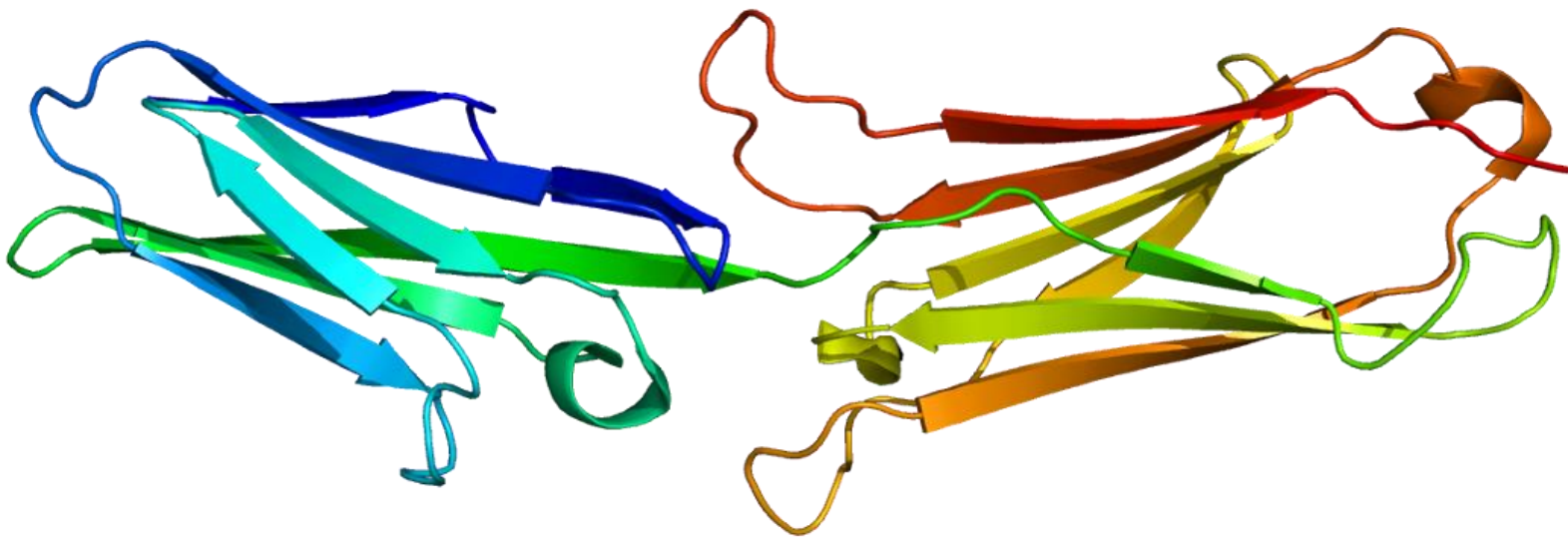


# Una adhesió no desitjable

Disseny virtual d'inhibidors indòlics i quinolònics de VCAM-1 mitjançant tècniques de química computacional.



*“El càncer és el preu que paguem per estar vius.”*

*Dr. Joan Massagué*

**Abreviatures:**

BBB: *Blood Brain Barrier*

VCAM-1: *Vascular cell adhesion molecule 1*

L1CAM: Cell adhesion molecule ligand 1

FCM: Flavonoides del Citrus unshiu Marc

PA: *Plasminogen activator*

FDA: Food and Drug Administration

## **Índex**

1. Objectius.....	Pàg. 4
2. Introducció.....	Pàg. 5
2.1. Càncer .....	Pàg. 5
2.2. Els receptors de membrana VCAM-1 i L1CAM .....	Pàg. 7
2.3. Els inhibidors	
2.3.1. L'indol .....	Pàg. 10
2.3.2. La quinolina .....	Pàg. 12
3. La química computacional en investigació oncoteràpèutica .....	Pàg. 13
3.1. Procediment seguit al fer un docking .....	Pàg. 14
3.2. Regles de Lipinski .....	Pàg. 20
4. Resultats i discussió (cos) .....	Pàg. 21
4.1. Indol	
4.1.1. Substitució d'hidrògens .....	Pàg. 21
4.1.2. Disseny de molècules inhibidores.....	Pàg. 23
4.1.3. Imatges dels dockings .....	Pàg. 30
4.2. Quinolina.....	Pàg. 32
5. Conclusió.....	Pàg. 47
6. Bibliografia/webgrafia .....	Pàg. 49
7. Agraïments.....	Pàg. 51
8. Apèndix: La resposta del Dr. Massagué.....	Pàg. 52

## 1. Objectius

L'objectiu principal d'aquest projecte és el disseny de nous compostos derivats de l'indol i la quinolina per fer inhibidors de VCAM-1 i evitar la metàstasi en càncers.

Objectius concrets:

1. Conèixer la proteïna VCAM-1 i la seva influència en la metàstasi de càncers.
2. Aprendre els conceptes i tècniques de modelització molecular.
3. Aprendre a dissenyar nous compostos de forma racional, amb estructura base d'indol o quinolina que actuïn com a inhibidors de la proteïna VCAM-1.
4. Aprendre a utilitzar eines de química computacional per a realitzar càlculs teòrics: Symyx Draw (disseny d'estructura 2D de les molècules, amb extensió .mol), Open Babel (canvia el format del disseny a un format previ en 3D, .pdb) i Autodock Tools (canvi del format .pdb al .pdbqt, amb el qual llançarem el docking).
5. Utilitzar els programes Autodock Tools i Ligand Explorer per interpretar els resultats obtinguts. Aprendre a discutir els resultats i a optimitzar-los per iteració.

## 2. Introducció

### 2.1. Càncer

El càncer és una malaltia provocada pel creixement descontrolat d'un grup de cèl·lules. La malaltia es pot dividir en quatre fases: aparició de cèl·lules neoplàsiques, creixement tumoral, invasió del teixit original i migració al torrent sanguini i, finalment, la metàstasi en altres teixits de l'organisme.

El càncer és, en part, desconegut per a nosaltres, però una de les peces clau en el conjunt de malalties que anomenem càncer és la metàstasi. Des de fa dècades, tractem de comprendre com i per què es desenvolupa un tumor en un òrgan o teixit diferent a l'afectat inicialment pel càncer. La resposta no és senzilla.

S'han aconseguit avenços recents en pràcticament tots els tipus de tumor. La supervivència de les persones afectades per aquestes malalties ha augmentat i, en alguns casos, es parla de curació definitiva.

Tot i així, hi ha detalls que se'ns escapen, i per això continuen morint persones que havien vençut les primeres batalles contra el càncer.

Un dels detalls que se'ns escapen és la metàstasi. La investigació que publica l'equip del doctor Massagué a la prestigiosa revista científica *Cell* dona una nova esperança.

El càncer és un creixement descontrolat de cèl·lules que evolucionen formant tumors i, també, destruint teixits adjacents. En alguns casos, les cèl·lules canceroses s'estenen pel cos a través de la limfa o sang colonitzant altres òrgans. Aquest procés és anomenat metàstasi.

Així doncs, el tumor primari s'expandeix mitjançant aquestes cèl·lules canceroses que s'infiltra en òrgans de tot el cos. Tot i que els mecanismes inicials de dispersió d'una cèl·lula tumoral i la seva posterior creixement metastàtic es coneixen, els factors que determinen la supervivència i adaptació d'aquestes cèl·lules cancerígenes disseminades encara estan per determinar.

Una de les conseqüències més devastadores del càncer de pulmó i de mama és la metàstasi cerebral, i es considera que l'origen d'aquesta metàstasi cerebral és, en la majoria dels casos, el propi desenvolupament del càncer de pulmó i de mama. La letalitat d'aquesta metàstasi és deu vegades més gran que la dels altres tumors cerebrals sumats.

No obstant això, el nostre organisme disposa d'una sèrie de mecanismes capaços de frenar o evitar l'entrada directa d'aquestes cèl·lules. La barrera hematoencefàlica (BBB, blood brain

barrier) és una estructura membranosa que serveix, principalment, per protegir l'encèfal de les substàncies químiques presents a la sang. Està formada per cèl·lules endotelials i és extremadament selectiva al pas de determinades substàncies que provenen de la sang. Al costat d'aquesta barrera, i com a suport de les cèl·lules endotelials, trobem els astròcits. No totes les cèl·lules canceroses aconseguen travessar la BBB i, de fet, tant els mecanismes com les molècules implicades en aquest procés són objecte d'estudi, i alguns s'han identificat.<sup>1,2</sup> Les cèl·lules que aconseguen creuar la BBB i infiltrar-se en el cervell presenten una característica comuna: s'adhereixen als capil·lars formant un recobriment del vas; mentre que aquelles que no aconseguen superar-lo tampoc aconseguen evolucionar.

Altres mecanismes de què disposa el nostre organisme per combatre les cèl·lules tumorals es basen en el **sistema immunitari**, com es mostra més endavant a la Figura 1.

De fet, quan apareix una cèl·lula tumoral en el nostre organisme, el nostre sistema la reconeix i la destrueix. Les cèl·lules especialitzades en aquesta tasca són els limfòcits T, que posseeixen en la seva membrana una molècula anomenada PD-1. Les cèl·lules tumorals tenen en la seva membrana una molècula anomenada PD-L1 que actua d'escut per protegir-se de l'atac dels limfòcits T, de manera que aquests interpreten que no les han de destruir, per tant, tenen via lliure per proliferar en el nostre organisme i, posteriorment, quan el tumor inicial creix, produir metàstasi. Per tant, els fàrmacs basats en immunoteràpia es basen en bloquejar el receptor PD-1 dels limfòcits T o el PD-L1 de les cèl·lules tumorals, deixant-les sense capacitat per ocultar-se del sistema immunitari i així els limfòcits poden atacar el tumor inicial. Prova d'això són els recents estudis del doctor Joaquim Bellmunt (Institut Oncològic Dana-Farber, Boston i Escola de Medicina de Harvard) en càncer de bufeta.<sup>3</sup>

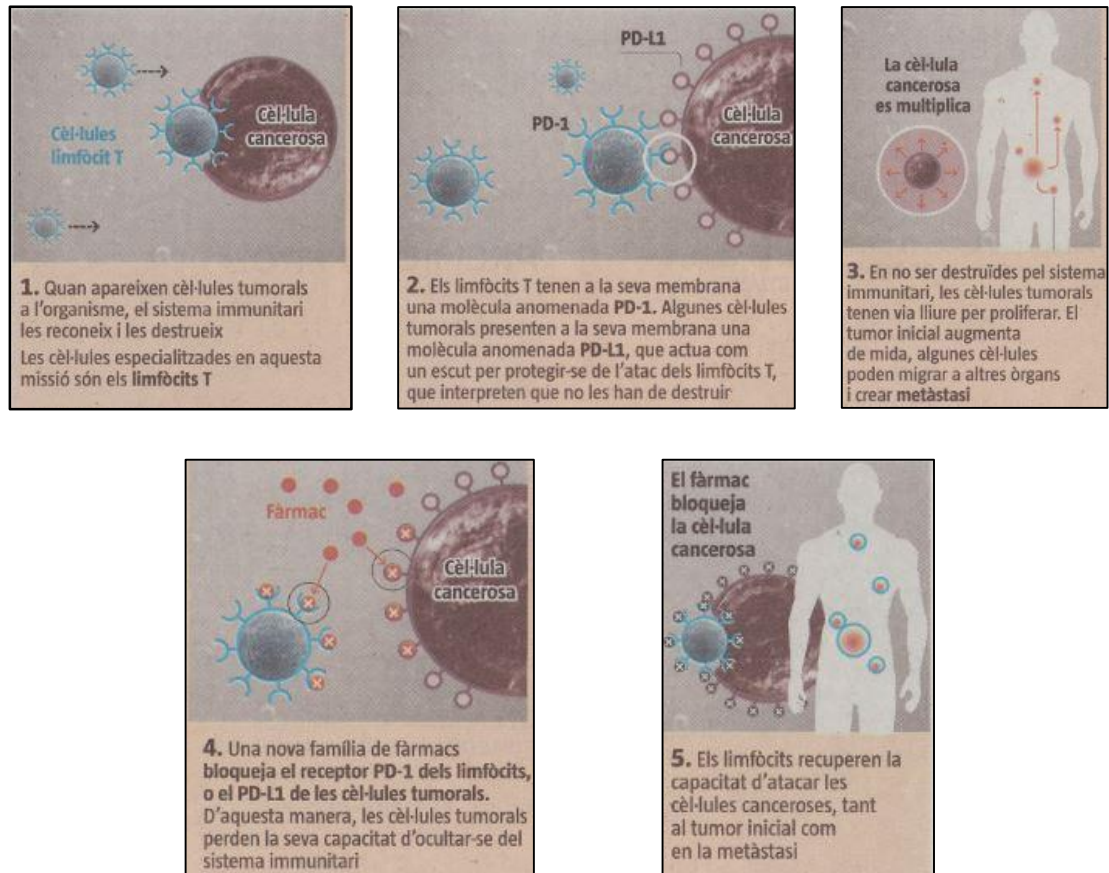


Figura 1: Mecanisme d'inhibició de cèl·lules tumorals basat en el sistema immunitari\*

Què és el que mata les cèl·lules cancerígenes que superen la BBB i què és el que permet a algunes sobreviure i evolucionar sobre el vas sanguini? En què es basen els reconeixements de les proteïnes de membrana de les cèl·lules tumorals i dels limfòcits T?

## 2.2. Els receptors de membrana VCAM-1 i L1CAM

L1CAM i VCAM-1 són dues proteïnes de l'endoteli vascular que s'activen (s'expressen) i faciliten l'adhesió de limfòcits, monòcits, eosinòfils i basòfils (diferents tipus de leucòcits) en aquest epiteli. (Figura 2)

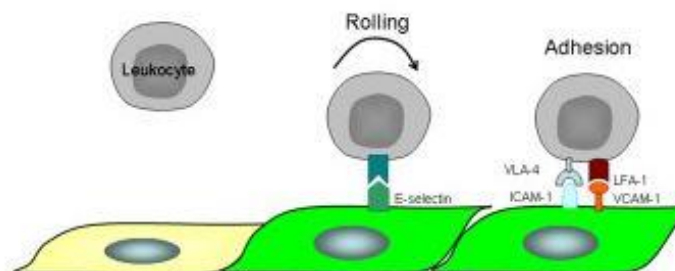


Figura2: mecanisme d'interacció amb LFA-1. VCAM-1 com a receptor a l'endoteli\*

\*Figura 1: Extreta de l'element 12 de la bibliografia

\*Figura 2: Extreta de [ccforum.com/content/16/1/R7/figure/F1](http://ccforum.com/content/16/1/R7/figure/F1)



Com es pot veure a la figura 2, un leucòcit pot interaccionar amb diferents receptors, entre ells veiem VCAM-1 que facilita la seva adhesió a l'epiteli. Algunes cèl·lules de melanoma poden utilitzar VCAM-1 (és a dir, produir-ne una expressió aberrant) per adherir-se a l'endoteli vascular.

Veiem, per tant, que l'estudi de l'estructura de les molècules inibidores de VCAM-1 descrites a la bibliografia esmentada anteriorment és de vital interès per al disseny de la nostra nova proposta d'inhibidor.

Aquesta proposta pot partir de dues estructures heterocícliques d'interès: les quinolines i els indols. En el present treball s'avaluarà virtualment l'activitat dels indols i els seus derivats com a possibles inhibidors de VCAM-1.

Es troba descrit a la bibliografia que un grup de gens anomenats SERPINI1 són els responsables de codificar un inhibidor anomenat PA (plasminogen activator). Aquest inhibidor combat la neuroserpina.<sup>4</sup>

L'article identifica les plasmines com les defenses contra la invasió metastàsica al cervell; les plasmines fan front a la metàstasi cerebral mitjançant dos processos diferents: senyals químics que rebutgen les cèl·lules canceroses i inactivant la molècula L1CAM. Les cèl·lules metastàsiques procedents del càncer de pulmó o de mama mostren alts nivells de serpines anti-PA.

Bloquejant la proteïna L1CAM, estariem bloquejant la metàstasi cerebral, per això farem el disseny virtual d'un inhibidor per a aquesta proteïna.

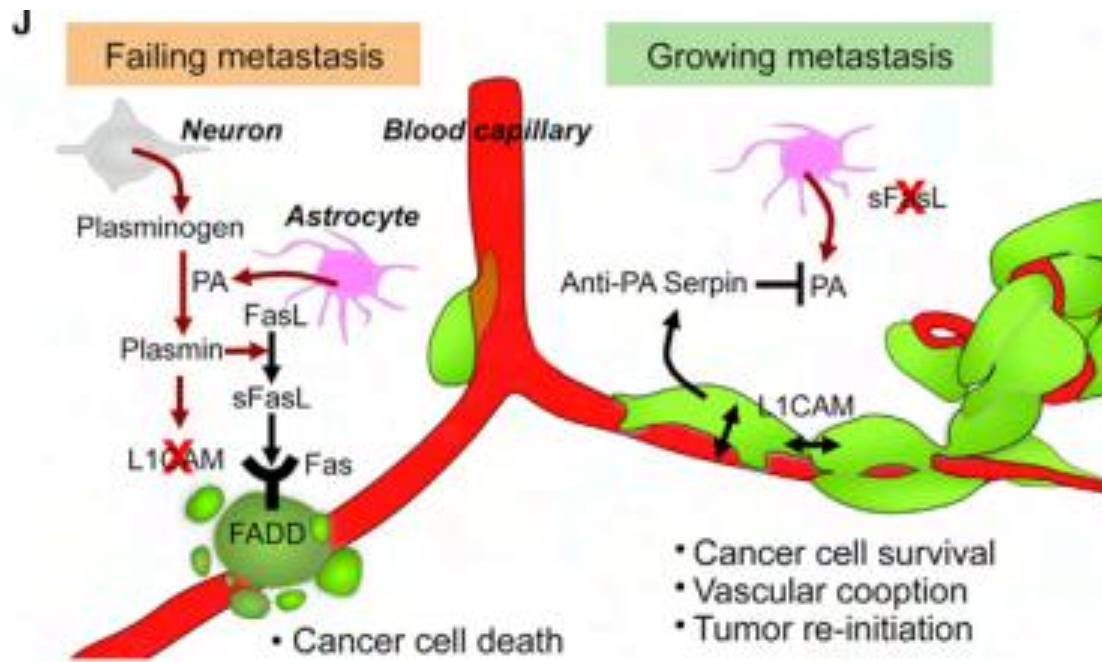


Figura3: Supervivència o supressió de les cèl·lules metastàsiques als capil·lars al cervell\*

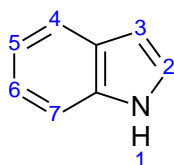
## 2.3. Els inhibidors

### 2.3.1. L'indol

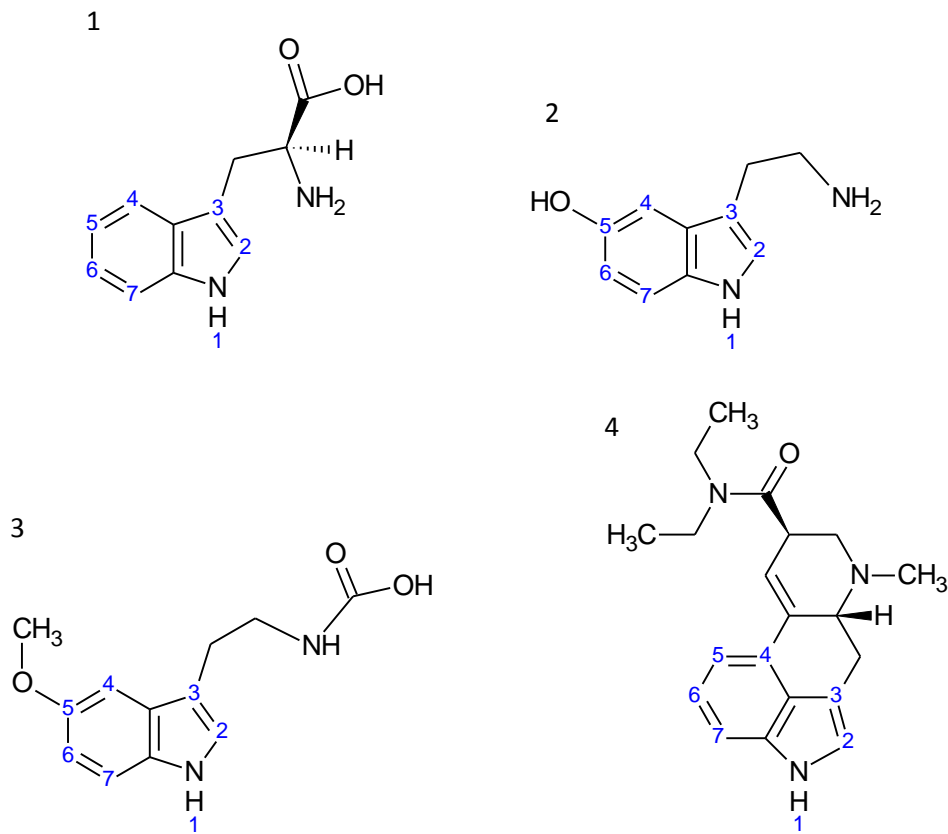
Es troben descrites a la bibliografia multitud d'estructures que poden actuar com a inhibidors de VCAM-1, com alguns flavonoides presents en cítrics.<sup>5</sup> Els cítrics s'han utilitzat en medicina tradicional com a tractament per a multitud de malalties, inclòs el càncer. A l'article esmentat, s'incideix especialment en la metastasi, demostrant com alguns flavonoides del cítric unshiu Marc (FCM) tenen activitat antimetastàsica inhibint l'adhesió de molècules i la posterior invasió de cèl·lules del càncer de mama.

L'empresa farmacèutica Hoffman la Roche descriu en la seva patent de número WO 1999010313 A1 multitud d'estructures derivades de N-aroylphenylalanine que actuen com a inhibidors de la unió entre VCAM-1 i VLA-4 que desencadenaria l'activació de l'endoteli facilitant l'adhesió de cèl·lules de melanoma. <sup>A</sup>

L'indol i els seus derivats més simples són sòlids cristal·lins incoloros. Aquesta estructura es troba a la cadena lateral de l'aminoàcid triptòfan, que el nostre organisme no pot sintetitzar i necessitem ingerir en la dieta. És el producte de la degradació d'aquest aminoàcid, que porta a terme un bacteri. També pot ser sintetitzat en un laboratori.



Indol deriva de la paraula Índia, un tint blau importat d'aquest país i són probablement les estructures heterocícliques que trobem més esteses a la naturalesa formant part de nombrosos compostos d'interès. Per exemple, la serotonina (neurotransmissor molt important del sistema nerviós central) (1), la melatonina (hormona que controla el ritme diürn de moltes funcions fisiològiques) (2), el triptòfan (un aminoàcid essencial i constituent de moltes proteïnes) (3) i la dietilamida de l'àcid lisèrgic (LSD) (4).<sup>6</sup>



Partint de l'indol, en dissenyarem una molècula derivada que és una millor a la VCAM-1. Amb la tècnica del docking, sabrem quines d'aquestes molècules són les que formen una unió més estable, i aquests seran els que inhibiran millor la proteïna, per tant, susceptibles de ser medicaments més efectius contra la metàstasi cerebral.

L'inhibidor (o inhibidors) que dissenyem busquen la millor complementaritat amb la nostra diana de treball "target". No s'han dissenyat tenint en compte la seva facilitat de síntesi sinó la seva capacitat d'inhibició. Sense aquesta restricció d'accessibilitat sintètica es pot realitzar un estudi teòric més exploratiu i, un cop es trobin molècules amb prou capacitat inhib tòria, es poden realitzar modificacions estructurals perquè, sense perdre capacitat d'inhibició siguin més fàcilment sintetitzables. En aquest sentit, la química computacional ha simplificat el procediment de creació de fàrmacs.

Encara no tenim certesa que les molècules que hem creat arribin a sintetitzar mai, hem dissenyat fàrmacs que són susceptibles d'aturar la metàstasi.

### 2.3.2. La quinolina

La quinolina és un compost orgànic aromàtic amb un nucli benzènic condensat amb un altre de piridina. La seva fórmula molecular és: C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N. S'acostuma a fer servir per a la fabricació de colorants i la síntesi orgànica.

Les propietats físiques de la quinolina són les següents:

- Punt d'ebullició: 238 °C
- Punt de fusió: -15 °C
- Densitat: 1,09 (aigua=1 g/cm<sup>3</sup>)
- Solubilitat en aigua: insoluble en aigua freda, soluble en aigua calenta.

Altres maneres de anomenar la quinolina són:

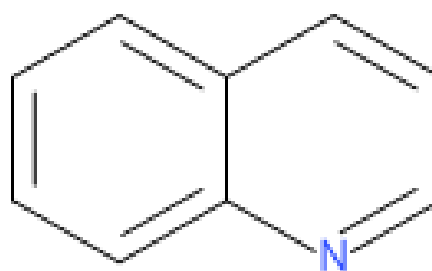
- 1-Bencina
- Benzopiridina

IDENTIFICADORS QUÍMICS DE LA QUINOLINA:

Els podem resumir amb el següent esquema de colors<sup>1</sup>:



1. Groc i blanc: indiquen que és un material que per si sol és normalment estable, fins i tot en condicions d'incendi i que no reaccionen amb l'aigua.
2. Vermell: indica que la quinolina és un material que s'ha d'escalfar moderadament perquè succeeixi la ignició.
3. Blau: indica que és un material que encara que la seva exposició sigui curta, pot causar danys temporals o, fins i tot, permanents.



<sup>1</sup> La imatge i la informació de l'apartat, l'hem tret del següent lloc web:  
<http://www.cosmos.com.mx/wiki/dpd/Quinolina>

### **3. La química computacional en investigació oncoteràpèutica**

La química computacional és una disciplina científica que permet el disseny de fàrmacs (entre moltes investigacions que es poden realitzar computacionalment) amb una activitat definida reduint despeses i temps en les primeres fases del seu disseny. Permet descartar molts compostos en saber que no seran efectius. Mitjançant el docking, podem veure quins són els fàrmacs que s'adheriran millor a la molècula VCAM1, el nostre target o molècula objectiu.

Crearem derivats de l'indol per inhibir (teòricament) la proteïna VCAM-1, procés que faria, com hem vist en l'apartat anterior, aturar el procés de la metastasi. Per saber quines són les molècules creades que inhibiran millor la proteïna VCAM-1, veurem com d'estable és la unió entre les dues molècules. Per cada docking, obtindrem diversos resultats (fins a 9 per docking), corresponents a les diferents conformacions i disposicions que pot adoptar el nostre lligant; encara que utilitzarem la conformació resultant del docking amb l'energia d'unió ( $E_{binding}$ ) més negativa, és a dir, la que formi un complex més estable amb el receptor. Els resultats seran l'energia que desprèn la unió de les dues molècules, en  $-Kcal / mol$ . Com més gran sigui el valor absolut d'aquest número, més estable serà i, per tant, tindrem una millor inhibició.

La interpretació d'un resultat com a favorable o desfavorable en base als càlculs més o menys negatius en  $Kcal / mol$  indiquen, per exemple, que si una molècula polar en una cavitat apolar ens dóna un valor menys negatiu o fins i tot positiu "prefereix" estar fora d'aquesta cavitat que dins, és a dir, interacciona desfavorablement amb la cavitat. Aquests càlculs teòrics hauran de ser contrastats amb els experimentals.

El docking és una tècnica que serveix per calcular la conformació òptima d'una molècula en una cavitat, trobant l'orientació adequada dels enllaços formats entre les dues molècules (un receptor i un lligand). Per a això, es defineix una funció "energia" que depèn de la posició relativa de les molècules, i la posició òptima és la que presenta un mínim en la funció. Un cop coneguda la disposició dels enllaços es pot conèixer la força d'atracció que els uneix. Gràcies a aquesta tècnica podem comparar la força que uneix dues molècules. El receptor és, en general, una proteïna i el lligand una molècula petita. En el nostre cas, el receptor serà la molècula VCAM-1 i el lligand seran els derivats del indol que anirem dissenyant i comparant mitjançant tècniques de docking..

Val a dir que, si en matemàtiques, en buscar els màxims i mínims d'una funció igualem la derivada d'aquesta a 0; podem obtenir diverses solucions, també obtenim diverses solucions en el docking a causa de la complexitat de la funció energia (depèn de multitud de coordenades).

Per això, cada programari de docking utilitza una funció diferent, ja que aquesta està plena d'aproximacions.

Per tant, el nostre èxit no es basa en un resultat concret sinó que serà relatiu als resultats obtinguts al llarg del projecte.

Una bona estratègia per realitzar els càlculs i presentar els resultats, si sempre fem servir el mateix programa i el mateix protocol, és ordenar els valors d'afinitat de les molècules que es vagin assajant.

### **3.1. Procediment seguit al fer un docking**

En aquest apartat es detallarà quin és el procés que hem seguit a l'hora de fer tots els dockings. Els autors d'aquesta informació són Aleix Viñolas Puig, estudiant de Doctorat en Medicaments i Salut de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Navarra i la Dra. Maria Font Arellano, professora titular de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Navarra.

Per començar, el primer que farem, serà buscar a la pàgina web [www.pdb.org](http://www.pdb.org)<sup>2</sup> l'arxiu cristal·logràfic de la VCAM-1. Quan l'hàgim trobat, descarregarem l'arxiu i l'obrirem amb el Word Pad. Seguidament copiarem tot el contingut del fitxer en un nou document que anomenarem: VCAM1\_lig.pdb. Després, en aquest nou arxiu, esborrarem les coordenades dels heteroàtoms que no siguin cations ni aigües enllaçades amb aquests cations propis del lloc actiu. Guardarem l'arxiu amb el nom: VCAM1\_rec.pdb

Seguidament, el que haurem de fer és passar l'arxiu del format .pdb al format .pdbqt, això ho aconseguirem mitjançant l'ús del programa AutoDockTools, els passos presentats de manera esquemàtica seran els següents:

---

<sup>2</sup> Lloc web que recull dades sobre proteïnes i àcids nucleics.

PAS 1

1. Obrir l'arxiu: VCAM1\_rec.pdb (Ligand -> Input -> Open -> VCAM1\_rec.pdb).
2. Edit -> Hydrogens -> Add
3. File -> Save -> VCAM1\_recH.pdb
4. Borrar la pantalla (clic dret sobre la finestra i clicar sobre: "delete").
5. Ligand -> Input -> Open -> VCAM1\_recH.pdb
6. Ligand -> Torsion Tree -> Detect Root
7. Ligand -> Torsion Tree -> Show Root Expansion
8. Ligand -> Output -> Save as -> PDBQT -> VCAM1\_recH.pdbqt
9. Ligand -> Torsion Tree -> Hide Root Expansion

PAS 2

1. Obrir l'arxiu: VCAM1\_rec.pdb (Ligand -> Input -> Open -> VCAM1\_rec.pdb).
2. Edit -> Hydrogens -> Add
3. File -> Save -> Write PDB -> recH.pdb (en guardar-lo, hem de seleccionar les opcions: ATOM i CONECT).
4. Borrar la pantalla (clic dret sobre la finestra i clicar sobre: "delete").
5. File -> Open -> VCAM1\_recH.pdb
6. Grid -> Macromolecule -> Open -> VCAM1\_recH.pdb<sup>3</sup>.
7. Guardar com VCAM1\_recH.pdbqt
8. Grid -> Set Map Types -> Choose Ligand -> VCAM1\_ligH.pdbqt
9. Grid -> Gridbox: - Center -> Center on Ligand
  - Spacing -> 1.000 angstroms
  - Number of points in x-dimension: 20
  - Number of points in y-dimension: 20
  - Number of points in z-dimension: 20
  - File -> Close Saving Current
10. Grid -> Output -> Save GPF -> VCAM1\_gridbox.gpf

---

<sup>3</sup> El programa automàticament s'encarrega d'eliminar els hidrògens no polars i afegir càrregues parcials.



### PAS 3

Un cop hàgim finalitzat tant el Pas 1 com el Pas 2, tractarem de preparar l'arxiu per al Docking que només haurem de fer una vegada i ens servirà per a tots els Dockings que fem, essent sempre imprescindible. Obrirem un bloc de notes amb el nom: DockingVina\_VCAM1\_recH.pdbqt\_quinolina.pdbqt.txt.

A l'arxiu hi haurem de posar el següent:

```
out = DockingVina_VCAM1_recH.pdbqt_quinolina.pdbqt.pdbqt
```

```
log = DockingVina_VCAM1_recH.pdbqt_quinolina.pdbqt.log
```

```
receptor = VCAM1_recH.pdbqt
```

```
ligand = Quinolina.pdbqt
```

```
center_x = 25.509
```

```
center_y = 14.84
```

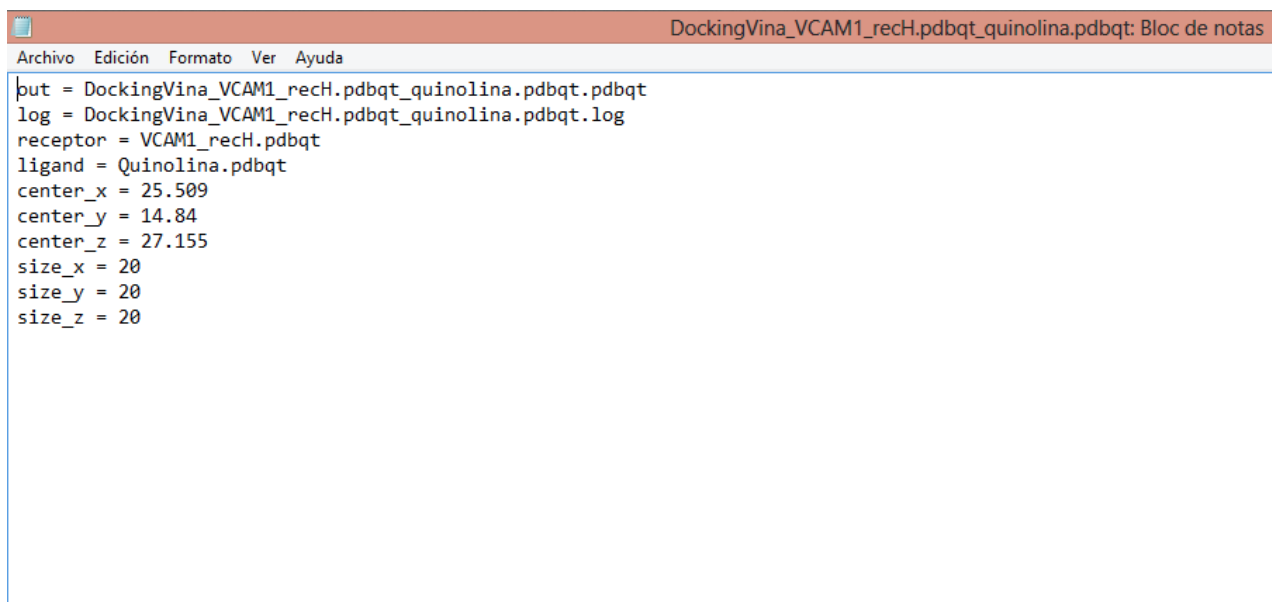
```
center_z = 27.155
```

```
size_x = 20
```

```
size_y = 20
```

```
size_z = 20
```

Quedant un document de text (amb el bloc de notes) com el de la següent imatge:



```
DockingVina_VCAM1_recH.pdbqt_quinolina.pdbqt: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
out = DockingVina_VCAM1_recH.pdbqt_quinolina.pdbqt.pdbqt
log = DockingVina_VCAM1_recH.pdbqt_quinolina.pdbqt.log
receptor = VCAM1_recH.pdbqt
ligand = Quinolina.pdbqt
center_x = 25.509
center_y = 14.84
center_z = 27.155
size_x = 20
size_y = 20
size_z = 20
```

Figura 20

#### PAS 4

Mitjançant el programa cmd, farem un càlcul que ens permetrà calcular l'energia de Gibbs<sup>4</sup>, el valor ha de ser com més negatiu millor ja que això significarà que la unió és més forta i que serà necessària més energia per separar el complex. A nosaltres, ens interessa que la unió sigui el més fort possible perquè la proteïna (VCAM1) no pugui unir-se amb les altres proteïnes de la sang i acabar provocant la metastasi.

Els passos per obrir el programa cmd i fer un càlcul "Windows Scripting Language" han de ser els següents:

1. Windows Inici -> Executar -> cmd
2. Canvi de directori al directori d'arxius, hem d'escriure:  
`cd C:\Documents and Settings\...\tdr` (és a dir, hem d'escriure "cd" i llavors copiar el directori de la carpeta on volem que es creï el Docking).
3. Per executar l'arxiu de configuració del Docking, clicarem sobre "enter" i escriurem el següent:  
`C:\Vina\vina --config (directori de l'arxiu creat amb l' AutoDock Vina)  
DockingVina_VCAM1_recH.pdbqt_quinolina.pdbqt.pdbqt.txt`
4. Clicarem sobre "enter" i el càlcul comença a realitzar-se sol.

Quan s'hagi acabat el càlcul, veurem que tindrem de tres a nou resultats, haurem d'escollir el resultat més negatiu ja que aquest serà amb el qual obtindrem una unió més forta entre la quinolina i la VCAM1.

Ara, només ens falten els passos per aprendre a analitzar els resultats del Docking i com se situa la quinolina al centre actiu de la VCAM1.

---

<sup>4</sup> És l'energia que s'ha de subministrar a la unió de la proteïna i el seu lligand per separar-los.

PAS 5

1. Obrir l' AutoDockTools
2. Analyze -> Dockings -> Open -> AutoDock Vina Results -> DockingVina\_VCAM1\_recH.pdbqt\_quinolina.pdbqt.pdbqt
3. Single Molecule with multiple conformations -> Ok
4. Analyze -> Macromolecule -> Open -> Quinolina.pdbqt
5. Analyze -> Dockings -> Show interactions
  
6. En arribar a aquest punt, s'obriran dues finestres i, a més a més, podrem visualitzar els ponts d'hidrogen. Podem manipular les opcions de les dues finestres que se'ns han obert, per tal d'alterar els factors que ens permetin fer una bona fotografia.
  - Set Background -> Negre (s'observen millor els ponts d'hidrogen).
  - Mouse -> Mantenint clicat el botó esquerre podem desplaçar la molècula i observar-la des de tots els angles.
  - Mouse -> Amb la rodeta del mouse podem fer ZoomIn o ZoomOut
  - Al menú de l'esquerra de la finestra, podem "clicar i desclicar" diferents opcions, com la que ens permet observar l'estructura secundària de la VCAM1 així com les esferes dels àtoms dels aminoàcids prop del lligand.
7. Observem la molècula des de tots els seus angles per intentar identificar algun pont d'hidrogen (s'identifiquen per ser uns punts de color verd amb una petita separació l'un de l'altre).
8. Clicant les fletxes (dreta i esquerra del teclat), podem anar observant tots els resultats<sup>5</sup> que hem obtingut en fer el Docking amb el cmd.

---

<sup>5</sup> Ens referim als resultats obtinguts en fer el "Windows Scripting Language" que hem esmentat que eren de 3 a 9.

PAS 6

Una vegada tinguem l'enfocament que volem per a la fotografia, procedirem a fer-la:

1. 3D Graphics -> Render Large Image -> BROWSE (Seguim la carpeta on volem guardar la imatge) -> Nom<sup>6</sup>.tif
2. A la finestra amb opcions que se'ns obrirà, haurem de posar-hi:
  - Requested Height: S'ajusta al valor anterior.
  - Requested Width: 4800 (keep aspect).
3. Render Image.

Després d'aquest procediment, obtindrem una imatge que ocupa més o menys uns 50 MB i estarà girada.

Para girar-la (1) i disminuir-ne el pes perquè ocupi menys (2)<sup>7</sup>:

1. Obrim el programa Paint:
  - Imatge-> Girar -> Girar verticalment -> Acceptar
  - Arxiu -> Guardar com -> Nom.png
2. Obrim el programa Paint:
  - Imatge -> Expandir o contreure -> Horitzontal 60%/Vertical 60%
  - Arxiu -> Guardar com -> Nom.png

---

<sup>6</sup> En dir Nom, ens referim al nom amb què volem que es guardi la imatge.

<sup>7</sup> Aquest procediment és opcional.

### 3.2. Regles de lipinski

Per assegurar-nos d'una correcta biodisponibilitat oral d'un medicament, aquest ha de complir totes i cadascuna de les cinc regles de Lipinski<sup>8</sup>:

Figura 3



1. -Pes molecular: < 500 Dalton
2. -Nombre de donadors de ponts d'hidrogen: < 5
3. -Nombre d'acceptors de ponts d'hidrogen: < 10
4. -Log P ("coeficient repartiment" [octanol]/ [aigua]): <5
5. -Es consideren excepcions els substrats de transportadors de membrana i els productes naturals.

Per dissenyar els nostres compostos, haurem de seguir un determinat ordre ja que, en cas contrari, la tasca se'ns farà extremadament laboriosa i pesada. Seguirem el següent ordre:

1. Buscarem posicions moleculars de ramificació de la quinolina.
2. Aquí serà on posarem els substituents següents:
  - Poc i molt voluminosos (-H, -CH<sub>3</sub>, -Ph, -Naft).
  - Acceptors de ponts d'hidrogen -NO<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>).
  - Donadors de ponts d'hidrogen (-NH<sub>2</sub>, -OH, -SH).
  - Electroatractius (-CF<sub>3</sub>, -F, -Cl, -Br, -I).
3. Provarem compost mitjançant l' AutoDockTools situant-lo a la diana (VCAM-1).
4. Posteriorment prepararem una taula com la que tenim a continuació que ens facilitarà l'anàlisi de les nostres modificacions de quinolina, per poder escollir el millor compost:

Compost	Energia d'unió (kcal/mol)	Núm. de ponts d'hidrogen
Quinolina_1	-5,5	1

5. Un cop analitzada una posició, escollirem les dues modificacions que millor resultat donen i repetirem el procés en una altra posició de la molècula.

6. Al final, seleccionarem els tres millors candidats per a fer un fàrmac.

Aquest serà el procediment que seguirem meticulosament al llarg de tot el treball, per aconseguir assolir el nostre objectiu final, fer un fàrmac per inhibir la VCAM-1.

<sup>8</sup> Christopher A. Lipinsky va formular les cinc regles l'any 1997, basant-se en la observació de què els compostos químics utilitzats en medicaments són molècules petites i lipofíliques. .

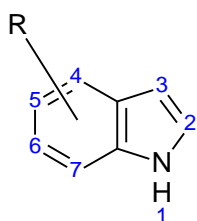
## 4. Resultats i discussió

### 4.1. INDOL

#### 4.1.1. Substitució d'hidrògens

En el lloc de cada un dels hidrògens, col·locarem un dels radicals següents: -OH, -F, -NH<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>. D'aquesta manera, veurem quins dels radicals que utilitzarem funcionen millor, i quines posicions són les més favorables. Malgrat aquestes consideracions, el resultat és orientatiu, ja que més endavant crearem molècules més grans i la distribució de la càrrega serà diferent.

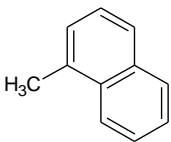
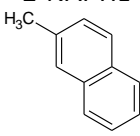
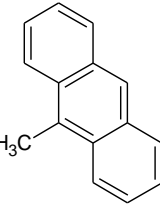
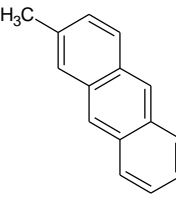
Farem el mateix amb els grups antracè i carbonil.



1

L'energia d'unió entre l'indol (sense modificacions) i la molècula VCAM-1 és de -4,7Kcal / mol

TAULA 1: valors d'afinitat en kcal / mol. Cada valor indica el resultat energèticament més favorable, molècula més estable obtinguda a cada docking per la unió del substituïnt en cada heterocicle.

R	H	Energia unió	R	H	Energia unió	R	H	Energia unió
-OH	1	-5,3	-NH2	1	-5,3	-F	1	-4,8
	2	-5,3		2	-5,0		2	-5,0
	3	-5,2		3	-5,2		3	-4,9
	4	-4,9		4	-4,9		4	-4,8
	5	-5,2		5	-5,3		5	-5,0
	6	-5,0		6	-5,0		6	-5,0
	7	-4,8		7	-5,1		7	-4,9
R	H	Energia unió	R	H	Energia unió	R	H	Energia unió
-CH3	1	-4,6	-CO	1	-5,3	1-NAFTIL 	1	-5,9
	2	-4,9		2	-5,3		2	-6,5
	3	-4,9		3	-5,3		3	-6,2
	4	-4,8		4	-5,4		4	-6,1
	5	-4,7		5	-5,2		5	-6,2
	6	-4,9		6	-5,4		6	-6,5
	7	-5,0		7	-5,4		7	-6,1
	H	Energia unió	R	H	Energia unió	R	H	Energia unió
2-NAFTIL 	1	-6,6	9-ANTRANIL 	1	-6,2	2-ANTRANIL 	1	-7,0
	2	-6,5		2	-7,1		2	-6,7
	3	-6,8		3	-7,1		3	-6,6
	4	-6,8		4	-6,3		4	-6,8
	5	-6,6		5	-6,8		5	-6,7
	6	-6,5		6	-6,7		6	-6,7
	7	-6,6		7	-6,7		7	-6,5

Qualsevol posició de l'indol substituïda per un grup discret dóna com a resultat valors baixos, que oscil·len entre -4,6 i -5,3; per tant, seria possible augmentar aquests valors, en teoria, augmentant el volum de l'estructura proposada és a dir: unint-la a grups més grans. Com es pot veure a la taula anterior, les substitucions amb 9 i 2-antranil donen com a resultat energies d'unió lleugerament superiors (al voltant de -7kcal) respecte a 1 i 2-naftil. Per tant, les noves estructures proposades hauran de tenir en compte aquest grup més voluminós. Addicionalment, la possibilitat que aquests substituents continguin grups polars (àtoms d'electronegativitat elevada com O, N, F) porta a pensar que la formació d'enllaços per pont d'hidrogen i altres

Nota: A totes les taules on expressem radicals indiquem el punt d'unió amb un metil, per criteris de simplicitat.

interaccions intermoleculares serien possibles entre VCAM -1 i l'inhibidor proposat augmentant l'afinitat entre les dues molècules.

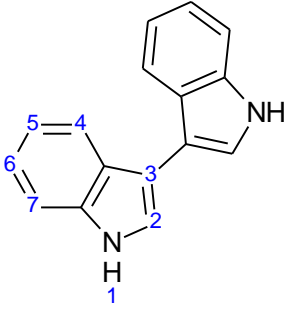
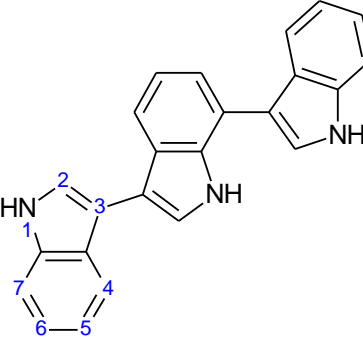
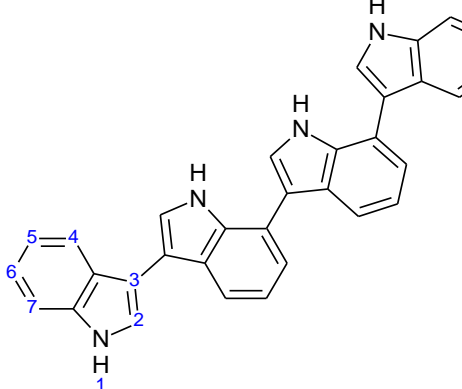
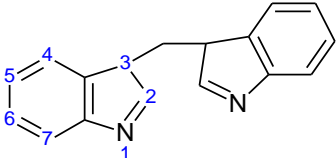
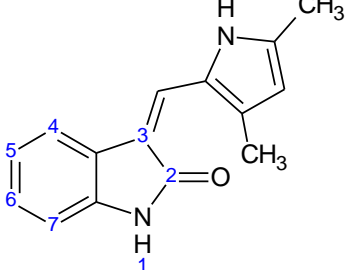
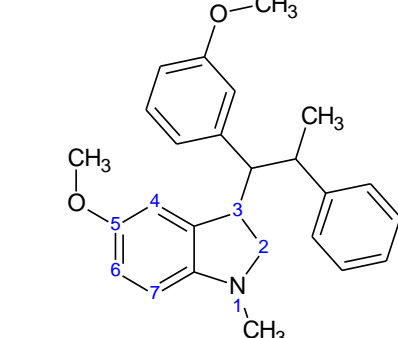
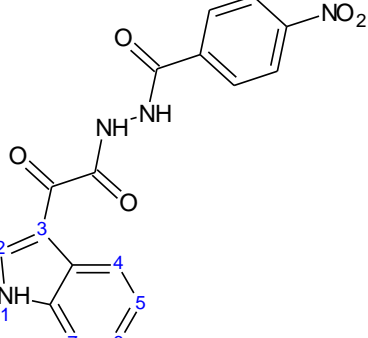
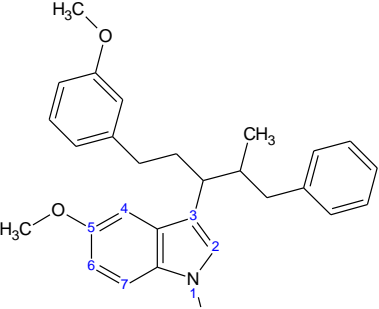
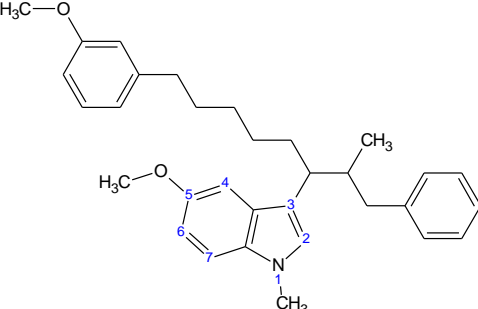
#### 4.1.2. Disseny de molècules inhibidores

A l'apartat anterior, hem vist com la substitució en qualsevol posició de l'indol amb grups 2- o 9-antranil dona bons resultats des del punt de vista d'afinitat amb l'inhibidor. Si fos possible trobar una posició de l'indol més afavorida, en aquest sentit es podria obtenir un inhibidor més actiu. Es troben descrits a la bibliografia indols amb substituents en posició 3 que han demostrat ser compostos biològicament interessants i que posseeixen una variada activitat biològica.<sup>4,5</sup> Els derivats d'indol s'utilitzen com a esquelet base d'un gran nombre de inhibidores d'enzims com la proteïn-cinasa i altres inhibidors antibacterians i antivirals.<sup>6</sup> En la referència 6 es descriu l'activitat d'una tirosina-cinasa en un gran nombre de tumors epitelials, com el d'ovari, còlon, pulmó, mama, pròstata i pàncrees. Actua com a modulador de la invasió de les cèl·lules cancerígenes i de les metàstasis reduint la seva adhesió i facilitant la seva mobilitat, per tant, el disseny d'un inhibidor en aquest camp és de gran interès. Per això, utilitzant aquest esquelet d'indol 3-substituït o dels seus derivats de demostrada activitat inhibidora de l'activitat invasiva del càncer podria donar resultat en el cas de la VCAM-1.

A la taula següent es resumeixen els resultats obtinguts amb substituents de voluminositat creixent en posició 3.

TAULA 2: valors d'afinitat en Kcal/mol. En indols 3-substituïts.



		
<p><b>2</b> Af=-6,5kcal/mol</p>	<p><b>3</b> Af=-6,4kcal/mol</p>	<p><b>4</b> Af=-6,4kcal/mol</p>
		
<p><b>5</b> Af=-6,1kcal/mol</p>	<p><b>6</b> Af=-6,3kcal/mol</p>	<p><b>7</b> Af=-6,7kcal/mol</p>
		
<p><b>8</b> Af=-6,1kcal/mol</p>	<p><b>9</b> Af=-5,9kcal/mol</p>	<p><b>10</b> Af=-5,2kcal/mol</p>

S'observa un increment de l'estabilitat en les molècules 2, 3 i 4 pel fet d'augmentar el volum del substituent i fer-ho en posició 3. Les estructures 5 i 6 incorporen un grup CH<sub>2</sub> entre indols traduint-se en una disminució de l'estabilitat de la unió amb VCAM-1. Per tant, cal buscar heterocicles fusionats o bé unions directes entre ells.

També es continuaran estudiant estructures indòliques amb substitució en posició 3, ja que es troben descrits en alguns treballs aquests derivats que actuen modulant l'activitat d'un grup de tirosina-cinases. Aquests enzims que intervenen en el control d'un gran espectre de funcions biològiques (creixements cel·lulars, divisió, invasió, adhesió) s'han observat en un nombre de tumors epitelials com el d'ovari, còlon, pulmó i mama. Per tant, aquestes tirosina-cinases actuen

com a moduladors de la invasió cel·lular que provoca el càncer i les seves metàstasis, reduint l'adhesió i facilitant-ne la seva mobilitat. L'estructura 6, de demostrada activitat davant d'aquests enzims, s'ha avaluat a nivell clínic en l'estudi del càncer ovàric. Per aquest motiu s'ha decidit incloure-la en l'estudi.<sup>10</sup>

La molècula 7 va mostrar activitat moderada davant les cinases, per aquest motiu es va decidir estudiar si la seva activitat podia ser diferent amb VCAM-1, ja que, igual que 6 era també una estructura sintetitzada en el mateix article. Els resultats indiquen una major estabilitat en la unió amb VCAM-1 que 6.<sup>10</sup>

Essent coherents amb aquests raonaments, es van buscar més estructures que mostressin activitat davant proteïn-cinases. Els grups carbonil, veïns de l'anell indòlic actuen com acceptors de ponts d'hidrogen quan s'orienten cap als residus d'aminoàcids. L'anell benzènic pot establir interaccions hidrofòbiques també amb residus hidrofòbics d'aminoàcids. A l'article citat en aquest paràgraf es realitzen dockings i expressen la necessitat de realitzar sobre aquesta estructura estudis més detallats. És per aquest motiu que s'ha decidit fer el docking entre 6 i VCAM-1.<sup>11</sup>

Per completar l'estudi dels indols 3-substituïts, s'han realitzat els dockings de les estructures 9 i 10, que parteixen de 7 incrementant la longitud de la cadena hidrocarbonada, els resultats indiquen que a major longitud, menor estabilitat de la unió amb VCAM-1 i confirmen la nostra suposició prèvia de treballar amb molècules amb anells fusionats i poques unitats CH<sub>2</sub> entre grups.

Addicionalment, s'han fet càlculs realitzant substitucions en altres posicions.

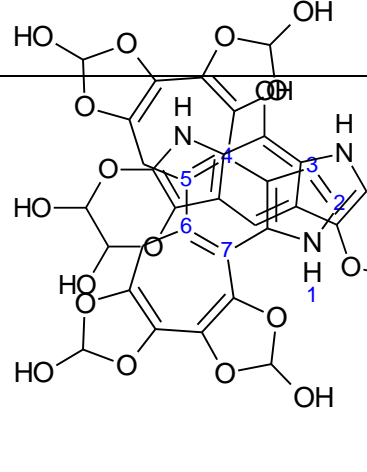
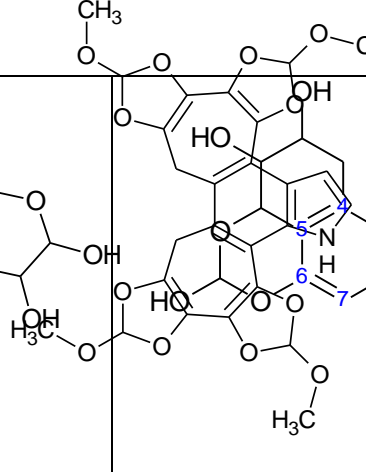
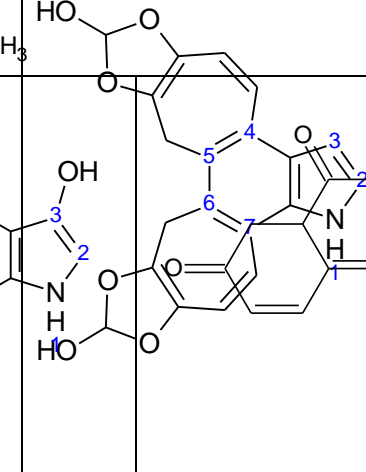
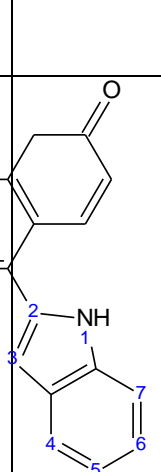
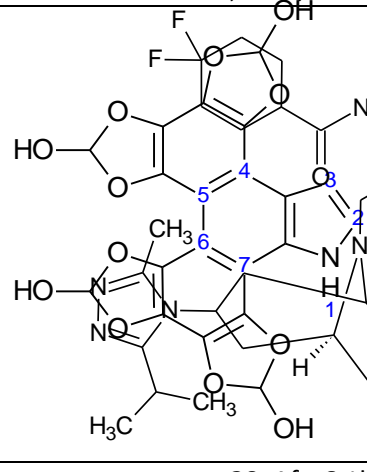
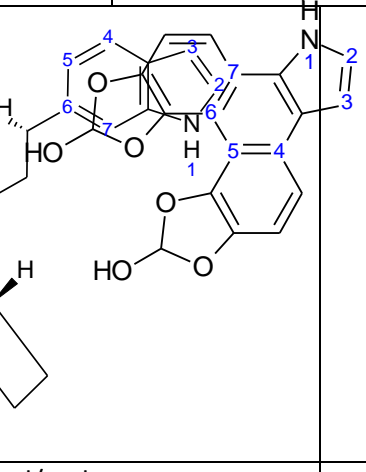
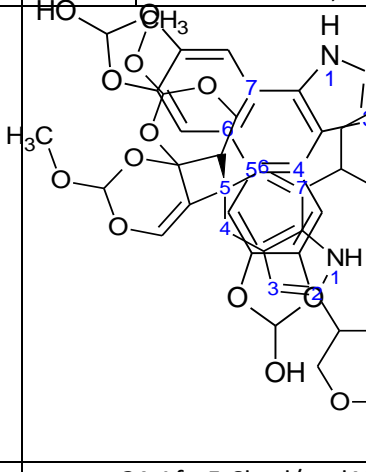
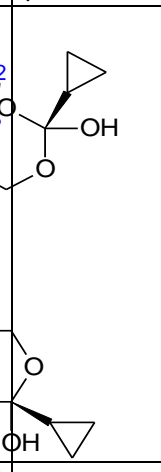
L'anàlisi de les dades en la taula 3 indica que la millora és notable en 13, ja que hem obtingut el millor resultat fins al moment. Es constata que el canvi d'un anell de 6 a 7 membres (en les estructures 11 i 14) produeix variacions mínimes. En canvi, en 13 l'increment és notable superant fins i tot els indols 3 substituïts. Per tant, serà interessant l'estudi de nous indols amb variacions en aquestes posicions i volum semblant.

*TAULA 3: valors d'afinitat en Kcal/mol. En indols substituïts en posició 4, 5, 6, 7.*

En un intent ràpid de veure quines estructures ens resulten més favorables des del punt de vista energètic, es van realitzar els dockings dels productes resumits en la taula 4. Seguint amb el nostre raonament de treballar amb estructures amb anells fusionats, es van realitzar els Dockings 17 i 18.

Els grups voluminosos units a indols que ja havien demostrat possibilitats (molècula 19) amb un grup, amb tres ciclohexans fusionats i grups carbonils per potenciar la formació d'enllaços per pont d'hidrogen.

TAULA 4: valors d'afinitat en Kcal/mol en estructures anàlogues a productes descrits a la

			
<b>11 Af=-5,4kcal/mol</b> <b>17 Af=-6,0kcal/mol</b>	<b>12 Af=-6,9kcal/mol</b> <b>18 Af=-7,0kcal/mol</b>	<b>13 Af=-7,2kcal/mol</b>	<b>19 Af=-6,8kcal/mol</b>
			
<b>14 Af=-6,0kcal/mol</b> <b>20 Af=-6,1kcal/mol</b>	<b>15 Af=-5,3kcal/mol</b>	<b>16 Af=-5,3kcal/mol</b>	<b>21 Af=-5,6kcal/mol</b> <b>19</b>

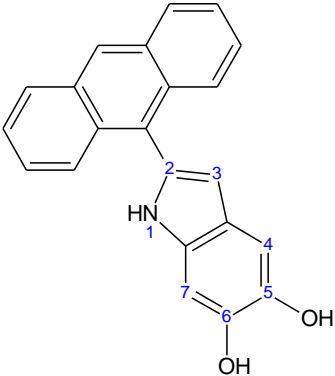
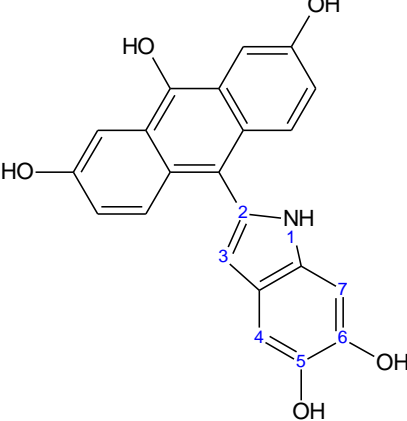
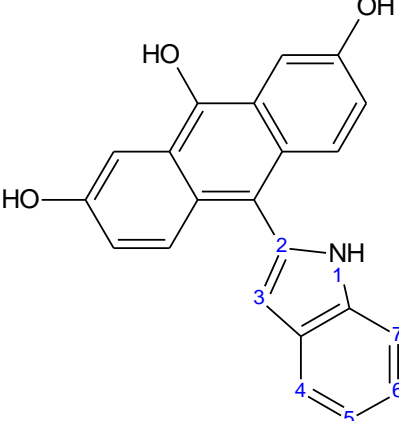
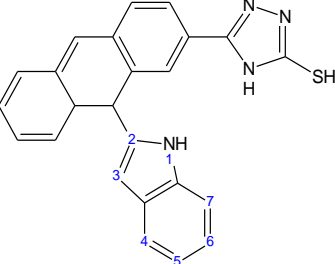
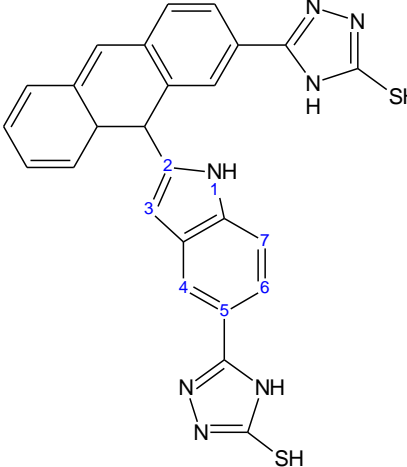
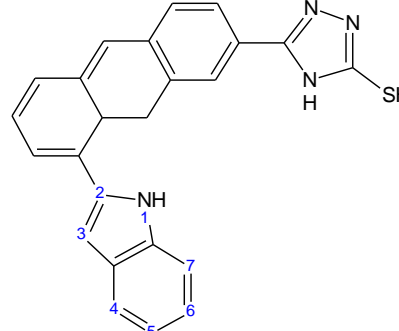
*bibliografia farmacològicament actius i estructures suggerides.*

La molècula 20 és una proposta basada en l'estructura de pembrolizumab (substituint el grup fenil de l'extrem per un indol. És notable la bibliografia que descriu pembrolizumab com un fàrmac diana a sintetitzar ja que es troba relacionat en processos d'inhibició en melanoma i altres tipus de càncer. Recentment, la FDA (Food and Drug Administration) ha aprovat pembrolizumab, sota el nom de Keytruda, com a teràpia en el tractament del melanoma.<sup>12</sup>

Finalment, a la 21, se sintetitza en una sola estructura els grups funcionals i cicles lliures i fusionats que ens han donat millors resultats per veure si mostraven un efecte sinèrgic en el conjunt.

La unió de l'indol amb grups aromàtics ha donat resultats positius i, per tant, s'ha decidit desenvolupar algunes d'aquestes molècules per tractar d'obtenir millors resultats:

TAULA 5: valors d'afinitat, en Kcal/mol, per a derivats indòlics substituïts en posició 2.

		
<p><b>22</b> Af=-6,5kcal/mol</p>	<p><b>23</b> Af=-6,0kcal/mol</p>	<p><b>24</b> Af=-6,5kcal/mol</p>
		
<p><b>25</b> Af=-7,3kcal/mol</p>	<p><b>26</b> Af=-6,3kcal/mol</p>	<p><b>27</b> Af=-6,5kcal/mol</p>

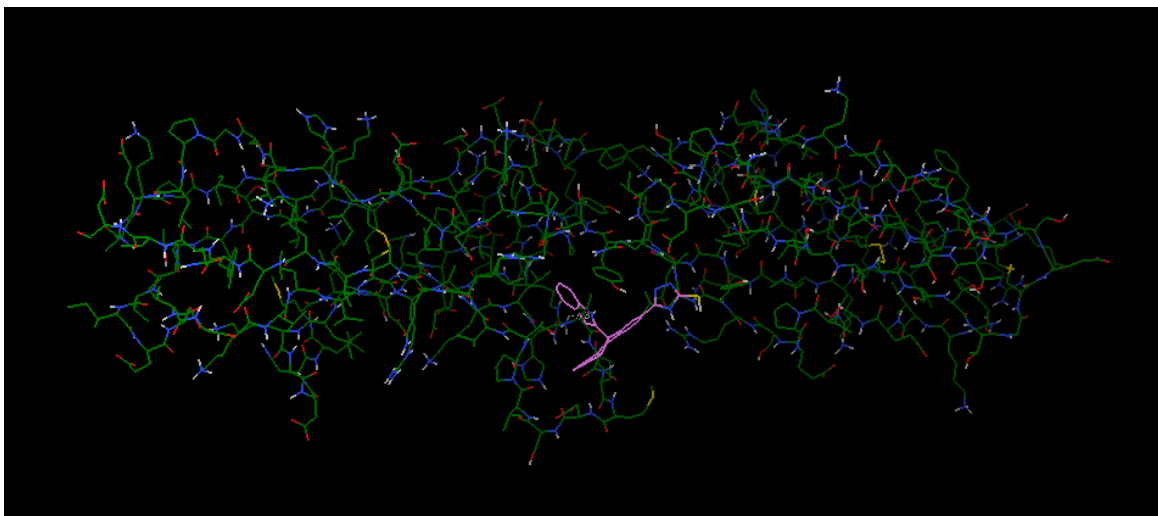
He col·locat grups OH en un costat de la molècula, en ambdós costats i, finalment, a l'altra banda; a partir dels resultats deduïm que és més favorable afegir radicals en un sol costat.

Hem notat un petit increment de l'estabilitat de la nostra unió fa a les molècules 14-16 en convertir els enllaços senzills del grup OH en enllaços dobles; no obstant, la millora més notable té lloc en afegir un grup 3-mercapto-1,2,4-triazole en un dels extrems, com suggereix alguna publicació en la qual es descriuen índoles biològicament actius.<sup>13</sup>

Com a comentari, és interessant fer referència als càlculs realitzats amb pèptids units als nostres anells d'indol. Tot i trobar-se descrits en la bibliografia exemples de lligands amb aquesta estructura i interaccions favorables, en el nostre cas no va ser així pel que es va desestimar aquesta línia d'estudi.<sup>14</sup>

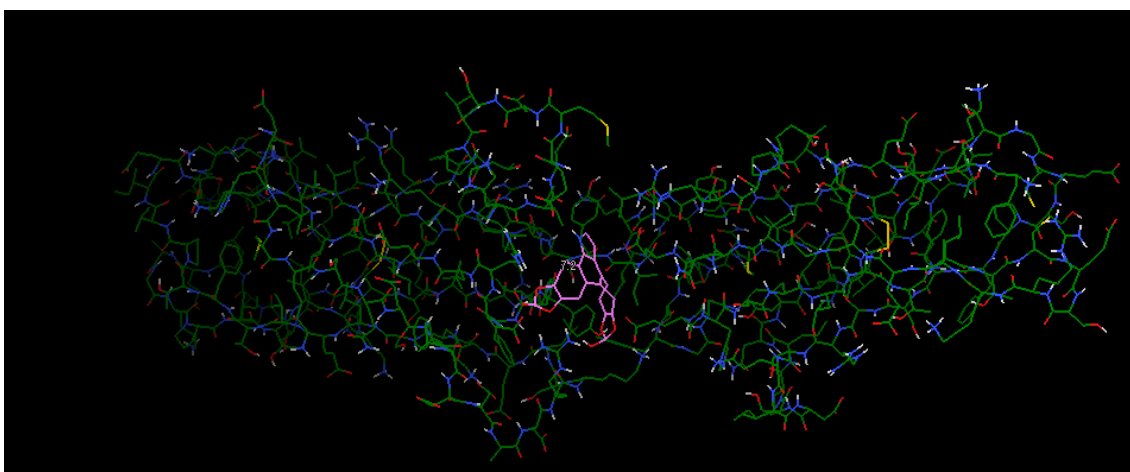
### 4.1.3. Imatges dels dockings

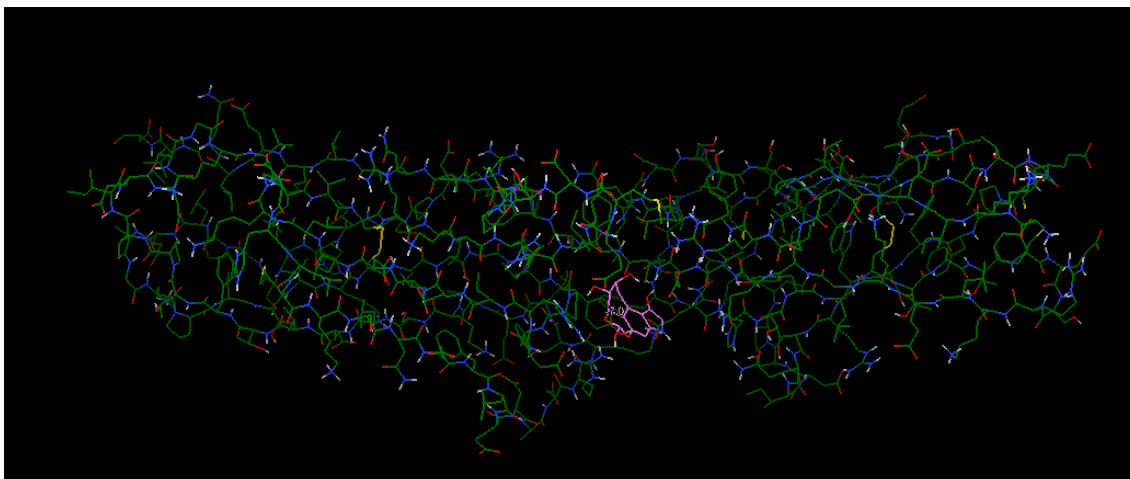
A continuació, mostrarem imatges dels Dockings més rellevants, és a dir, les unions amb els derivats indòlics que han donat millors resultats.



La imatge és una captura de pantalla del programa Autodock tools, amb el qual hem realitzat i visualitzat el docking. Es pot veure VCAM-1, l'estructura més gran, i el lligand 25, que és l'estructura petita de color rosa. S'ha col·locat de perfil perquè és la conformació més estable que pot adoptar respecte a VCAM-1, però la podem reconèixer (a part de pelseu color rosa) per la seva grup 3-mercapto-1,2,4-triazol.

Altres dockings rellevants son els que hem realitzat amb els lligands 13 i 18:

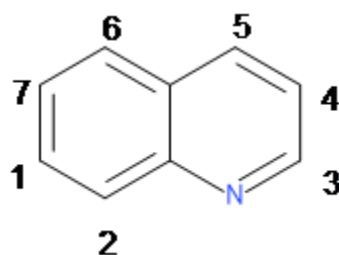




## 4.2. QUINOLINA

Per analitzar els resultats dels Dockings, realitzarem la quadrícula que ja havíem presentat en l'apartat que porta per títol: "Disseny de medicaments". En gris, apareixen marcades les molècules amb una energia d'unió (o de Gibbs) més alta en cadascun dels hidrògens. Primer, haurem de numerar cadascun dels set hidrògens de la molècula, un cop haguem fet això, procedirem a substituir-los per un grup alcohol, un grup amino, un fluor i un metil. A continuació, presentem una imatge on s'observa clarament com hem numerat els hidrògens de la nostra molècula:

Figura 4



Els resultats han estat els següents:

Taula : Energia d'unió (Kcal/mol) de la quinolina_1 (Figura 4) al substituir l'Hidrogen.							
Substituent	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Hidroxil (-OH)	-5,4	-5,2	-5,4	-5,4	<b>-5,5</b>	-5,4	-5,4
Amina (-NH <sub>2</sub> )	-5,4	-5,2	-5,4	-5,3	<b>-5,5</b>	<b>-5,5</b>	-5,4
Fluoro (-F)	-5,4	-5,0	-5,1	-5,0	-5,1	-5,0	-5,1
Metilo (-CH <sub>3</sub> )	-5,1	-5,0	-4,9	-5,0	-5,2	-5,2	-5,0
*Els millors resultats del Docking es mostren en negreta sobre un fons gris.							

Podem observar que els resultats amb una energia més negativa són l'alcohol i l'amina de l'hidrogen 5, i després també tenim l'amina en l'hidrogen 6. Aquests dos hidrògens són per on hem d'anar fent créixer la molècula, ja que serà per aquí d'on obtindrem un fàrmac virtualment útil contra la VCAM-1.

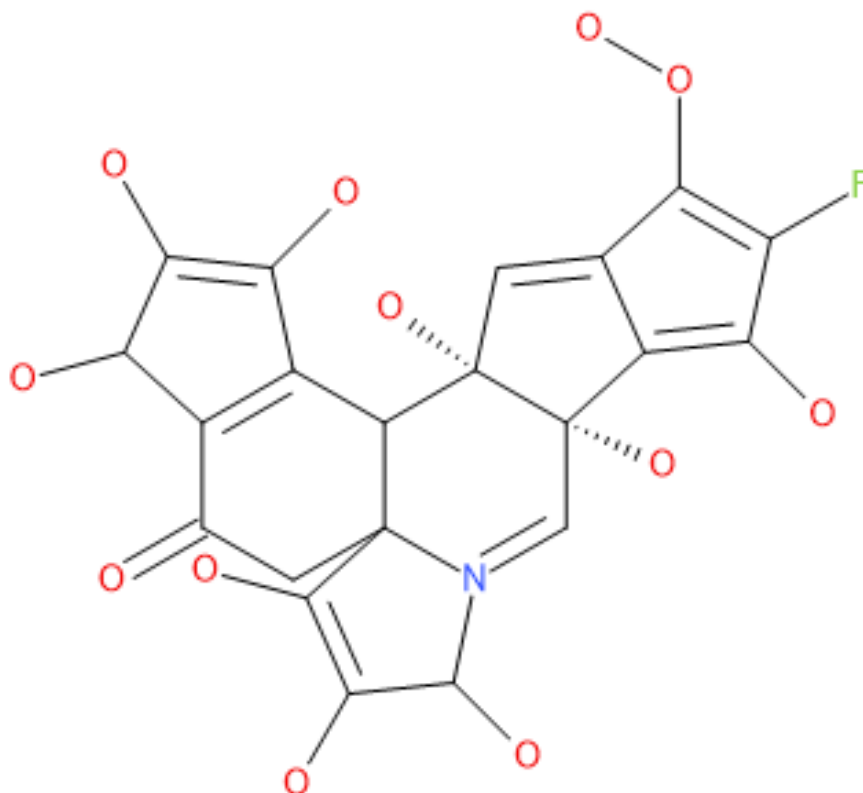
Per continuar, el que hem fet ha estat començar a modificar la molècula, afegint altres grups mitjançant el programa Symyx Draw. Hem anat provant una mica a l'atzar, fins a obtenir els valors que apareixen a la següent quadrícula i que corresponen als millors resultats:

<u>Nom</u>	<u>Energia d'unió (kcal/mol)</u>	<u>Nombre de ponts d'hidrogen</u>
Molècula_1	-7,9	1
Molècula_2	-7,8	1
Molècula_3	<b>-8,1</b>	0
Molècula_4	-7,9	0



La molècula número 3 és la que ens ha sortit amb una energia de Gibbs més negativa<sup>9</sup>, per tant, el que farem ara és anar-la variant per intentar trobar una molècula encara millor.

Les imatges que es presenten tot seguit, ens mostren com és el disseny de la molècula\_3, la més negativa fins al moment que té una energia d'unió de -8,1kcal/mol:



---

<sup>9</sup> A mida que aquesta energia sigui menor, més estable serà la molècula.

Figura 5

Però, aquesta estructura **no la podem considerar com un bon fàrmac**, encara que sí com a un bon inhibidor, ja que la molècula no compleix les regles de Lipinski: té moltíssims grups hidroxil, un grup peròxid que és molt reactiu i es degradaria només arribar a l'estómac i no serviria per unir-se a la VCAM-1 i, finalment, el compost no té aromaticitat, no compleix la regla de conjugació dels compostos cíclics aromàtics de  $4n + 2$  electrons deslocalitzats (Llei de Hückel<sup>10</sup>). Per tant, rebutgem el compost ja que podem aconseguir millors resultats amb una estructura més estable i menys hidrofòbica per dins i polar i hidrofílica per fora.

Hem intentat dissenyar diferents molècules que tinguessin la màxima energia d'unió a més de complir les cinc regles de Lipinski. Amb els resultats obtinguts, podem elaborar la següent quadrícula:

<u>Nom</u>	<u>Energia d'unió (kcal/mol)</u>	<u>Nombre de ponts d'hidrogen</u>
Molècula_5	-5,6	1
Molècula_6	-6,4	0
Molècula_7	-7,2	0
Molècula_8	-5,3	1
Molècula_9	-7,4	1
Molècula_10	-7,5	1
Molècula_11	-7,5	0
Molècula_12	-7,5	0
Molècula_13	-6,5	0
Molècula_14	-7,7	0

<sup>10</sup> Llei que indica que una molècula és aromàtica si té  $4n+2$  electrons  $\pi$  i antiaromàtica si té  $4n$  electrons  $\pi$ .

Molècula_15	-7,0	1
Molècula_16	-7,4	0
Molècula_17	-7,0	0

Observem que la molècula\_14 és la que té una energia d'unió més negativa; a més a més, té un pes molecular inferior a 500 Dalton, té menys de 5 donadors de ponts d'hidrogen i menys de 10 acceptors. De la mateixa manera, el seu resultat del log P és inferior a 5. Per tant, afirmem que compleix les cinc regles de Lipinski. Així mateix també podem afirmar que és una molècula hidrofílica, que pot transportar-se perfectament per mitjans aquosos com la sang.

La seva estructura és la següent:

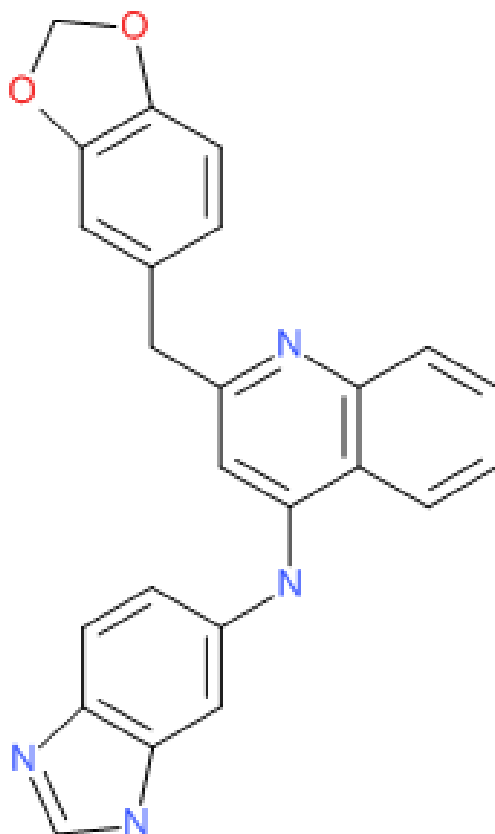


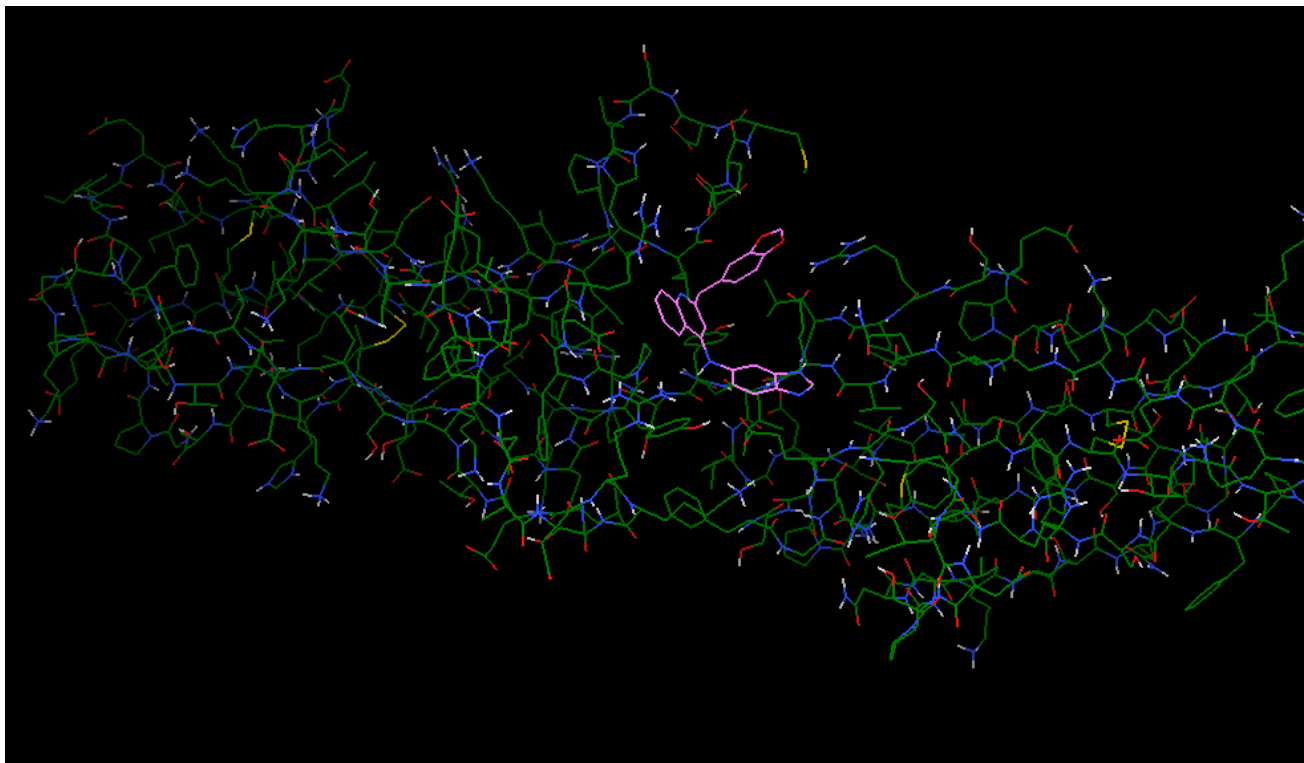
Figura 6

Veiem com, en el centre de l'estructura, encara mantenim la quinolina i per determinar per on havíem de fer créixer la molècula, hem fet un docking afegint una ramificació a cadascun dels hidrògens. Els que ens han sortit amb una energia de Gibbs més negativa són l'hidrogen 3 i l'hidrogen 5. Per tant, ramifiquem la molècula per aquests dos costats.

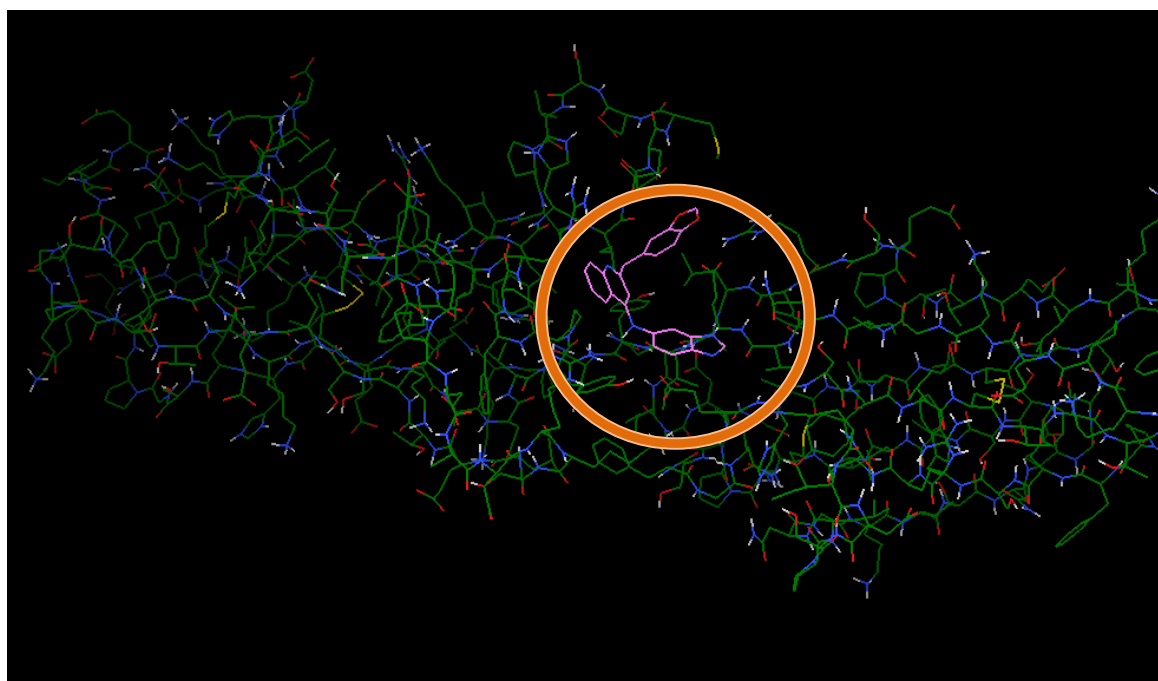
A continuació, presentarem 3 captures de pantalla del programa AutoDockTools de la molècula\_14 que ens permetran fer-nos una idea de com és el seu comportament i de com s'ajusta amb la VCAM-1 (el centre actiu), mostrant també quins són els aminoàcids amb els quals s'uneix el fàrmac.

En aquesta primera imatge, apreciem clarament quin és el centre actiu de la VCAM-1<sup>11</sup>, on s'ajusta la nostra molècula\_14 i que inhibeix les seves propietats per a produir metàstasi.

Figura 7



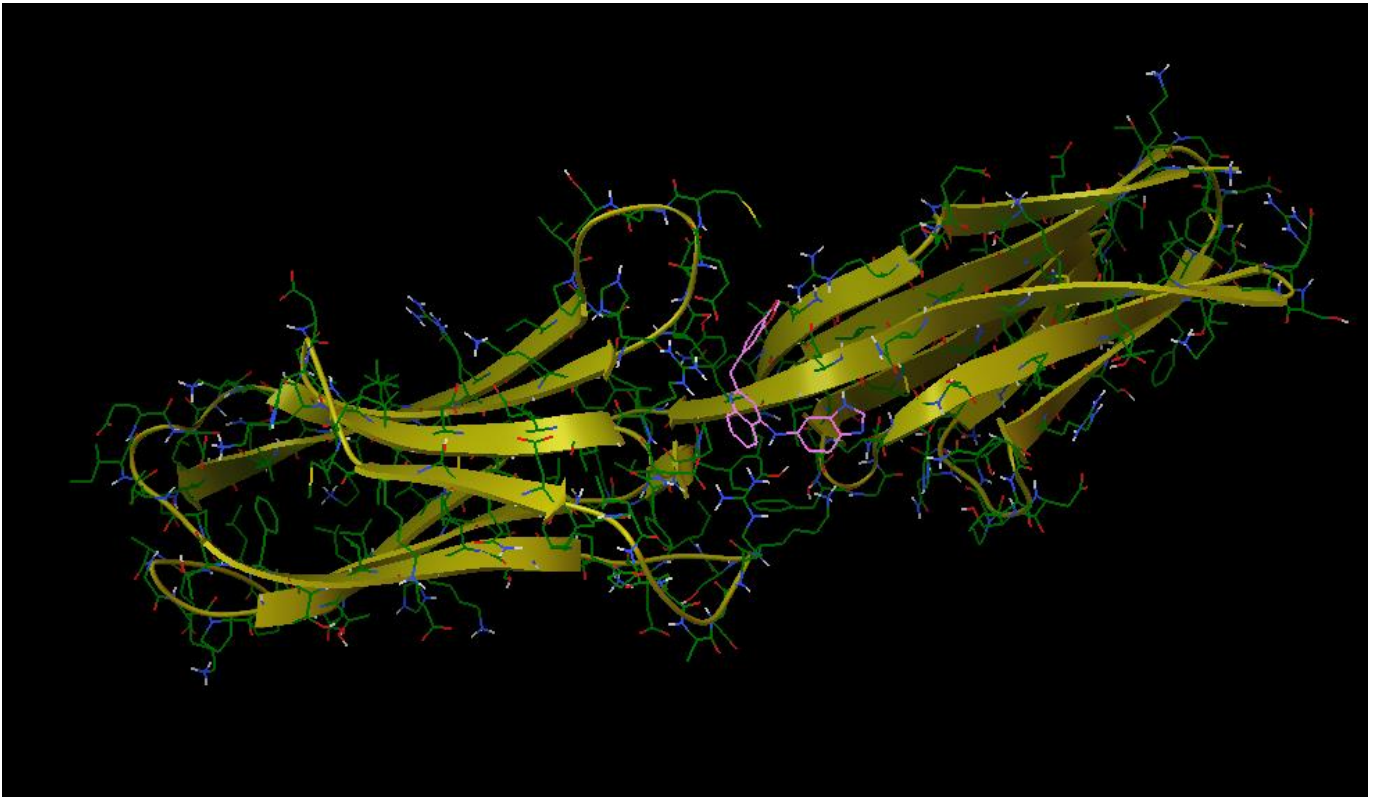
Observem que el centre actiu de la VCAM-1 està situat al centre de la molècula (zona assenyalada pel cercle taronja). També podem veure que l'energia d'unió de la molècula amb la proteïna és  $-7,7$  kcal / mol.



<sup>11</sup> La VCAM-1 està representada en verd, mentre que la nostra molècula\_3 (la quinolina variada), està representada amb un color rosat.

A la segona captura de pantalla, podem observar-hi també el centre actiu de la VCAM-1 amb la seva estructura secundària (de color groc):

Figura 8

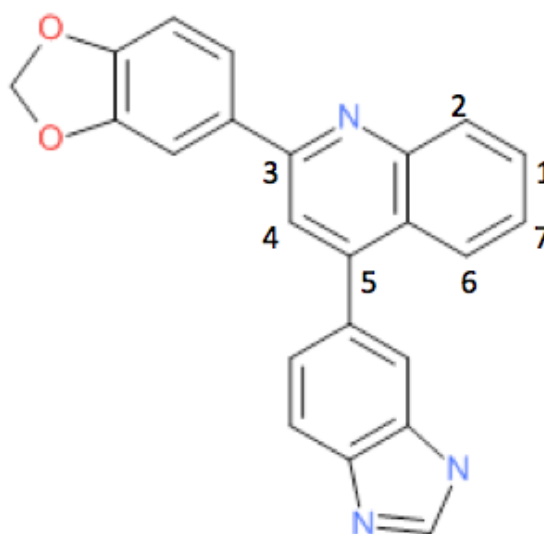


A la següent imatge, observem que no hi ha cap pont d'hidrogen en la molècula\_14; veiem també quins són els aminoàcids amb què s'uneix la variació de la VCAM-1 (LEU12, GLU67, GLU179, ARG146, ARG123, ILE177).

Figura 9

A continuació, expliquem com hem obtingut la nostra molècula\_14 a partir de la quinolina. Primerament, hem afegit una ramificació en tots els hidrògens, hem observat que en afegir-la als hidrògens 3 i 5 l'energia de Gibbs era més negativa. Hem començat a augmentar la molècula per aquests dos costats. Hem anat afegint diferents ramificacions en aquests dos hidrògens tenint en compte en tot moment que la molècula complís les 5 regles de Lipinski. Però, no ha estat fins a realitzar la molècula\_9 que hem obtingut una energia d'unió suficientment alta per considerar-la un bon inhibidor (-7,5 kcal / mol).

La seva estructura és la següent:



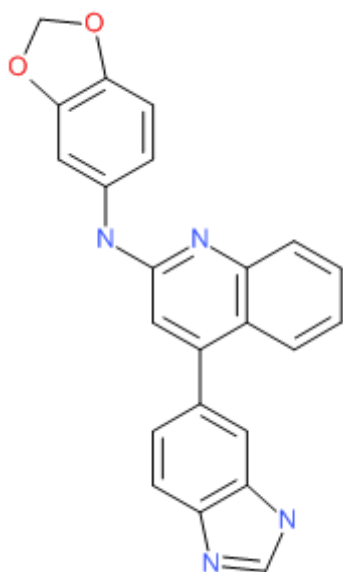
Observem que en afegir el ciclopentà amb dos oxígens i el ciclohexà amb un enllaç simple a l'hidrogen 3, juntament amb un altre grup igual canviant els dos oxígens per dos nitrògens en l'hidrogen 5, l'energia d'unió pujava considerablement. Per tant, aquests dos grups ja els mantenim. El que hem fet a continuació ha estat tractar de variar els enllaços de la quinolina en unir-se amb les ramificacions per observar si el fàrmac s'unia amb una major afinitat amb la VCAM-1.

Les variacions que hem fet, són les següents:

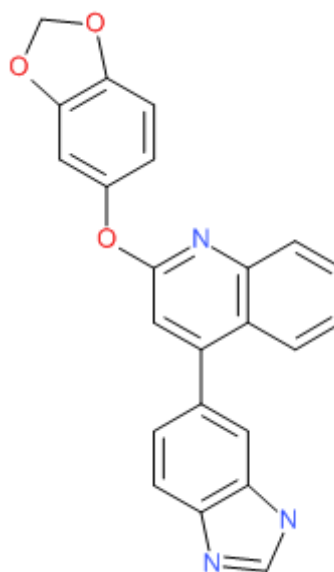
1. Molècula\_11: Hidrogen 3: Enllaç simple --> Nitrogen --> Enllaç simple  
Hidrogen 5: Enllaç simple
2. Molècula\_12: Hidrogen 3: Enllaç simple --> Oxigen --> Enllaç simple  
Hidrogen 5: Enllaç simple
3. Molècula\_13: Hidrogen 3: Enllaç simple --> Carboni --> Enllaç simple  
Hidrogen 5: Enllaç simple
4. Molècula\_14: Hidrogen 3: Enllaç simple --> Carboni --> Enllaç simple  
Hidrogen 5: Enllaç simple --> Nitrogen --> Enllaç simple
5. Molècula\_15: Hidrogen 3: Enllaç simple --> Carboni --> Enllaç simple  
Hidrogen 5: Enllaç simple --> Oxigen --> Enllaç simple
6. Molècula\_16: Hidrogen 3: Enllaç simple --> Carboni --> Enllaç simple  
Hidrogen 5: Enllaç simple --> Carboni --> Enllaç simple

Ara presentem les estructures de cada una de les molècules dissenyades amb els seus respectius valors d'energia d'unió:

Molècula\_11 (-7,5 kcal/mol):

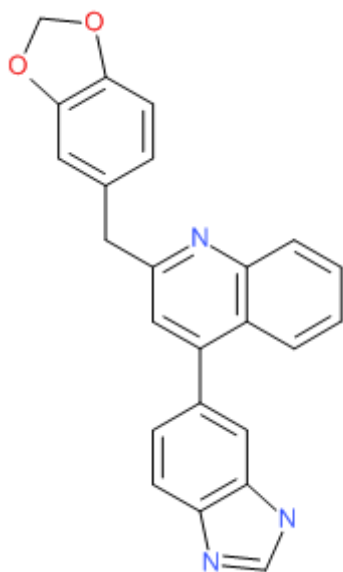


Molècula\_12 (-7,5 kcal/mol):

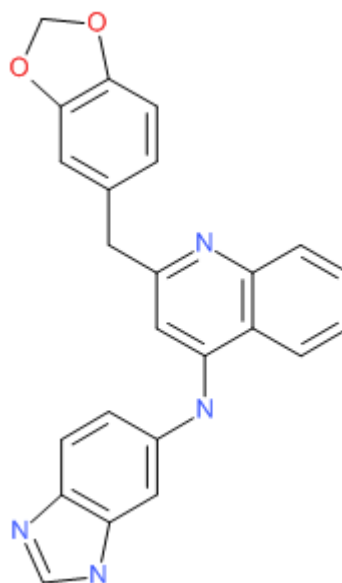




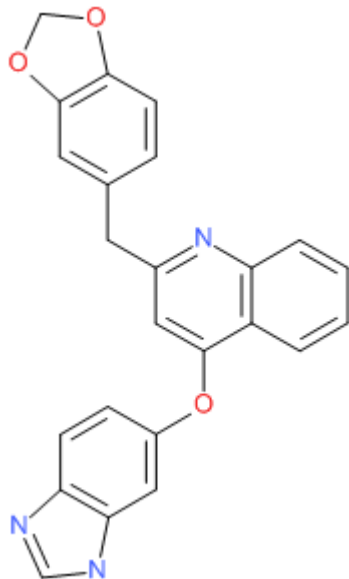
Molècula\_13 (-6,5 kcal/mol):



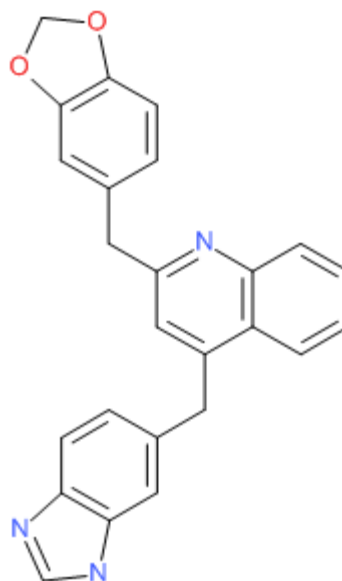
Molècula\_14 (-7,7 kcal/mol):



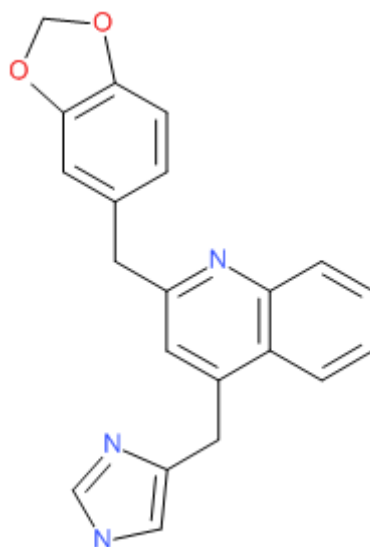
Molècula\_15 (-7,0 kcal/mol):



Molècula\_16 (-7,4 kcal/mol):



En observar que la molècula\_14 és amb la qual hem obtingut uns millors resultats, hem tractat d'introduir una nova variació en la seva estructura, per comprovar si encara podríem millorar més la seva energia d'unió:



En dissenyar aquesta nova molècula, l'energia d'unió ha empitjorat fins a -7,0 kcal/mol. Per tant, descartem fer més canvis i ens quedem amb la molècula\_14 que és la més estable i que, a més, compleix les 5 regles de Lipinski i s'ajusta millor amb la VCAM-1.

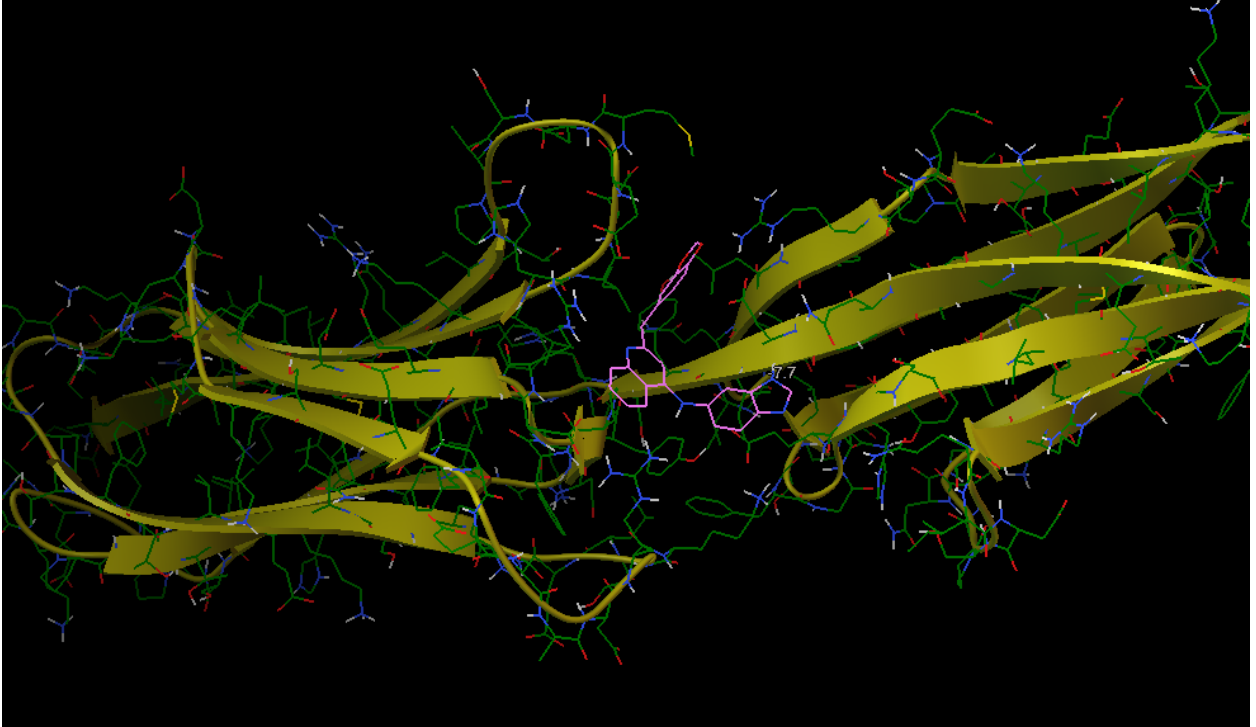
Un avantatge que ens proporciona el programa AutoDock Tools és que, només clicant les fletxes del teclat, podem observar les diferents maneres que té una mateixa molècula d'adaptar-se a la VCAM-1. Per exemple, la variació de la quinolina que hem escollit com a millor compost, en funció de la seva manera d'ajustar-se amb la VCAM-1 podria tenir les següents energies d'unió:

<b>Molècula_14 (1)</b>	-7,7 kcal/mol
<b>Molècula_14 (2)</b>	-7,1 kcal/mol
<b>Molècula_14 (3)</b>	-6,5 kcal/mol
<b>Molècula_14 (4)</b>	-6,4 kcal/mol
<b>Molècula_14 (5)</b>	-6,4 kcal/mol
<b>Molècula_14 (6)</b>	-6,3 kcal/mol
<b>Molècula_14 (7)</b>	-6,1 kcal/mol
<b>Molècula_14 (8)</b>	-6,0 kcal/mol

A les següents imatges, mostrem com hi ha diferents maneres de col·locar la molècula i que en funció de com s'ajusta amb la VCAM-1 té una energia d'unió diferent; els valors d'aquesta unió, en el cas de la molècula\_14, oscil·len entre -7,7 i -6,0.

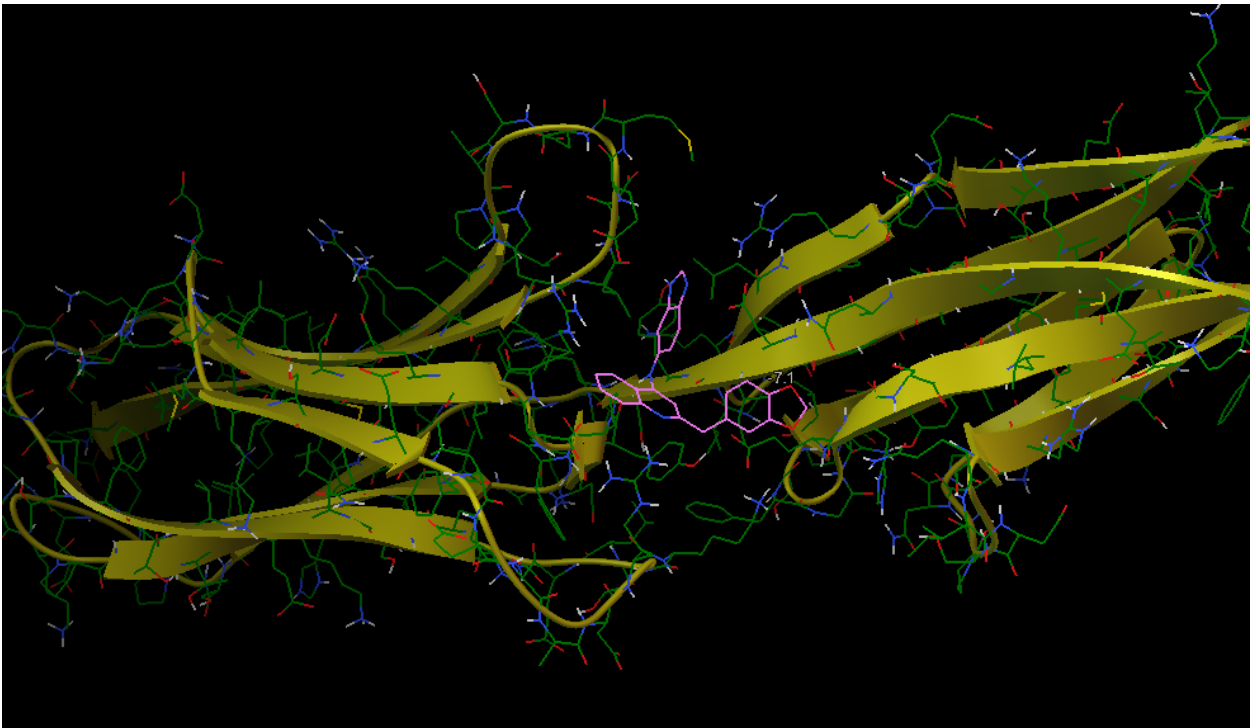
Molècula\_14 (1): -7,7 kcal/mol

Figura 12



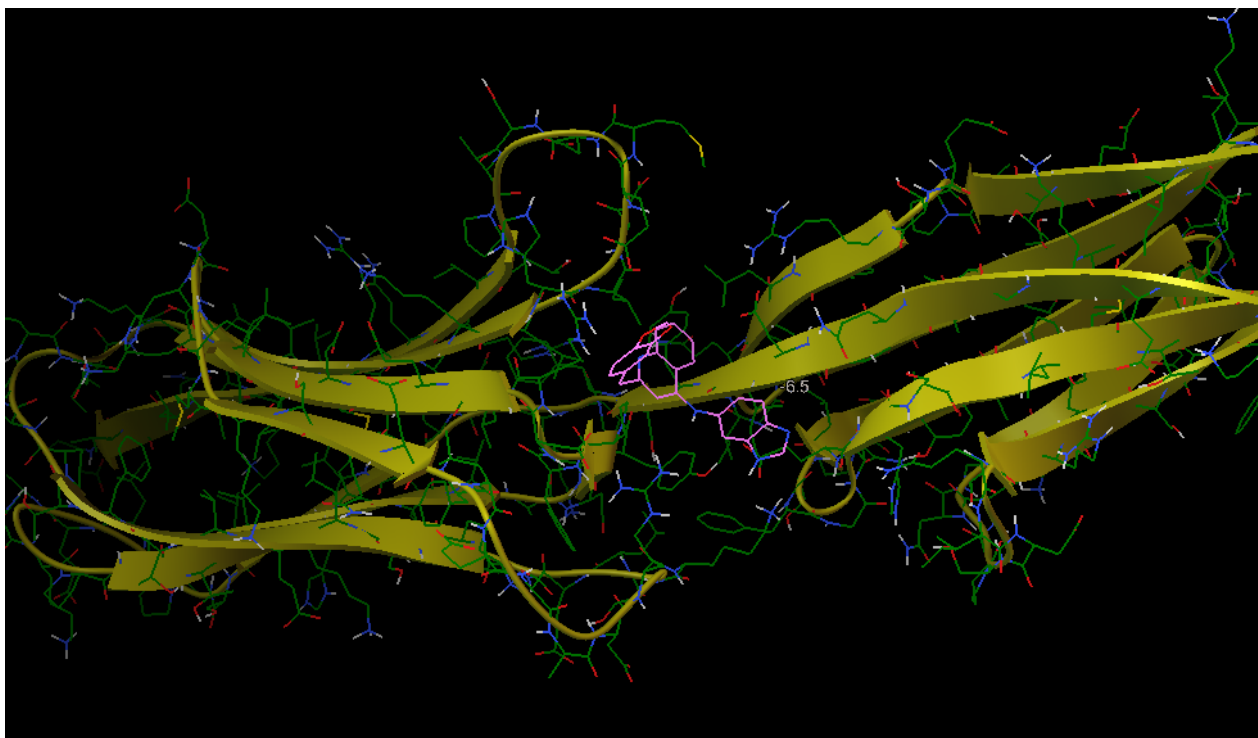
Molècula\_14 (2): -7,1 kcal/mol

Figura 13



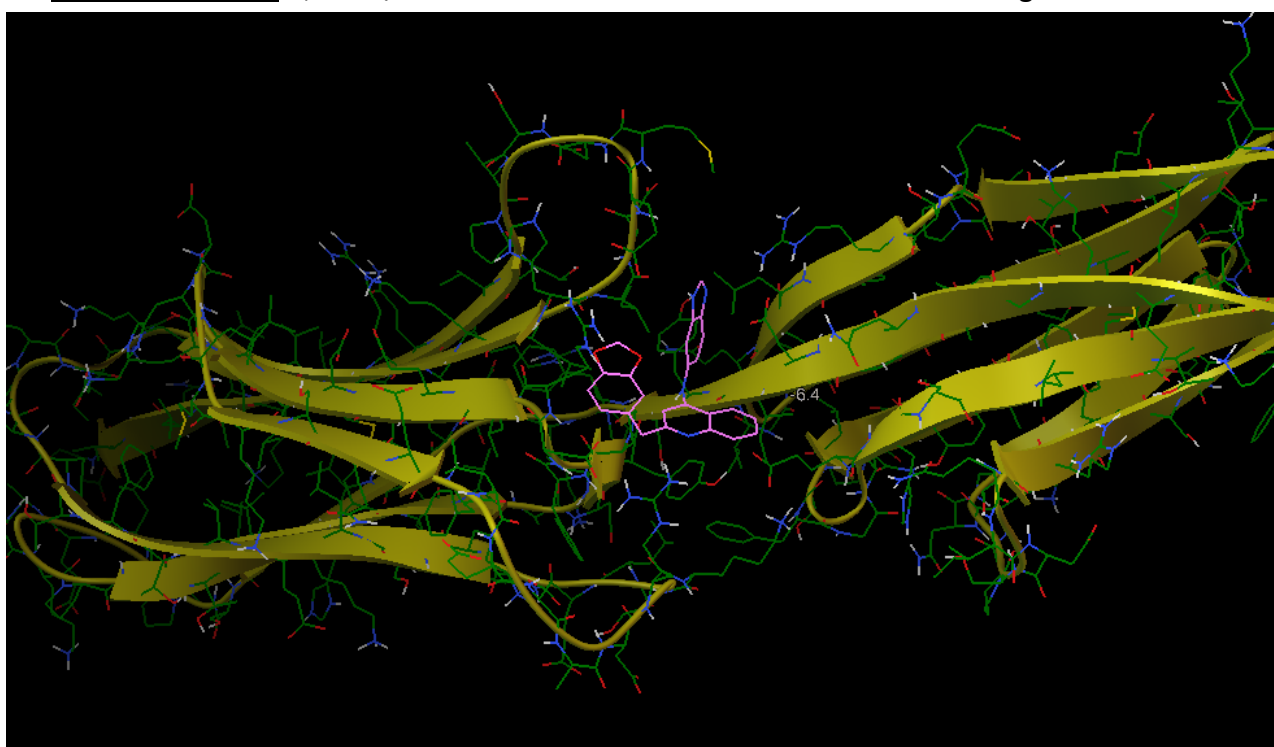
Molècula 14 (3): -6,5 kcal/mol

Figura 14



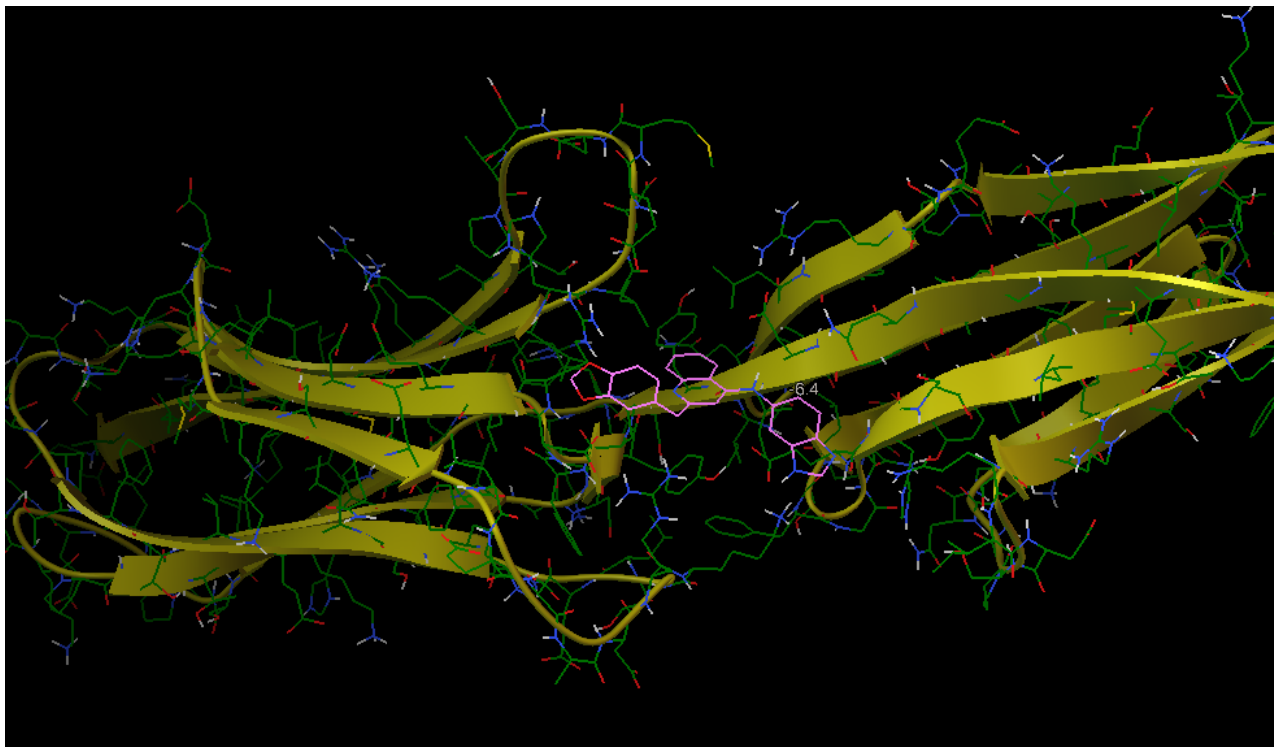
Molècula 14 (4): -6,4 kcal/mol

Figura 15



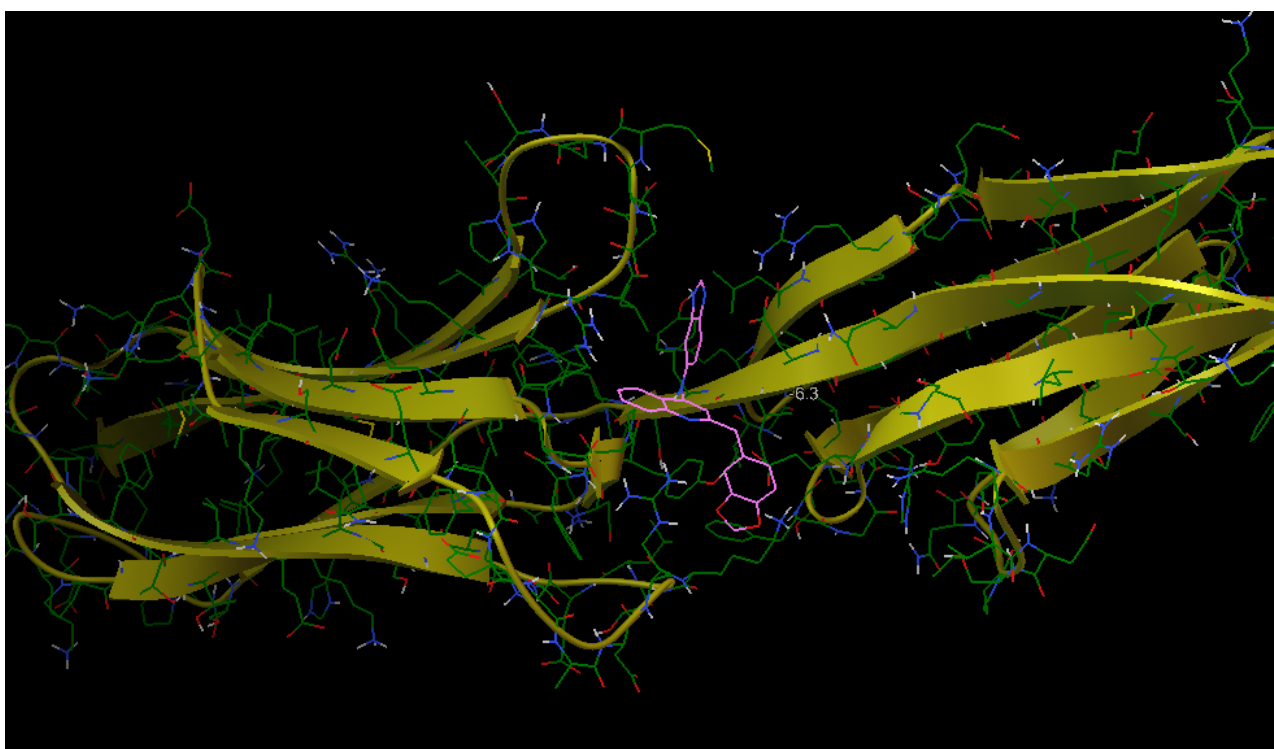
Molècula 14 (5): -6,4 kcal/mol

Figura 16



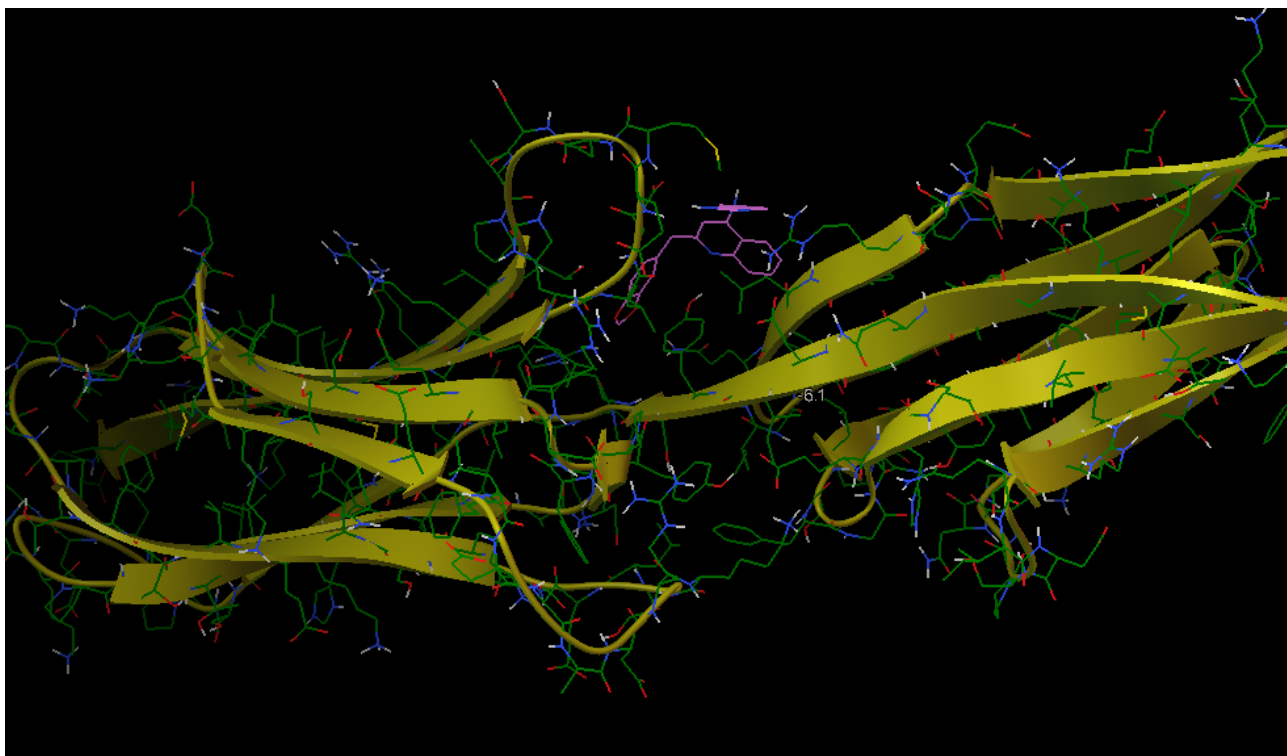
Molècula 14 (6): -6,3 kcal/mol

Figura 17



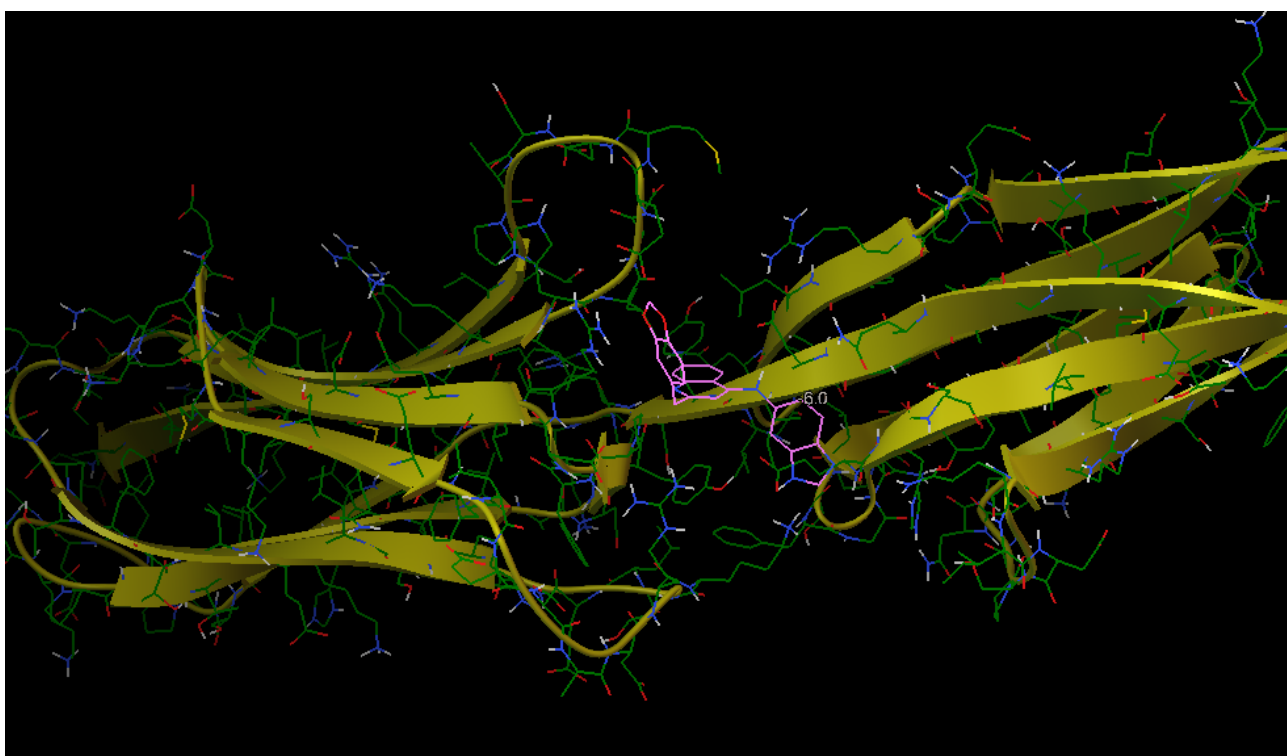
Molècula 14 (7): -6,1 kcal/mol

Figura 18



Molècula 14 (8): -6,0 kcal/mol

Figura 19



Figures quinolina:

Figura 4: Imatge de la quinolina amb la nostra pròpia numeració per indicar quin ordre hem seguit a l'hora de fer les modificacions a la molècula.

Figura 5: Imatge que mostra com és el disseny de la molècula de quinolina variada per aconseguir una energia de Gibbs molt més negativa. Captura de pantalla del programa Symyx Draw.

Figura 6: Captura de pantalla del Symyx Draw, on es mostra l'estructura de la molècula\_14 que hem dissenyat.

Figura 7 i 7 ': Captura de pantalla del programa Autodock Tools on s'observa com s'ajusta la molècula\_14 al centre actiu de la VCAM-1.

Figura 8: Captura de pantalla del programa Autodock Tools on s'observa també el centre actiu de la VCAM-1 a més a més de la seva estructura secundària (groc).

Figura 9: Captura de pantalla del programa Autodock Tools on veiem, en un fons blanc, amb quins aminoàcids interactua la variació de la quinolina que hem creat.

Figura 10: Captura de pantalla del programa Symyx Draw, on podem veure la molècula\_9 que ha estat la primera que hem obtingut amb una energia d'unió suficientment alta per considerar-la un bon inhibidor i que ens ha servit de base per a obtenir la molècula\_14.

Figura 11: Captura de pantalla del programa Autodock Tools on presentem la nova variació de la molècula\_14, ja que volíem comprovar si encara podíem millorar més la seva energia d'unió.

Figures 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19: Captures de pantalla del programa Autodock Tools per mostrar que una mateixa molècula, en ajustar-se de maneres diferents amb la VCAM-1, pot tenir diverses energies d'unió.

## 5. Conclusió

Gràcies a la tècnica del docking, hem pogut determinar amb valors numèrics l'afinitat entre dues molècules, és a dir, com d'estable és la seva unió. Així mateix s'ha pogut comprovar que tant l'estudi computacional com el correcte disseny del lligand són eines indispensables al camp de la síntesi de compostos orgànics i fàrmacs en particular.

A mesura que hem avançat en la investigació, ens hem adonat que hi ha certes estructures que, unides a l'indol, provoquen una millor adhesió d'aquesta molècula amb la proteïna VCAM-1. Aquests són els grups més voluminosos (d'ells, l'antranil ha estat el que ha donat millors resultats), els anells fusionats i les substitucions en la posició 3 de l'indol. Per contra, els grups discrets i petits no han donat bons resultats. A partir de les observacions fetes, s'han pogut dissenyar molècules cada vegada més afins amb VCAM-1. La que ens ha donat un millor resultat és la número 25 (-7,3kcal/mol) seguida de 13 i 18 (-7,2 i -7,0 kcal/mol, respectivament).

En quan a la quinolina, podem afirmar que hem dissenyat un fàrmac virtual que s'ajusta al centre actiu de la VCAM-1 interactuant amb els aminoàcids LEU12, GLU67, GLU179, ARG146, ARG123 i ILE177. L'energia de Gibbs del nostre fàrmac, la molècula\_14, és de -7,7 kcal / mol, un valor bastant alt, tenint en compte que el punt de partida era de -4,7 kcal / mol, que és l'energia d'unió que tenia la quinolina amb la VCAM-1. Hem tingut en compte que el nostre fàrmac complís les 5 regles de Lipinski.

Al llarg d'aquest projecte s'ha après a relacionar aspectes com la flexibilitat dels enllaços, la voluminositat dels grups, les electronegativitats dels àtoms i la possibilitat de que es produeixin interaccions intra i intermoleculares amb valors canviants d'energia, calculats mitjançant el docking. Així doncs, s'ha canviat el concepte inicial del mètode d'assaig i error per una valoració conscient de la causa i l'efecte.

Tot i que a la bibliografia es troben descrits lligands amb estructura peptídica que poden funcionar en processos de reconeixement similars al que hem estudiat, en el nostre cas no va ser així, i vam obtenir valors d'energia elevats (sistema inestable). Per tant, es va decidir descartar aquesta línia d'investigació, tot i que podria ser un futur objectiu a investigar amb més profunditat.

Aquest treball m'ha permès aprofundir en aspectes que mai abans m'havia plantejat que poguessin funcionar d'aquesta manera. Per exemple, el fet que qualsevol procés bioquímic, per



simple que sembli, és una complexa seqüència de reconeixements entre substrat i lligand que impliquen diferents respostes.

Tot i que els inhibidors que hem dissenyat busquen la millor complementarietat amb la diana del treball, i no s'ha tingut en compte la seva facilitat de síntesi, algunes molècules com la número 7 sí que són molècules de síntesi.

Tot i que no podem quantificar fins a quin punt les molècules dissenyades tenen potencial farmacològic, hem pogut millorar notablement la capacitat d'inhibició que tenen tant el derivat indòlic com el quinolèic, dissenyat sobre VCAM-1, complint així l'objectiu d'aquest estudi.

Ens vam posar en contacte amb el Dr. Massagué, sobre la nostra iniciativa i ens va advertir que amb els seus estudis havia descobert que en atacar la VCAM-1, l'únic problema que tindríem seria que només evitaríem la metàstasi al pulmó o a l'os, però no al cervell ni al fetge. Per tant, això limitaria l'aplicació del tractament en els malalts que estiguin afectats per la metàstasi en tots aquests òrgans.

## 6. Bibliografia/webgrafia

### Articles científics, llibres i altres mitjans escrits:

1. Bos, P.D., Zhang, X.H., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J. van de Vijver, M.J., Gerald, W.L., Floekens, J.A., and Massagué, J., 2009, *Nature*, **459**, 1005-1009
2. Li, B., Wang, C., Zhang, Y., Zhao, X.Y., Huang, B., Wu, P.F., Li, Q., Li, H., Liu, Y.S., Cao, L.Y., 2013, *Oncogene*, **32**, 2952-2962
3. La Vanguardia - tendencias, pag. 30, 1 octubre del 2014 (Periódico)
4. Valiente, M., Obenauf A.C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X H.-F., Lee, D. J., Chafte, E.J., Kris, M.G., Huse, J.T., Groggi, E. and Massagué, J., 2014, *Cell*, **156**, 1002-1016
5. Jin, H., Lee, W.S., Yun, J.W., Jung, J.H., Yi, S.M., Kim, H.J., Choi, Y.H., Kim, G., Jung, J.M., Ryu, C.H., Shin, S.C., Hong, S.C., 2013, *Oncol. Rep.*, **30 (5)**, 2336-42
6. Heterocyclic Chemistry, 3<sup>rd</sup>, Joule, J. A., Mills, K., Smith, G.F., Chapman&Hall (Libro)
7. Bokesch, H. R., Pannell, L. K., McKee, T. C.; Boyd, M. R., 2000, *Tetrahedron Lett*, **41**, 6305
8. Casapullo, A., Bifulco, G., Bruno, I., Riccio, R. J., 2000, *Nat. Prod.* **63**, 447
9. Olgen, S., Akaho, E., Nebioglu, D. J., 2003 *Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **18**, 485
10. Kameshwara rao, V., Bhupender, S.C., Nasrolahi, A., Tiwari, R., Parang, K., Kumar, A., 2011, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **21**, 3511-3514.
11. Schmidt, S., Preu, L., Lemcke, T., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M., Kunick, C., 2011, *Eur. Journal of Med. Chem.*, **46**, 2759-2769.
12. Robert, C., Ribas, A. Wolchock, J., D., 2014, *The Lancet*, **384** (9948) 1109-1117
13. Misra, U., Hitkari, A., Saxena, A., K., Gurtu., Shanker, K., 1996, *Eur J Med Chem*, **31**, 629-634.

### Patents

- A. Hoffmann La Roche. Li Chen, Robert William Guthrie, Tai-Nang Huang, Kenneth G Hull, Achytharao Sidduri, Jefferson Wright Tilley. Núm. WO1999010313 A1

### Bases de dades

NCBI- National Center for Biotechnology Information (Pubmed/Medline):  
www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbisearch  
Web of Knowledge (Universitat de Girona)

### **Bases de dades de patents d'accés lliure**

Spacenet

Patentscope

Patente A: <http://www.google.com/patents/WO1999010313A1?cl=en>

Artículo 7: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002113>

Pàgines webs

<a href="http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_095.html">http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_095.html</a>	<b>març 2014</b>
<a href="http://training.itcilo.it/actrav_cdrom2/es/osh/ic/91225.htm">http://training.itcilo.it/actrav_cdrom2/es/osh/ic/91225.htm</a>	<b>març 2014</b>
<a href="http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es">http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es</a>	<b>març 2014</b>
<a href="http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/">http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/</a>	<b>abril 2014</b>
<a href="http://www.who.int/topics/cancer/es/">http://www.who.int/topics/cancer/es/</a>	<b>abril 2014</b>
<a href="https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/ELCANCER/Paginas/Fasesdelaenfermedad.aspx">https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/ELCANCER/Paginas/Fasesdelaenfermedad.aspx</a>	<b>maig 2014</b>
<a href="http://lema.rae.es/drae/?val=metástasis">http://lema.rae.es/drae/?val=metástasis</a>	<b>juny 2014</b>
<a href="http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_095.html">http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_095.html</a>	<b>juliol 2014</b>
<a href="http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tipos/metastatico-respuestas">http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tipos/metastatico-respuestas</a>	<b>juliol 2014</b>
<a href="http://www.cosmos.com.mx/wiki/dpdl/Quinolina">http://www.cosmos.com.mx/wiki/dpdl/Quinolina</a>	<b>agost 2014</b>
<a href="http://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/3/moleculas_adhesion_importancia.asp">http://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/3/moleculas_adhesion_importancia.asp</a>	<b>agost 2014</b>
<a href="http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0001-63651999000300034&amp;script=sci_arttext">http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0001-63651999000300034&amp;script=sci_arttext</a>	<b>agost 2014</b>
<a href="http://www.uv.es/tunon/QComp/Sesion_QC_Entorno.pdf">http://www.uv.es/tunon/QComp/Sesion_QC_Entorno.pdf</a>	<b>agost 2014</b>
<a href="http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/10/09/actualidad/1381313884_234389.html">http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/10/09/actualidad/1381313884_234389.html</a>	
<a href="http://www.babylon.com/definition/regla%20de%20Hüffel/">http://www.babylon.com/definition/regla%20de%20Hüffel/</a>	<b>agost 2014</b>

## 7. Agraïments:

M'agradaria agrair a totes les persones que d'alguna manera o altra han ajudat a què aquest estudi s'hagi pogut realitzar:

Primerament al Sr. \_\_\_\_\_ (tutor del treball) i al Sr. Aleix Viñolas (professor a la Universitat de Navarra, llicenciat en química i bioquímica i estudiant de Doctorat en Medicaments i Salut) que em van donar el privilegi d'oferir-me la possibilitat de realitzar una monografia en aquest camp en posar-me en contacte amb els estudis del Dr. Massagué.

A Gemma Cabarrocas, gràcies a qui vaig poder consultar articles i fer un estudi amb el màxim rigor científic. També per donar-me accés a llibres i a tot el seu coneixement en química.

També als meus pares per ser, com sempre, els qui em donen el suport necessari per poder dur a terme una tasca tan important.

Al Sr. Fèlix Bruguera per dedicar una part del seu temps a realitzar la correcció lingüística del treball.

Als meus companys de col·legi Santi Caireta i Adrià Marly, de la promoció anterior a la nostra, que ens van introduir (a mi i a l'Arnau) al món de la química computacional i ens van ensenyar com fer els Dockings, com dissenyar molècules... i tot allò que en un principi ens semblava tan lluny i tan complicat.

Donar gràcies al nostre col·legi, Bell-lloc del Pla, que ens ha prestat les seves instal·lacions i el seu material, bàsicament una trentena d'ordinadors, durant les vacances d'estiu que ens ha permès realitzar els Dockings de manera ràpida i eficaç.

També voldria agrair tant a la Universitat de Girona (UdG), per atorgar-me una beca Botet i Sisó i prestar les seves instal·lacions i material; com al Sr. Pedro Salvador, professor de química computacional a la Universitat de Girona, que em van assignar en guanyar la Beca Botet i Sisó, i qui ens va donar unes classes sobre les dianes biològiques i altres programes per fer Dockings.

I, finalment, al Dr. Joan Massagué, les investigacions aporten nova llum en aquest complicat camí que, sens dubte, portarà al nostre savi, a resoldre aquelles incògnites que, ara per ara, presenta aquesta maligna malaltia. Moltes gràcies per les seves investigacions, per l'ànim que ens va donar la seva resposta al nostre missatge i la seva confiança en el nostre humil treball. Gràcies.

## 8. Apèndix: La resposta del Dr. Massagué

Al principi i al final d'aquest projecte, justament amb el tutor del treball ens vam posar en contacte amb el Dr. Massagué via correu electrònic, per presentar-li el treball. Sense cap mena de dubte, la seva resposta va ser un factor motivant molt gran en aquest treball, per la seva categoria i la seva visió encoratjadora del nostre projecte. A continuació veiem la resposta que vam rebre al començament del projecte i la que vam rebre quan li vam enviar els resultats de la investigació:

Benvolgut Professor Montoliu,

Moltes gràcies per l'amabilitat de posar-me al corrent de la vostra magnífica iniciativa d'assignar als alumnes projectes de recerca basats en avenços científic d'actualitat. Estic molt honrat de que s'hagi fixat en el treball del meu grup com a base per un d'aquests projectes.

Penso que atacar la proteïna d'adhesió VCAM-1 amb molècules de disseny que bloquegin la seva activitat d'unió al contrareceptor VLA4 (integrines alfa-4) és molt meritori. Nosaltres mateixos ho em considerat, però hi ha tants projectes a fer que no donem l'abast. Ara mateix ens veiem forçat a centrar-nos en la molècula relacionada, L1CAM. Per tant, és molt important que altres grups de científics, incloent els seus alumnes de batxillerat, prenguin l'iniciativa de seguir allà on nosaltres no podem arribar.

Referent a atacar VCAM-1, la única prevenció que jo tindria és que potser només seria efectiu contra la metàstasi al pulmó a l'os, però no al cervell o al fetge. Això limitaria l'aplicació del tractament en el cas de malalts que estiguin afectats per metàstasi en tots aquests òrgans. Però, al capdavant, cal intentar-ho per saber la resposta.

Amb les meves cordials salutacions a vostè i als seus alumnes, que prego faci extensives a en Ramon Moncunill,

Atentament,

Joan Massagué, Ph.D.

Director

Sloan Kettering Institute

Benvolgut Sr Montoliu,

Em va agradar molt rebre els resultats d'aquests projectes, ara fa uns dies, quan em trobava a Barcelona per les festes. Fins avui, situat en un cul de món dit Washington, a l'estat nord-americà de Connecticut, no he trobat una estona per respondre.

Vaig llegir els dos treballs fil per randa. Els projectes em vam semblar molt sofisticats i assenyats, especialment considerant que els seus autors no son experts en la matèria. Be, potser no ho son ara, però, ves a saber. Les vocacions científiques, o per qualsevol altra cosa, sorgeixen dels estímuls més impensats. Només el pas del temps en mostra el resultat. En el meu cas va ser el meu mestre de ciències naturals, en Joan Geli, i mon pare, un farmacèutic nascut Vallmoll, a l'Alt Camp, que van catalitzar la meva inclinació de naturalista al 13 anys. Des de l'ornitologia a la botànica, a la bioquímica i sobretot la meva passió real, la mineralogia. Vaig quedar infectat, i ja no hi va haver remei.

La meva enhorabona a vostè per estimular el jovent a 'fer coses' que van més enllà del Whatsapp i la Lady Gaga (ep, una artista excepcional, tot sigui dit). La meva gratitud per haver-me inclòs, encara que de fos de maneta tangencial, en aquest meritori projecte.

Desitjant-vos un Bon Any Nou,

Joan Massagué, Ph.D.

Director

Sloan Kettering Institute