N
N1N	C2N
C2N	H2N
C2N	C3N
C3N	C7N
C7N	N7N
C7N	O7N
N7N	H7N1
N7N	H7N2

## [ impropers ]

N1N	C3N	C2N	H2N
C2N	C4N	C3N	C7N
C3N	C5N	C4N	H4N
C4N	C6N	C5N	H5N
C5N	N1N	C6N	H6N
C3N	N7N	C7N	O7N
C7N	H7N1	N7N	H7N2

### 3 PARÁMETROS AGREGADOS AL CAMPO DE FUERZAS

#### 3.1 Tipos de enlace

[ bondtypes ]

;i	j	func	b0	kb	
CA	N*	1	0.13440	374886.4	; NAD+ por BDD MU – EB
CR	CT	1	0.14990	282250.0	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB

#### 3.2 Tipos de ángulos

[ angletypes ]

;i	j	k	func	th0	cth	
CA	C	O	1	119.800	669.440	; NAD+ por BDD MU – EB
CA	C	N	1	115.700	585.760	; NAD+ por BDD MU – EB
C	CA	CT	1	120.000	527.184	; NAD+ por BDD MU – EB
CA	CA	N*	1	119.500	585.760	; NAD+ por BDD MU – EB
CT	CA	HA	1	120.000	292.880	; NAD+ por BDD MU – EB
H4	CA	N*	1	114.000	292.880	; NAD+ por BDD MU – EB
CA	CT	CA	1	120.000	527.184	; NAD+ por BDD MU – EB
CA	N*	CA	1	121.200	585.760	; NAD+ por BDD MU – EB
CA	N*	CT	1	120.600	585.760	; NAD+ por BDD MU – EB
CT	CR	NB	1	120.000	560.150	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB
CT	CR	NA	1	120.000	549.530	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB
CR	CT	CT	1	109.500	541.330	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB
CR	CT	HC	1	109.500	394.970	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB
H2	CT	N3	1	109.500	410.200	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB
C	CT	H2	1	109.500	395.220	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB
N3	CT	H1	1	107.910	410.200	; DTA, DTI y ACP – JMB – EB
OH	CT	CM	1	110.210	570.530	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
CT	CM	OS	1	112.690	575.470	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
HA	CM	OS	1	116.110	432.210	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
CM	OS	CT	1	112.090	537.310	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
CA	CA	NC	1	119.720	586.930	; Nicotinamida de GAFF – EB – NIC
H4	CA	NC	1	120.540	438.400	; Nicotinamida de GAFF – EB – NIC
CA	NC	CA	1	109.950	591.870	; Nicotinamida de GAFF – EB – NIC
NC	CA	H4	1	120.540	438.400	; Nicotinamida de GAFF – EB – NIC
NC	CA	CA	1	119.720	586.930	; Nicotinamida de GAFF – EB – NIC

## 3.3 Tipos de diedros

[ dihedraltypes ]

;i	j	k	l	func	phase	kd	pn	
CA	CA	N*	CT	4	180.00	4.18400	2	; NAD+ Impro. por BDD UM – EB
CA	CA	CA	C	4	180.00	4.60240	2	; NAD+ Impro. por BDD UM – EB
CA	CT	CA	C	4	180.00	4.60240	2	; NAD+ Impro. por BDD UM – EB
CT	CA	CA	C	4	180.00	4.60240	2	; NAD+ Impro. por BDD UM – EB
NB	NA	CR	CT	4	180.00	4.60240	2	; DTA, DTI y ACP por JMB – EB
CT	HA	CM	OS	4	180.00	4.60240	2	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
H5	N*	CK	NB	4	180.00	4.60240	2	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
NB	CB	CB	CA	4	180.00	4.60240	2	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
CB	N*	CB	NC	4	180.00	4.60240	2	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR
H5	NC	CQ	NC	4	180.00	4.60240	2	; ADP-ribosa de GAFF – EB – ADR

[ dihedraltypes ]

;i	j	k	l	func	phase	kd	pn	
X	CA	N*	X	9	180.0	7.74040	2	; NAD+ Dihed. por BDD MU – EB
CA	CA	C	O	9	180.0	0.02092	1	; NAD+ Dihed. por BDD MU – EB
CA	CA	C	O	9	180.0	0.47070	2	; NAD+ Dihed. por BDD MU – EB
CA	CA	C	N	9	180.0	0.02092	1	; NAD+ Dihed. por BDD MU – EB
CA	CA	C	N	9	180.0	0.47070	2	; NAD+ Dihed. por BDD MU – EB
X	CR	CT	X	9	0.0	0.00000	0	; DTA, DTI y ACP por JMB – EB

---

# ANEXO C

---

BASE DE DATOS DE DIANAS BIOLÓGICAS





## 1.1 Estructuras que cumplen con los criterios de selección

Técnica	Resolución	Categoría	Subcategoría	Tipo	PDB
dRX	1,8	Glutathione S-transferase	Mu Class		1XW5
dRX	1,5	Glutathione S-transferase	Theta Class		2C3N
dRX	1,9	Glutathione S-transferase	Zeta Class		1FW1
dRX	1,3	Glutathione S-transferase	Alpha Class		1K3Y
dRX	2,0	Glutathione S-transferase	Omega Class		1EEM
dRX	1,4	Glutathione S-transferase	Pi Class		2A2R
dRX	1,95	Fumarase			3E04
dRX	1,5	Phenylalanine hydroxylase			1J8U
dRX	1,6	Monoamine oxidase	B		2XFN
dRX	2,2	Monoamine oxidase	A		2Z5X
dRX	2,1	Glutathione synthetase			2HGS
dRX	2,7	Glutamate dehydrogenase			1L1F
dRX	2,14	ICE-like cysteine protease (Capases)	Caspase 7		2QL9
dRX	1,18	ICE-like cysteine protease (Capases)	Caspase 8		4JJ7
dRX	2,8	ICE-like cysteine protease (Capases)	Caspase 9		1JXQ
dRX	1,9	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase			1Z7G
dRX	1,57	Alkaline phosphatase			1ZED
dRX	2,36	Butyrylcholinesterase			4B00
RMN	N/A	Fatty acid-binding protein	Heart		1G5W
RMN	N/A	Fatty acid-binding protein	Epidermal		1JJJ
dRX	1,4	Fatty acid-binding protein	Muscle		1HMR
dRX	1,53	Fatty acid-binding protein	Testicles		4A60
RMN	N/A	Fatty acid-binding protein	Ileal		1O1V
RMN	N/A	Fatty acid-binding protein	Liver		2L67
dRX	1,06	Fatty acid-binding protein	Adipocyte		3P6D
RMN	N/A	Fatty acid-binding protein	Brain		1JJX
RMN	N/A	Fatty acid-binding protein	Intestinal		1KZW
dRX	1,48	Aldehyde dehydrogenase	3A1		3SZA
dRX	1,3	Aldehyde dehydrogenase	7A1		2J6L
dRX	1,5	Aldehyde dehydrogenase	2		3N80
dRX	1,47	Phosphoglycerate kinase			2WZB
dRX	1,8	Glycogen phosphorylase			3DDS
dRX	1,55	Peroxidase	Glutathione peroxidase		2OBI
dRX	1,75	Peroxidase	Myeloperoxidase		1D2V
dRX	1,45	Peroxidase	Peroxiredoxin		3MNG
dRX	1,62	Phosphoglucose isomerase			1IAT
dRX	2,8	Extracellular regulated kinase ERK	ERK5		4IC8
dRX	2,39	Extracellular regulated kinase ERK	ERK1		2ZOQ

Técnica	Resolución	Categoría	Subcategoría	Tipo	PDB
dRX	1,55	Extracellular regulated kinase ERK	ERK2		2Y9Q
dRX	2,25	Extracellular regulated kinase ERK	ERK6		2I6L
dRX	1,85	Ornithine transcarbamoylase			1OTH
dRX	1,9	G protein			2ODE
dRX	1,9	Cathepsin	B		1GMY
dRX	0,9	Cathepsin	L		2XU3
dRX	1,67	Gamma-glutamyl-transferase			4GDY
dRX	2,1	Tumor necrosis factor			3L9J
dRX	1,9	HLA	Class II		1FV1
dRX	1,09	HLA	Class I		1K5N
dRX	1,72	Carbonic anhydrase	Type IV		3FW3
dRX	1,45	Carbonic anhydrase	Type XII		4HT2
dRX	1,55	Carbonic anhydrase	Type XIII		3DON
dRX	0,9	Carbonic anhydrase	Type II		3K34
dRX	1,55	Carbonic anhydrase	Type I		2NMX
dRX	2,32	Carbonic anhydrase	Type VII		3MDZ
dRX	1,07	Superoxide dismutase	Cu-Zn		2C9V
dRX	1,85	Superoxide dismutase	Mn		1XDC
dRX	1,8	C-JUN N-terminal kinase (JNK)	JNK1		3ELJ
dRX	1,7	C-JUN N-terminal kinase (JNK)	JNK3		3OY1
dRX	1,6	Pyruvate kinase			3GR4
dRX	2,16	Acetylcholinesterase			4EY4
dRX	2,6	Acetylcholinesterase	complexed with Fasciculin 2 (GMV)		4EY8
RMN	N/A	Cytochrome	Cytochrome C		1J3S
dRX	1,4	Cytochrome	NADPH Cytochrome P450 reductase		3QFS
RMN	N/A	Cytochrome	Cytochrome B	B5	2I96
dRX	1,45	Cytochrome	Cytochrome B	B5	3NER
dRX	2	Cytochrome	Cytochrome B	B-245 (B558)	3A1F
dRX	1,95	Cytochrome	Cytochrome P450	1A2	2HI4
dRX	2,15	Cytochrome	Cytochrome P450	7A1	3DAX
dRX	2,49	Cytochrome	Cytochrome P450	11B2	4DVQ
dRX	2,1	Cytochrome	Cytochrome P450	2D6	3TBG
dRX	2,1	Cytochrome	Cytochrome P450	2A13	4EJI
dRX	2	Cytochrome	Cytochrome P450	3A4	3NXU
dRX	2,8	Cytochrome	Cytochrome P450	51A1	3LD6
dRX	2,4	Cytochrome	Cytochrome P450	17A1	3SWZ
dRX	2,6	Cytochrome	Cytochrome P450	1A1	4I8V
dRX	2,3	Cytochrome	Cytochrome P450	2R1	3CZH
dRX	1,65	Cytochrome	Cytochrome P450	2A6	2FDV
dRX	2,2	Cytochrome	Cytochrome P450	2E1	3E6I

Técnica	Resolución	Categoría	Subcategoría	Tipo	PDB
dRX	1,6	Cytochrome	Cytochrome P450	46A1	3MDM
dRX	2,1	Cytochrome	Cytochrome P450	11A1	3N9Y
dRX	2,87	Cytochrome	Cytochrome P450	2C19	4GQS
dRX	2,75	Cytochrome	Cytochrome P450	19A1	3S79
dRX	2,28	Cytochrome	Cytochrome P450	2C8	2NNJ
dRX	2,7	Cytochrome	Cytochrome P450	1B1	3PM0
dRX	1,25	Cytochrome	NADH Cytochrome B5 oxidoreductase		3LF5
RMN	N/A	Lysosomal phospholipases	C	Gamma	2HSP
RMN	N/A	Lysosomal phospholipases	C	Epsilon	2BYE
dRX	1,62	Lysosomal phospholipases	C	Beta	2ZKM
RMN	N/A	Lysosomal phospholipases	A	A1	2KYT
RMN	N/A	Lysosomal phospholipases	A	A2	1BCI
dRX	2,25	Hexokinase			1QHA
dRX	1,5	UDP-galactose 4-epimerase			1EK6
dRX	1,5	Multidrug transporter	MRP1		2CBZ
dRX	1,85	Aconitase			2B3Y
dRX	1,71	Tryptophan hydroxylase			1MLW
RMN	N/A	Gastric glycoproteins	Mucin-1		2ACM
dRX	1,67	Retinoblastoma protein (Rb)			2R7G
dRX	1,6	Arginase	Type II		4HZE
dRX	1,29	Arginase	Type I		2AEB
RMN	N/A	Insulin			2JV1
dRX	1,7	Triose phosphate isomerase			2JK2
RMN	N/A	P53 protein			1PET
dRX	1,98	Catechol O-methyltransferase			3BWM
dRX	1,5	Catalase			1DGF
RMN	N/A	Bcl-X protein			1YSN
dRX	1,45	Acyl-CoA dehydrogenase			2UXW
dRX	1,9	Alcohol dehydrogenase	CHI		2FZE
dRX	1,6	Alcohol dehydrogenase	BETA		1U3U
dRX	1,45	Alcohol dehydrogenase	GAMMA		1U3W
dRX	2,49	Alcohol dehydrogenase	ALPHA		1U3T
dRX	2,5	Alcohol dehydrogenase	SIGMA		1D1S

## 1.2 Proteínas para las cuáles no se consiguieron estructuras que cumplieran con los criterios de selección

Categoría	Subcategoría
NMDR receptor	
ATP synthase	
Na(+)-K(+)-ATPases	
Leucine aminopeptidase	
Phosphatidylinositol-specific phospholipase C	
Phosphofructokinase	
P-glycoproteins	
Basolateral transporter (1-GLUT1)	
Multidrug transporter	MDR1
N-acetyl-beta-D-glucosaminidase	
Tyrosine hydroxylase	
Carbamoyl phosphate synthetase	
Cytochrome oxidase	

## AGRADECIMIENTOS

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS\_NAC\_2014\_1\_102859.

PEDECIBA.

Facultad de Química – UdelaR.

