

————— *Artículo original* —————

Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I *

MARÍA LUISA GARCÍA, BEATRIZ DE PASCUAL-TERESA,
MIGUEL FERNÁNDEZ BRAÑA

Departamento de Ciencias Químicas. Sección Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad San Pablo CEU. Madrid

RESUMEN

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) juegan un papel importante en la regulación de la división del ciclo celular, lo que supone una prometedora diana para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos frente al cáncer. Se ha realizado un gran esfuerzo durante los últimos años en la búsqueda de pequeñas moléculas que pueden actuar como inhibidores químicos de las CDKs. Estos inhibidores bloquean la progresión del ciclo celular y presentan una interesante actividad antitumoral.

La butirolactona I, un producto natural aislado de *Aspergillus terreus*, que ha mostrado actividad antiproliferativa frente a carcinoma de colon y de páncreas en líneas celulares. Se comporta como un inhibidor competitivo del ATP, mostrando alta afinidad y selectividad frente a CDK1 (cdc2) y CDK2. Debido a la complejidad de la estructura de dicho compuesto, no se conoce bien su modo de unión a la diana farmacológica.

Mediante técnicas de modelización molecular, hemos llevado a cabo un estudio que nos ha permitido proponer un modo de unión de dicho compuesto a su diana farmacológica. El complejo de más baja energía obtenido por este procedimiento fue posteriormente sometido a una simulación de dinámica molecular en presencia explícita del disolvente en torno al sitio de unión del ligando. El análisis de dicha simulación indica la formación de un complejo estable, que proponemos como posible modo de unión, y que ha servido como base para el diseño racional de otros ligandos que han sido sintetizados en nuestro laboratorio.

* Premio Normon 2002 de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Palabras clave: Modelado molecular.— Docking.— CDK2.— Inhibidor químico.

ABSTRACT

Theoretical study of the binding mode between CDK2 and butirolactone I.

Cyclin dependent kinases (CDKs) play a central role in the regulation of the cell division cycle, which makes them a promising target for the development of therapeutic agents in cancer. Efforts have been made in the last few years in the search for small molecules that can act as chemical inhibitors of CDKs. These inhibitors block cell cycle progression and display interesting antitumor activities.

Butirolactone I, a natural product isolated from *Aspergillus terreus*, has shown antiproliferative activity against colon and pancreatic carcinoma cell lines; it behaves as an ATP competitive inhibitor, displaying a high affinity and selectivity towards CDK1 (cdc2) and CDK2. Due to the structural complexity of this compound, little is known about its binding mode to the pharmacological target.

In this work, computer-based design techniques have been used to study the binding mode of butirolactone I to CDK2. The lowest energy complex predicted by these means was later submitted to molecular dynamics simulations in the presence of solvent around the ligand's binding site. The analysis of this simulation indicates the formation of a stable complex, which we propose as a possible binding mode. This has been used as a starting point for the rational design of other ligands that have been synthesized in our laboratory.

Key words: Molecular modelling.— Docking.— CDK2.— Chemical inhibitor.

INTRODUCCIÓN

Cualquier acción farmacológica tiene su inicio en la formación de un complejo entre el fármaco y su sitio receptor en la macromolécula biológica diana. Por lo tanto, la especificidad de la respuesta a un fármaco dado viene determinada en gran medida por la capacidad de los distintos receptores celulares para reconocerlo como agonista o antagonista y provocar o no una respuesta (1).

Este proceso de reconocimiento molecular tiene lugar tanto entre fármacos y receptores, sustratos y enzimas o entre las llamadas moléculas huéspedes (guest) y hospedadores (host) que han abierto nuevas perspectivas en la denominada química supramolecular (2), por lo que de forma general nos referimos a los complejos ligando-receptor.

En consecuencia, el receptor debe ser contemplado como un sitio capaz de distinguir entre posibles ligandos, y moléculas que no poseen afinidad de unión.

El diseño y síntesis de nuevas sustancias capaces de interactuar con receptores específicos es el objetivo prioritario de la Química Farmacéutica. Hasta hace poco tiempo estas síntesis se realizaban al azar, o en el mejor de los casos guiadas por el estudio más o menos cuantitativo, del efecto que diversas modificaciones introducidas en la estructura de distintos fármacos o ligandos, ejercían sobre una determinada acción farmacológica. En gran medida esto era la consecuencia del desconocimiento existente sobre la estructura de los receptores.

En los últimos años el panorama ha cambiado gracias al avance de diversas disciplinas, que han hecho posible la identificación de numerosas macromoléculas diana y en algunos casos de la elucidación a nivel atómico de su estructura y la de sus complejos con ligandos.

A medida que se fueron cristalizando y analizando complejos macromolécula-ligando, se fueron estableciendo las características generales de la unión ligando-receptor. Pronto se puso de manifiesto que el ligando se mantiene en posición debido a las interacciones con los diferentes grupos del receptor, grupos que en el caso de las proteínas pueden estar ampliamente dispersos en la secuencia de aminoácidos. También se apreció que una función importante de la estructura molecular en su conjunto es precisamente mantener estos grupos en la orientación relativa adecuada para definir las características de la cavidad y constituir un sitio de unión específico. Las contribuciones individuales de cada grupo a la energía total de unión pueden ser débiles, pero la suma de todas ellas puede hacer que un ligando se una muy firmemente. Como consecuencia de esta interacción, pueden aparecer cambios alostéricos que, por ejemplo, en el caso de las enzimas, o incluso en el de la hemoglobina, son de importancia fundamental para comprender el mecanismo de acción de la proteína.

La simulación de la interacción de un fármaco con su receptor es un problema en el que se hallan implicadas muchas fuerzas de asociación intermolecular: hidrofóbicas, dispersión o de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y electrostáticas.

Las fuerzas que más participan en la unión parecen ser las interacciones hidrofóbicas, pero la especificidad en la unión parece estar controlada, fundamentalmente, por los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas.

La simulación de las interacciones intermoleculares en un complejo ligando-proteína resulta difícil, ya que existen una gran cantidad de grados de libertad e insuficiente conocimiento del efecto del disolvente en la asociación.

La técnica manual de modelado de complejos ligando-receptor trata inicialmente a este último como si fuera rígido, mientras que la orientación del ligando se va ajustando tanto por movimientos de traslación y rotación, como mediante giros de enlaces rotables dentro del ligando. Esta maniobra de acoplamiento se denomina «*docking*», por su analogía con el atraque de los buques en el puerto.

Como el proceso de *docking* no deja de ser un rompecabezas tridimensional (3) se han desarrollado algunos métodos que intentan explorar las diversas alternativas de forma automatizada.

En el proceso de *docking* de un ligando en su receptor, se intenta imitar el curso natural de la interacción del ligando con su receptor a través de la ruta de mínima energía. Normalmente, el receptor se representa rígido, como ya hemos indicado, mientras que al ligando se le permiten cambios conformacionales. En casos favorables las dos moléculas pueden ser aproximadas por los planos que contienen los centros de interacción, y luego mover los planos mientras se calculan las energías de interacción. Las moléculas se aproximan físicamente la una a la otra y la conformación preferida en el encaje de las dos moléculas se minimiza.

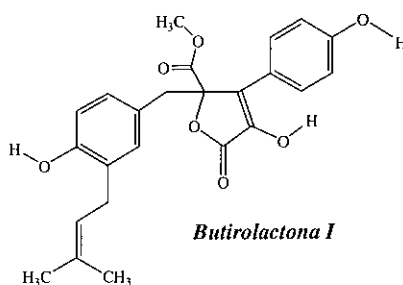
Localizar los complejos de mínima energía ligando-receptor presenta sobre todo el problema de que los receptores poseen formas complicadas y ajustables y de que existen muchas formas de encajar un ligando flexible dentro de ellos.

Existen diversos métodos que tratan de resolver este rompecabezas de forma automatizada y que se pueden agrupar en dos categorías (4): a) Los métodos de superposición, que están basados en la complementariedad. El ejemplo más conocido es el programa DOCK (5), que primero caracteriza los surcos y las invaginaciones de

la superficie de la macromolécula que pueden constituir sitios o centros diana para el ligando (o sitios alostéricos, o sitios sin función conocida), los cuales llena con conjuntos de esferas cuyos centros sirven para crear una imagen negativa del sitio. b) Los métodos basados en la energía. En ellos se combina un método de exploración conformacional para el ligando con el cálculo de potenciales de afinidad, en los puntos de una malla tridimensional en la que se encuentra incluida la macromolécula. Una vez modelado el complejo se utiliza la mecánica molecular para obtener la energía de dicho complejo. El ejemplo más conocido es el programa *autodock* (6), una técnica de docking flexible, que ha sido la utilizada para la realización de este trabajo.

Butirolactona I

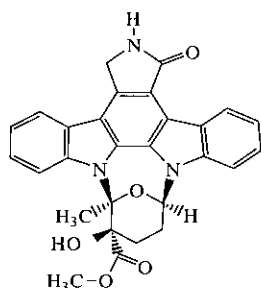
La butirolactona-I [α -oxo- β -(*p*-hidroxi-*m*-3,3-dimetilalilbencil)- γ -metoxicarbonil-butirolactona]; (C₂₄H₂₄O₇); fue aislada inicialmente en 1977 como un nuevo tipo de metabolito procedente del *Aspergillus terreus* variedad *africanus* y posteriormente del *Aspergillus* cepa F-25799 (7), y su estructura fue establecida ese mismo año (8) mediante técnicas de UV, IR, FAB-MS, 1 H-RMN y 13C-RMN. Sin embargo, su actividad biológica no fue descrita hasta 1993, constituyendo un interesante ejemplo de descubrimiento de la actividad de un compuesto natural previamente descrito.



En estas pruebas se ensayaron diversos productos de microorganismos como inhibidores selectivos de CDK1 (*cdc2*) por ensayos *in vitro* utilizando el complejo ciclina B-CDK1 altamente purificada procedente de células de ratón FM3A y de péptido sintético AKAKKTPKKAKK (Péptido S1) como sustrato específico, comprobándose que un producto presente en la cepa F-25799 presentaba una fuerte acción inhibitoria frente a la CDK1. El inhibidor fue identificado como la butirolactona I. Posee una interesante actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de carcinoma de colón y de páncreas. Actúa como inhibidor competitivo del ATP,

mostrando además una alta afinidad y selectividad frente a CDK1 y CDK2 (7, 9).

La butirolactona I es un inhibidor que interacciona con el complejo CDK-ciclina a través del sitio de unión del ATP. Inhibe CDK1 con una IC_{50} de 0.68 μM y CDK2 con una IC_{50} de 0.82 μM (10) y es específico frente a otras quinazas, incluyendo CDK4 (7) (tabla 1).

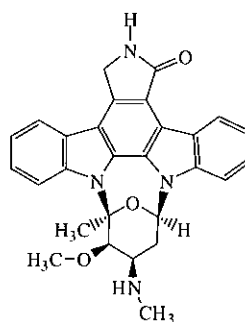


K252a

En esta tabla se compara la actividad de la butirolactona frente a la de K252a y estaurosporina, compuestos que han mostrado una interesante actividad inhibitoria frente a diferentes quinazas. Como se puede observar la butirolactona mostró una mayor selectividad frente a CDK1.

Las propiedades señaladas para este compuesto, la potencia y la selectividad de su acción, han llevado al estudio de su comportamiento dentro de las principales líneas de aplicación terapéutica señaladas para los inhibidores de ciclinas.

En este sentido, se han desarrollado estudios como el de Nishio y colaboradores, en el que se pone de manifiesto el efecto antitumoral sobre cáncer de hígado en diversas líneas celulares con valores de IC_{50} del orden $\mu\text{g/ml}$, no observándose resistencia cruzada a otros fármacos (11).



Estaurosporina

También se ha estudiado el efecto de la butirolactona I sobre la expresión de los genes de la albúmina y la α -fetoproteína (AFP) en células de hepatoma HuH-7. La butirolactona I inhibe el crecimiento de las células y detiene el ciclo celular en la fase G2/M (12). Estos resultados son especialmente interesantes en la lucha contra el carcinoma hepatocelular, uno de los cánceres más dañinos.

Hasta el momento no se ha descrito ningún otro derivado de butirolactona I que presente dicho perfil de actividad, por lo que constituye un interesante prototipo para el diseño de nuevos inhibidores de

Tabla 1. Efecto inhibitor de la butirolactona I frente a varias protein-quinasas, comparado con los de otros inhibidores. (Valores de IC_{50} en μM)

QUINASA	Butirolactona I	K252 a	Estaurosporina
CDK1/ciclina B	0.68	1.8	0.0069
CDK2/ciclina A	1.5		
CDK4/ciclina D	Inactiva		
CDK5/p ³⁵	1.5		
PKC	160	1.2	0.0088
AK	260	1.3	1.1
MAPK	94	0.20	0.0069
CKII	240	9.0	15
CKI	>590	59	50
Tyr K	>590	21	0.43

Proteínquinasa C de ratón (PKC), unidad catalítica de quinasa dependiente de AMPc bovina (AK), quinasa 42kDa-MAP humana (MAPK), caseínquinasa I y II porcina (CK I, CKII) y tirosínquinasa del receptor EGF humano (TyrK).

CDKs, sobre todo si se tiene en cuenta que tampoco se han identificado sistemas similares en *screenings* generales de quinasas (13).

Debido a que por el momento ningún grupo de investigación ha llevado a cabo la síntesis total del compuesto natural y a la dificultad que conlleva la obtención de un complejo estable ligando-proteína para su posterior caracterización mediante técnicas cristalográficas o de RMN, se carece de datos referentes al complejo que forma la butirolactona I con CDK1 y CDK2, quinasas por las que ha mostrado una elevada selectividad y constituye por lo tanto un candidato ideal para llevar a cabo estudios teóricos sobre su modo de unión con la CDK2 y un prototipo muy interesante para el diseño de compuestos de estructura más sencilla.

CDK2

La CDK2 (quinasa dependiente de ciclina 2) actúa en el control de los procesos que tienen lugar en las fases G₁ y S del ciclo celular. Para garantizar una adecuada coordinación entre todos los procesos que tienen lugar durante el ciclo celular, es necesario que las CDKs se encuentren ampliamente reguladas por diferentes mecanismos catalíticos.

Además se han resuelto las estructuras de los complejo CDK2-ciclinaA-ATP (14) y CDK2-ATP (14) (figura 1). Este último complejo constituyen la base del presente trabajo, por lo que a continuación se describe brevemente su estructura.

La estructura de la CDK2 se divide en dos lóbulos. El más pequeño, lóbulo N-terminal, consiste en una hoja de 5 láminas β ($\beta 1 - \beta 5$) y una gran hélice α ($\alpha 1$); y el más grande, lóbulo C-terminal, contiene un haz de 4 hélices α ($\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 6$), una pequeña lámina β y dos hélices adicionales. El sitio de unión del ATP se encuentra en una cavidad entre los dos lóbulos. La adenina se localiza en un bolsillo hidrofóbico entre la lámina β del lóbulo pequeño y el Loop7 (L7) existente entre $\beta 5$ y $\alpha 2$. Los fosfatos del ATP están retenidos por interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno con varios residuos (Lys33 y Asp145) y con el esqueleto de amidas del loop rico en glicinas que está situado entre $\beta 1$ y $\beta 2$. Un oxígeno de cada uno de los tres fosfatos del ATP contribuye a una coordinación octaédrica del ión Mg^{2+} . Los otros tres ligandos implicados en la coordinación son Asp145, Asn132 y una molécula de agua (W558) (esquema 1).

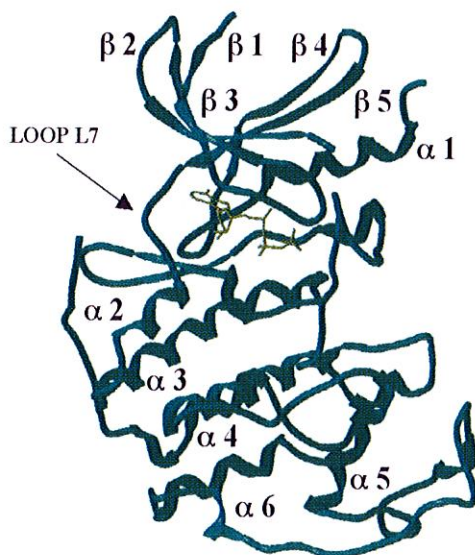
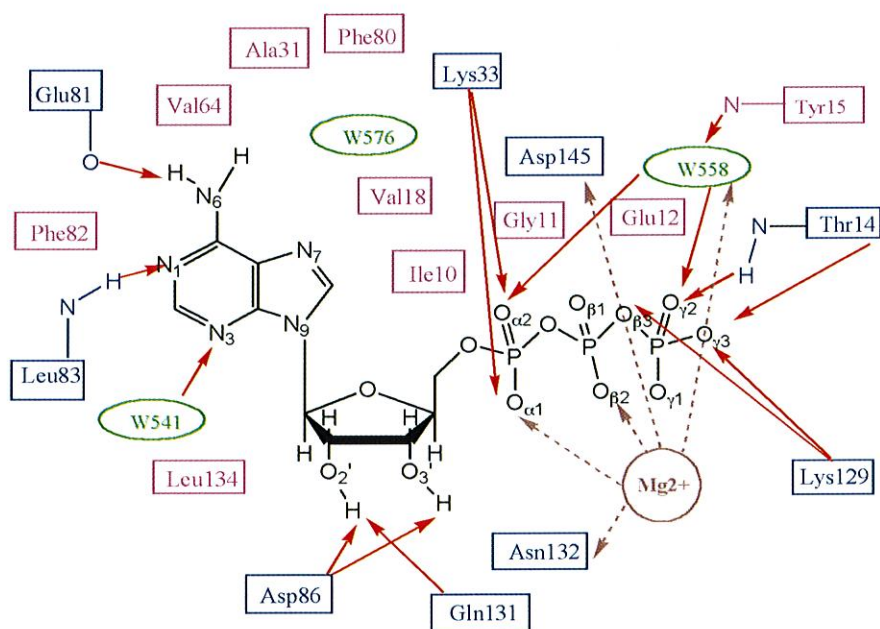


FIGURA 1. Estructura del complejo cristalino CDK2:ATP (Código pdb: 1hck).

Actualmente, se dispone de las coordenadas de las estructuras cristalinas del complejo formado por la CDK2 humana con isopenitiladenina, olomoucina, (15) roscovitina, (16) flavona L868276, (17) estaurosporina (18) y purvalanol (19). Así se ha podido demostrar que todos estos inhibidores actúan de una forma competitiva con el ATP, (20) e interaccionan al igual que el ATP, en la cavidad delimitada por los dos lóbulos de la proteína. El análisis de las estructuras de los complejos CDK-inhibidor ha permitido identificar en la CDK2 varios residuos de aminoácidos, Ile10, Leu83 y Leu134, que son los responsables del 40% de las interacciones entre la qui-



ESQUEMA 1. Representación esquemática del modo de unión de la molécula de ATP en el sitio activo de la CDK2 (Código pdb: 1hck)

Código de colores para los esquemas de este trabajo: Residuos con enlaces de hidrógeno. Residuos con interacciones de van der Waals. Moléculas de agua.

Interacciones con el átomo de magnesio.

Los enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de los aminoácidos se indican con flechas que salen directamente del recuadro en el que se representa el residuo correspondiente, mientras que las interacciones en las que participan átomos de la cadena principal se muestran representando dicho átomo en el exterior del recuadro y haciendo salir de él las flechas que representan los enlaces de hidrógeno.

nasa y los inhibidores. Estos aminoácidos no se conservan en otros tipos de quinasas, por lo que pueden ser los responsables de la especificidad de estos inhibidores frente a las CDKs, y de ahí su gran interés como posibles reguladores del ciclo celular (15). Dos o tres enlaces de hidrógeno están constantemente presentes en la relación entre los inhibidores mencionados y los residuos Glu81 y Leu83 de la CDK2 (21).

Si señalamos los residuos de aminoácidos que están implicados en la unión con la CDK2 podremos observar cuáles son las posiciones de esta quinasa que pueden estar involucradas en la interacción con los diversos inhibidores y proporcionarnos información acerca de su mecanismo de acción y selectividad.

En el presente trabajo de investigación hemos llevado a cabo un estudio teórico de la interacción de la CDK2 y el inhibidor químico butirolactona I. Se ha realizado un análisis detallado de los resultados obtenidos hasta el momento y teniendo en cuenta que el modelo de interacción propuesto se ha realizado manteniendo la proteína rígida (tratamiento habitual para todos los programas de docking). La siguiente aproximación para poder corroborar la calidad del método propuesto, ha sido someter los complejos a una minimización previa utilizando el programa Amber 5.0. Con el fin de evaluar los efectos de la flexibilidad de la proteína y del disolvente en torno al centro activo, se ha llevado a cabo la simulación de dinámica molecular utilizando el campo de fuerzas de Amber.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de los estudios de *docking* hemos tomado como receptor la estructura cristalina de la CDK2 en su complejo con la molécula de ATP (código pdb = *1hck*), que obtuvimos directamente del Banco de Datos de Proteínas de Brookhaven, (22) y de la que extrajimos manualmente la molécula de ATP, dejando libre el centro activo de la proteína para poder introducir en dicho sitio los diferentes ligandos.

Preparación del ligando

La butirolactona I, fue construida mediante el programa de modelización molecular Macromodel (23) y posteriormente fue sometida a un refinamiento de la energía utilizando mecánica molecular y el campo de fuerzas de Amber (24). La butirolactona I fue construida en sus dos posibles configuraciones (*R* y *S*).

Después del refinamiento inicial, las estructuras se sometieron a una búsqueda conformacional utilizando el programa Batchmin y el método Monte Carlo (25), en el que los ángulos de la geometría inicial son relacionados y modificados al azar. Una vez generada la nueva estructura, el propio método la minimiza utilizando el campo de fuerzas seleccionado (en este caso Amber) y analiza el valor de su energía, de forma que si este valor es superior a la energía del conformero anterior en más de 50 KJ (valor elegido) la estructura es rechazada, si la energía es inferior a este margen, la nueva geometría es aceptada y almacenada.

El programa continúa buscando hasta un máximo de 100 conformaciones (valor seleccionado); las coloca en orden de menor a mayor energía y finaliza. El resultado de la búsqueda puede ser entonces analizado.

El cálculo de las cargas puntuales para todos los ligandos se llevó a cabo, utilizando el programa Gaussian94 (26), mediante una optimización de la geometría a nivel RHF/3-21G y un cálculo puntual RHF/6-31G*. Las cargas se derivaron por ajuste al potencial electrostático molecular según el método descrito por Merz-Kollman (24, 27).

El *docking* fue realizado con el programa *autodock*, versión 3.1 (28) y el protocolo llevado a cabo se describe a continuación.

Preparación de la macromolécula

La estructura de la macromolécula, se obtuvo directamente a partir del Banco de Datos de Proteínas de Brookhaven (22). Las moléculas de agua de cristalización, el átomo de magnesio y la molécula de ATP, fueron eliminados utilizando el programa *Sybyl* (29). Los hidrógenos polares se añadieron haciendo uso de una de las aplicacio-

nes de dicho programa. Las cargas puntuales se asignaron utilizando el programa *Sybyl* y cargas tipo «KOLUA» (Kollman United Atom).

Docking

Para el análisis del modo de unión entre el ligando y la CDK2 hemos utilizado el programa *autodock* versión 3.1 (6). De este modo, partiendo de la especificación de la estructura proteica, de la información acerca de la libertad de rotación de los enlaces del sustrato y de una conformación de mínima energía como conformación de partida, llevamos a cabo un docking flexible.

TABLA 2. *Parámetros de autodock*

<i>Parámetros Algoritmo Genético (GA) y Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA)</i>		<i>Valores</i>
<i>ga_pop_size</i>	N.º de individuos en la población	50
<i>ga_num_evals</i>	N.º máximo de evaluaciones de energía	250000
<i>ga_num_generations</i>	N.º del máximo de generaciones	27000
<i>ga_elitism</i>	N.º indiv. máx que sobrevive a la siguiente generación	1
<i>ga_mutation_rate</i>	Porcentaje de mutación	0.02
<i>ga_crossover_rate</i>	Porcentaje de entrecruzamiento	0.80
<i>ga_window_size</i>	N.º de generaciones por escoger al peor individuo	10
<i>ga_cauchy_alpha</i>	Distribución de Cauchy	0
<i>ga_cauchy_beta</i>	Varianza de distribución de Cauchy	1
<i>Parámetros Búsqueda local</i>		
<i>sw_max_its</i>	N.º de iteraciones búsqueda local	300
<i>sw_max_succ</i>	N.º de éxitos consecutivos antes del rho cambiante	4
<i>sw_max_fail</i>	N.º de fracasos consecutivos antes del rho cambiante	4
<i>sw_rho</i>	Tamaño de espacio de la búsqueda local para probar	1.0
<i>sw_lb_rho</i>	Límite más bajo en rho	0.01
<i>ls_search_freq</i>	Probabilidad de realizar búsqueda local en un individuo	0.06

La tabla 2 resume los parámetros utilizados para la realización de docking de los ligandos, para los que se buscaron en cada caso 100 posibles soluciones. Este procedimiento consumió aproximadamente 3 horas en una SGI Octane R12000 para cada una de las moléculas objeto de estudio.

El programa busca hasta un máximo de 100 conformaciones (valor seleccionado); las coloca en orden de menor a mayor energía y finaliza. El resultado de la búsqueda puede ser entonces analizado. Para cada caso se analizaron las cinco orientaciones que proporcionaban una mejor energía de interacción mediante la utilización del programa *Sybyl* (29).

Dinámica molecular

La dinámica molecular (MD), es uno de los métodos empleados para recorrer el espacio conformacional molecular, por lo tanto es una herramienta muy útil en el estudio del movimiento e interacción de estructuras macromoleculares.

El análisis de la trayectoria de la dinámica molecular incluye el seguimiento de los principales cambios estructurales que ocurren en una molécula en función del tiempo, y el promedio de las variaciones de las propiedades físicas durante el tiempo de simulación. Las estructuras obtenidas por dinámica molecular en realidad son una representación estadística del sistema. Las representaciones frente al tiempo de las desviaciones cuadráticas medias (RMDS) de las estructuras con respecto a la inicial, nos dan información sobre la estabilidad del complejo dinámico y de la localización de los estados térmicamente favorecidos en el espacio conformacional.

Los complejos más estables obtenidos mediante el experimento de docking, fueron inicialmente adaptados al campo de fuerzas de amber y sometidos a una minimización progresiva de la energía para lo cual el proceso se dividió en varias etapas: minimización de los hidrógenos, minimización del ligando, minimización del ligando y átomos de las cadenas laterales de la proteína, minimización del ligando y del esqueleto carbonado de la proteína con restricciones posicionales y una constante de fuerza inicial de 32 Kcal/mol y final de 2 Kcal/mol.

Posteriormente se inició el proceso de dinámica molecular, cuyo primer paso consistió en un breve periodo de calentamiento en el cual las velocidades de las partículas se incrementaron a la temperatura deseada de 298 K. Después la simulación busca un punto de equilibrio y se procedió a la relajación de todas las constricciones posicionales y las restricciones que se habían establecido en la fase de calentamiento, así obtuvimos las características dinámicas del complejo en el periodo de tiempo establecido. Con el fin de reducir el número total de átomos y ahorrar tiempo de computación solamente se ha añadido disolvente en una esfera de un radio de 20.0 Å alrededor del centro geométrico del sitio activo de la macromolécula.

El análisis de una trayectoria de dinámica molecular implica el seguimiento de todos los tipos de cambios estructurales que ocurren en la molécula en función del tiempo, así como el comportamiento medio en las propiedades físicas a lo largo del periodo de tiempo de estudio. Para las simulaciones en presencia explícita de disolvente, el tiempo de simulación ha sido de 800 ps. Se obtienen así una serie de estructuras que son una representación estadística de los diferentes estados del sistema. Este tipo de análisis se lleva a cabo utilizando el modulo CARNAL de AMBER (30). CARNAL es un programa de análisis de coordenadas que permite la comparación entre múltiples conjuntos de coordenadas utilizando un lenguaje de comandos relativamente sencillo. Permite realizar mediciones de distancias, análisis de los enlaces de hidrógeno, seleccionar grupos de coordenadas dentro de un conjunto, etc.

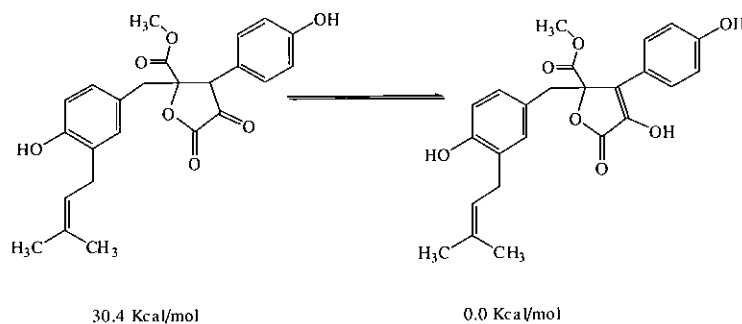
El módulo ANAL de AMBER (30) permite realizar análisis energéticos y estructurales de geometrías estáticas. Una de sus principales y más útiles características es la descomposición de la energía en diferentes grupos de átomos para analizar las energías de interacción entre las diferentes partes de un sistema.

Las gráficas de la desviación estándar cuadrática media (RMSD) en función del tiempo, para las simulaciones de los diferentes complejos, comparadas con la estructura inicial, aportan información adicional acerca de la estabilidad de la estructura dinámica y la localización del equilibrio en una conformación espacial. La estructura inicial sobre la cual se comparan el resto de las conformaciones a lo largo de la dinámica es la resultante del proceso de minimiza-

ción del complejo que a su vez sirve de punto de partida para la dinámica molecular (31).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La butirolactona I contiene en su estructura un centro quiral y según los datos disponibles en la bibliografía, el producto natural presenta actividad óptica ($[\alpha]_D^{15} = +100$) (8). Sin embargo, en el momento en que comenzamos este estudio se desconocía la configuración absoluta de dicho compuesto y por lo tanto no se disponía de datos sobre la actividad biológica de los enantiómeros por separado. Por todo ello iniciamos este trabajo construyendo los dos enantiómeros de butirolactona I. Además, presenta en su estructura un sistema enólico susceptible de encontrarse en equilibrio con su forma cetónica, sin embargo todos los datos de RMN indican un predominio de la primera. Por otro lado, una optimización de la geometría para ambas estructuras a nivel RHF/3-21G, proporciona una diferencia de energía de 30.4 Kcal/mol, por lo que en todos los cálculos posteriores sólo se ha tenido en cuenta la forma enólica.



Como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos, las estructuras de la *R* y *S* butirolactona I fueron construidas con el programa Macromodel y sometidas a un refinamiento inicial utilizando el campo de fuerzas de amber. A continuación ambas estructuras fueron sometidas a una búsqueda conformacional utilizando el método de Monte Carlo. Las conformaciones de más baja energía así obtenidas fueron utilizadas, tras la asignación de los parámetros

correspondientes (cargas puntuales y número de enlaces rotables), como conformaciones de partida para la generación de 100 posibles modos de interacción utilizando el programa *autodock*. Estas 100 posibles soluciones, una vez filtradas y comparadas para eliminar duplicados, fueron ordenadas conforme a su energía de unión.

Debido a la elevada flexibilidad de la butirolactona I (14 ángulos torsionales), prácticamente todas las orientaciones obtenidas fueron diferentes y sólo se descartaron, utilizando un valor de rmsd = 1.0 Å, cuatro en el caso de la *R* butirolactona I y solamente una para la *S* butirolactona I. Se obtuvieron de este modo 93 orientaciones posibles para la *R* butirolactona I y 99 para la *S* butirolactona I.

En ambos casos, el complejo que predice *autodock* es al menos 1Kcal/mol más estable que la siguiente orientación de mínima energía que predice dicho programa. Además un estudio visual de las cinco primeras orientaciones de más baja energía para ambos enantiómeros, puso de manifiesto que los dos complejos propuestos eran aquellos que presentaban una orientación más adecuada y un mayor número de interacciones. Por lo tanto continuamos evaluando solamente las estructuras de los complejos que tanto para la *R* butirolactona I, como para la *S* butirolactona I, proporcionaron una menor energía de interacción.

De acuerdo con estos datos, calculados con el campo de fuerzas que incorpora *autodock* en su última versión para la evaluación de la energía libre de unión, la *S* Butirolactona I (-5.85 Kcal/mol) es capaz de formar un complejo 1.13 Kcal/mol más estable que la *R* butirolactona I (-4.72 Kcal/mol). Sin embargo, tal y como se muestra a continuación, la butirolactona I en configuración *R* es capaz de establecer un mayor número de interacciones por enlace de hidrógeno y de van der Waals.

A continuación se resumen los resultados obtenidos tras la realización del docking. Con el fin de presentar estos resultados de una forma lo más esquemática posible se han utilizado dos tipos de representaciones: por un lado unas figuras realizadas mediante el programa de gráficos moleculares *Sybyl* (29), en los que se ha enfocado en la zona de unión del ligando al receptor y en la que sólo se representan las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, mientras que el resto

de la proteína se representa en cintas. Hemos tratado de colocar todas las figuras de este trabajo en la misma orientación para facilitar su visualización y comparación. Por otro lado, hemos utilizado unos esquemas, que nos muestran de forma simplificada las interacciones de los ligandos con los residuos implicados en la proteína. El código de colores es el mismo que se ha utilizado en el esquema 1.

En las tablas 3 y 4 se indican las interacciones por enlaces de hidrógeno y van der Waals que establecen tanto la molécula de ATP (en su complejo cristalino) como la butirolactona I en sus dos posibles configuraciones en los complejos con la CDK2 obtenidos por docking flexible. En ambas tablas se han incluido todos los residuos con los que interacciona la molécula de ATP en su complejo con la CDK2 y ha sido necesario adicionar otro residuo en la tabla 3 y otros seis residuos en la tabla 4, por dar lugar a interacciones adicionales con el ligando objeto de estudio.

Los datos referentes al complejo CDK2-ATP proceden de la literatura (32). Con el fin de utilizar un criterio homogéneo, hemos utilizado el mismo criterio que utiliza *Sybyl* (29) para considerar una interacción como enlace de hidrógeno. El criterio que por defecto utiliza *Sybyl* corresponde a distancias entre el hidrógeno unido al átomo dador y el átomo aceptor entre 0.8 y 2.8 Å y un ángulo dador-hidrógeno-aceptor con un valor mínimo de 120°. Estos valores están comprendidos entre los más frecuentes para macromoléculas biológicas (33).

R butirolactona I

De las 93 soluciones obtenidas en el presente estudio para la interacción entre la butirolactona I en configuración *R* con la CDK2, aquella que presentó una mejor energía de interacción se representa en la figura 2. Como se puede observar en dicho complejo el ligando ocupa el centro activo de la enzima y es capaz de establecer una serie de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con el receptor.

Los enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals que establece la butirolactona I en configuración *R* con la CDK2 se recogen en las tablas 3 y 4, y se representan de una forma más clara

en el esquema 2. Podemos observar que la *R* butirolactona I, establece dos enlaces de hidrógeno con la Thr14, uno ellos a través del NH de la cadena principal con el O37 del ligando y el otro a través del grupo OH y el H38 de la *R* butirolactona I.

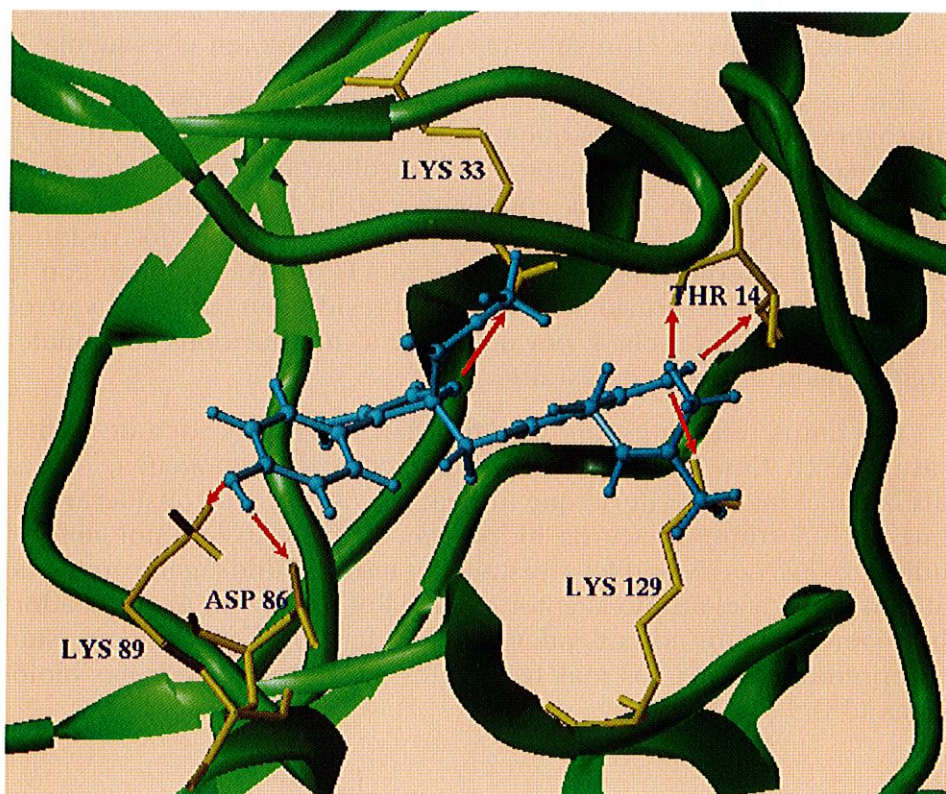
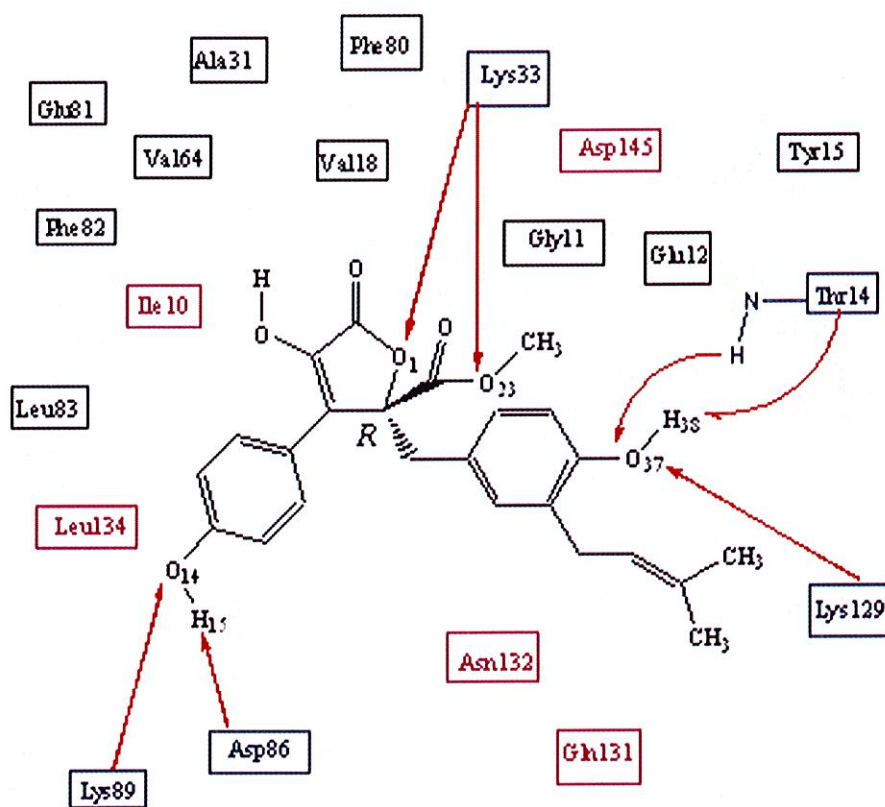


FIGURA 2. Modo de unión propuesto para la *R* butirolactona I dentro del sitio activo de la CDK2.

También forma dos enlaces de hidrógeno con el grupo amino de la Lys33, a través de los oxígenos O1 y O23. Esta interacción fija la conformación que adopta el grupo éster. Los átomos O14 y H15 del ligando establecen dos enlaces de hidrógeno con el grupo amino lateral de la Lys89 y con el carboxilato del Asp86, respectivamente. Además establece interacciones tipo van der Waals con los restos Asp86, Gln131, Lys33, Asn132, Asp145, Lys129, Gly13, Thr14, Leu134, Ile10, Lys89, Thr158 y Thr165. Es importante destacar la



ESQUEMA 2. Representación del modo de unión de la R-butirolactona I en el sitio activo de la CDK2.

interacción con Ile10 y Leu134, pues tal y como se ha expuesto en la introducción, estos aminoácidos no se conservan en otros tipos de quinasas y por tanto parecen ser los responsables de la especificidad que presentan estos compuestos.

Además, entre Thr158 y Thr165 se puede apreciar la existencia de un bolsillo hidrofóbico que permite alojar el resto dimetilvinilo del ligando. Todos los restos a excepción de Gly13, Lys89, Thr158 y Thr165, presentan interacciones con la molécula de ATP en su complejo con esta misma proteína como se puede observar en el esquema 2 y está recogido en las tablas 3 y 4. La butirolactona I en configuración *R* establece interacciones por enlace de hidrógeno con cuatro

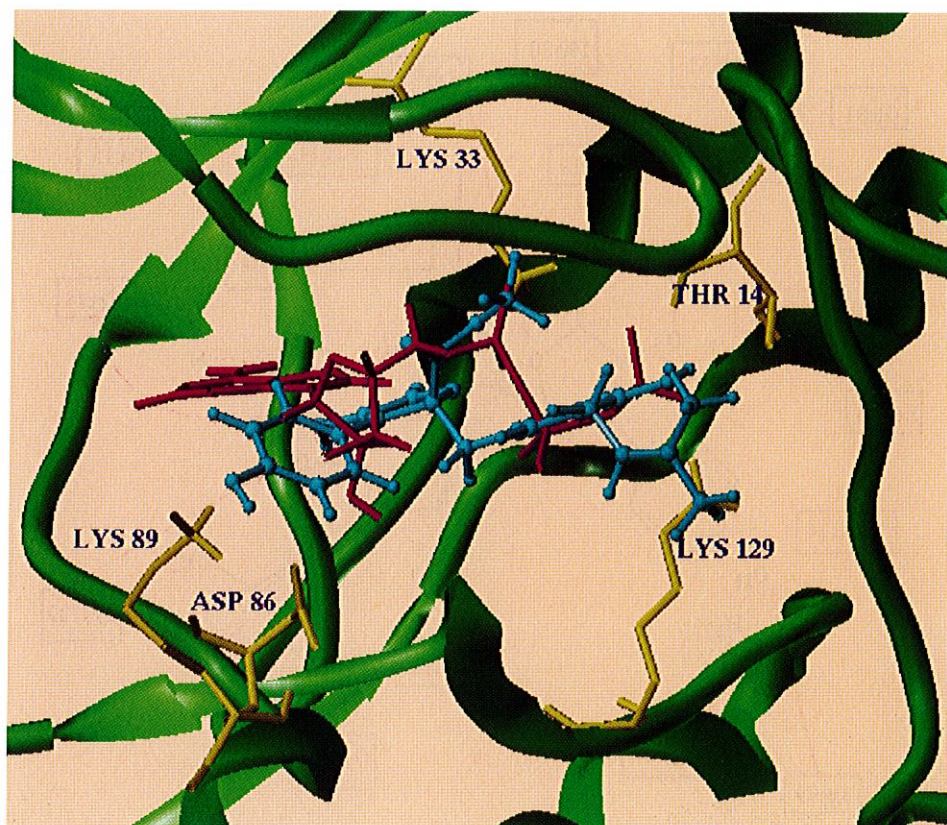


FIGURA 3. Superposición de ATP (magenta) con *R* butirolactona I (azul) en el sitio activo de CDK2.

residuos con los que también lo hace la molécula de ATP (Asp86, Lys33, Lys129 y Thr14). Como se observa en la figura 3, en la que la molécula de ATP (magenta) y la *R* butirolactona I (azul), aparecen superpuestas, ambas moléculas están situadas en la misma zona del centro activo, ocupando zonas similares del receptor, lo que explica que se establezcan interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con los mismos residuos, a excepción del grupo dimetilvinilo.

S butirolactona I

Para la *S* butirolactona I se obtuvieron 99 posibles orientaciones. Aquella que presentó una mejor energía de interacción se representa

en la figura 4. La *S* butirolactona I, establece un menor número de interacciones con los residuos de la CDK2 que los que establece este mismo compuesto en configuración *R*.

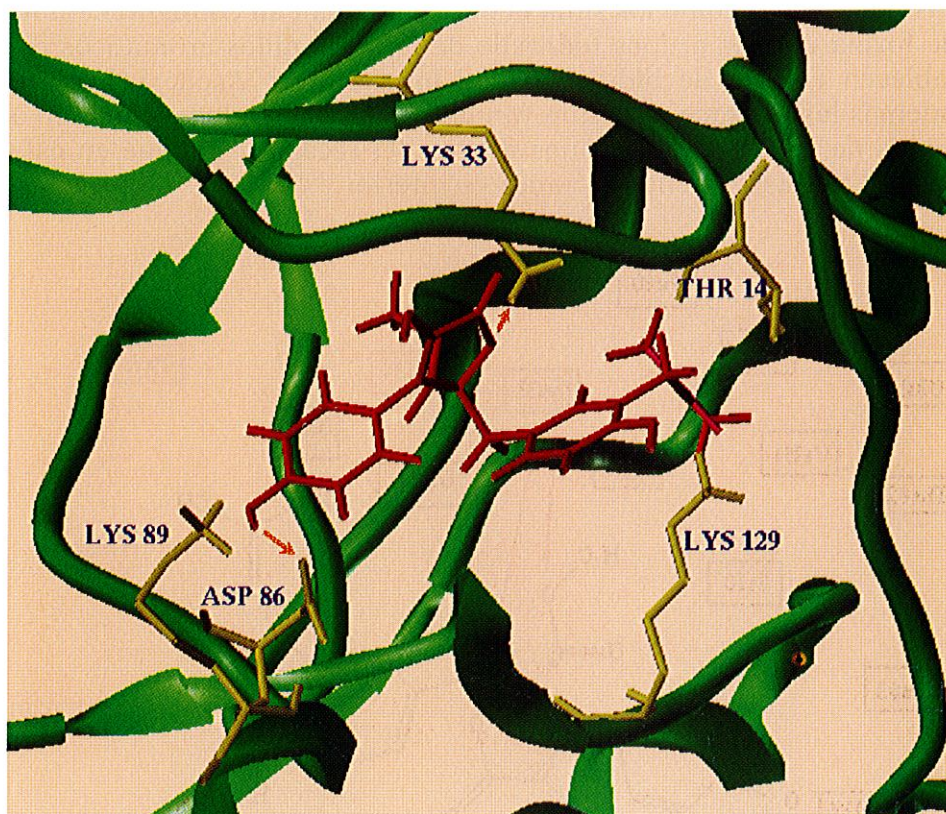


FIGURA 4. *Modo de unión propuesto para la S butirolactona I dentro del sitio activo de la CDK2.*

Como se resume en el esquema 3, la *S* butirolactona I en el complejo que predice el programa *autodock*, establece un enlace de hidrógeno centrado en tres puntos en el que participa el grupo amino lateral de la Lys33 como dador y los oxígenos O1 y O23 del anillo de lactona como aceptores (33).

Curiosamente, la *R* butirolactona I establece este mismo tipo de interacción, a pesar de que el cambio de configuración del centro quiral, obliga a un cambio importante en la conformación del grupo

Así la *S* butirolactona I establece interacciones tipo van der Waals con los residuos Asp86, Gln131, Lys33, Asn132, Asp145, Lys129, Thr14, Val18, Tyr15 y Asp127. En este caso no existe interacción con ninguno de los tres aminoácidos que parecen ser responsables de la selectividad de los inhibidores químicos de CDK2 (Ile10, Leu83 y Leu134).

En la figura 5 se representan las dos soluciones obtenidas para butirolactona I en configuración *R* y *S* en colores azul y rojo, respectivamente. En ambos casos el ligando ocupa la misma zona del receptor, la que originalmente estaba ocupada por la molécula de ATP, por lo que en principio ambos enantiómeros podrían actuar como inhibidores de la CDK2. A pesar de poseer distinta configuración y por lo tanto una distribución espacial diferente para los sustituyentes, la solución de más baja energía que predice el programa *auto*-

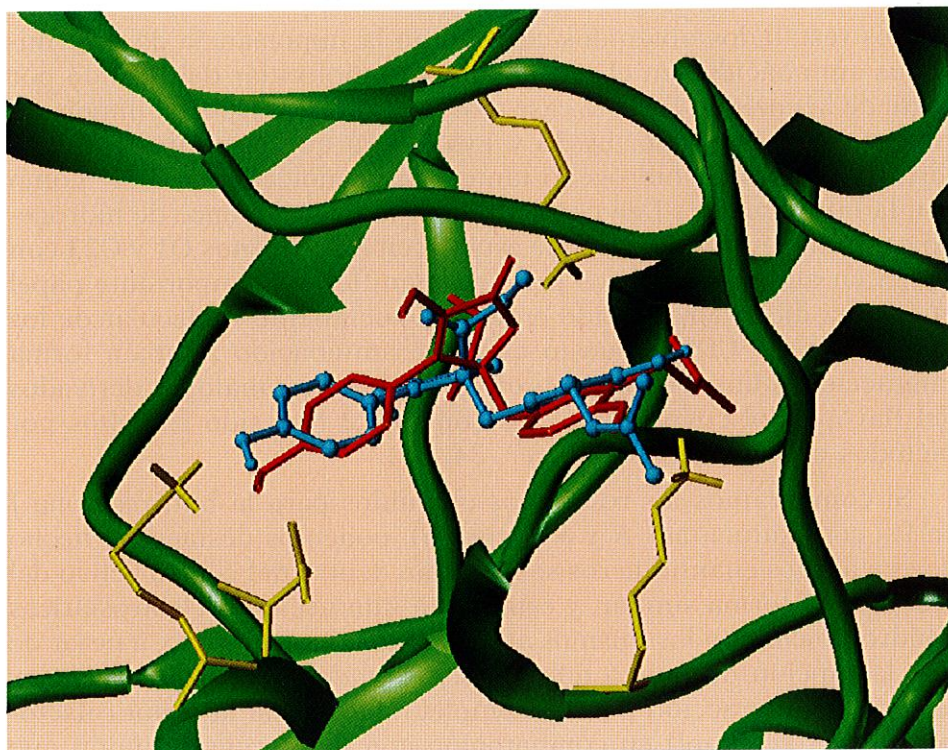


FIGURA 5. Superposición de *R* butirolactona I (azul) con *S* butirolactona I (rojo) en el sitio activo de CDK2.

dock sitúa a ambos enantiómeros en zonas casi equivalentes, de forma que los dos sistemas aromáticos (fenilo y bencilo) se sitúan en orientaciones prácticamente superponibles, estableciendo interacciones a través de los OH fenólicos por enlace de hidrógeno con los mismos aminoácidos dentro del centro activo de la CDK2.

Sin embargo, el grupo dimetilvinilo no se sitúa exactamente en la misma zona, a pesar de que un giro a través del enlace bencílico podría permitir una localización idéntica en ambos compuestos. En este caso, parece indicar que la interacción más relevante es la que establece el grupo hidroxilo en posición 4 del anillo bencílico con el resto Lys129. El sistema dimetilvinilo en el complejo que forma la *R* butirolactona I con la CDK2, está alojado en un entorno hidrofóbico constituido por los residuos Thr158 y Thr165, mientras que en el complejo formado por la *S* butirolactona I, dicho radical no puede alojarse en dicho entorno hidrofóbico.

Los resultados obtenidos corroboran la importancia de determinados aminoácidos en el reconocimiento molecular del ligando por parte de la enzima. En este caso, parecen revestir especial importancia los residuos Asp86, Lys33 y Lys129, ya que estos tres residuos forman enlaces de hidrógeno tanto con la molécula de ATP, como con la butirolactona I en configuración *R* y *S*. El enlace de hidrógeno centrado en tres puntos que establecen los oxígenos O1 y O23 con Lys33 en ambos complejos pone de manifiesto el importante papel que juega dicho aminoácido en el reconocimiento molecular de los inhibidores de CDK2, puesto que este aminoácido también forma interacciones importantes con otros inhibidores análogos derivados del flavopiridol cuyos complejos con CDK2 han sido resueltos por métodos cristalográficos (10, 17, 34, 35).

Si comparamos los resultados obtenidos para la butirolactona I en las configuraciones *R* y *S* (figura 5), podemos destacar el hecho de que ambos enantiómeros se localizan dentro del centro activo del receptor de forma similar, y establecen interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con los mismos aminoácidos. Sin embargo, a pesar de que la función de tanteo que emplea *autodock* predice una mejor energía de interacción para el complejo que forma la *S* butirolactona I (-5.85 kcal/mol) en comparación con la energía de unión que predice para el complejo que forma el otro enantiómero (-4.72 Kcal/mol), los resultados del análisis nos indican que en este último com-

plejo el número total de interacciones es superior. Además, entre estas interacciones hay que resaltar las que se establecen con Ile10 y Leu134, que no tienen lugar en el complejo formado con el enantiómero *S*. Estos dos aminoácidos, junto con Leu83, son los responsables del 40% de las interacciones entre la CDK2 y los inhibidores químicos descritos en la bibliografía y el hecho de que estos residuos no se conserven en otro tipo de quinasas hace pensar que sean los responsables de la selectividad que presentan todos estos compuestos (15). Un reciente estudio sobre metabolitos de la butirolactona I en la que se asigna la configuración absoluta de uno de estos metabolitos, ha permitido deducir que la configuración del compuesto natural es la *R* (36).

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en nuestro estudio, pero no descartan la posibilidad de que ambos enantiómeros sean activos.

TABLA 3. Enlaces de hidrógeno que establecen los residuos de la CDK2 con los átomos de los diferentes ligandos: ATP (estructura cristalina) y *R* y *S* butirolactona I. Distancias en Å

Residuo	ATP			<i>R</i> butirolactona I			<i>S</i> butirolactona I		
	A. R	A. L	D	A. R	A. L	D	A. R	A. L	D
Glu81	O=C	H-N ₆	2.88						
Leu83	H-N	N ₁	3.44						
Asp86	O=C	H-O ₂	3.19	COO ⁻	H ₁₅	1.91	COO ⁻	H ₁₅	1.84
	O=C	H-O ₃	3.02						
Gln131	O=C	H-O ₂	2.53						
Lys33	H-N	O _{α1}	2.92	H ₃ N ⁺	O ₂₃	1.81	H ₃ N ⁺	O ₁	1.71
	H-N	O _{α2}	3.02	H ₃ N ⁺	O ₁	2.55	H ₃ N ⁺	O ₂₃	2.23
Asn132	H-N	O _{β2}	2.64						
	H-N	O _{γ1}	2.89						
Asp145	H-N	O _{γ1}	2.84						
Lys129	H-N	O _{γ3}	3.27	H ₃ N ⁺	O ₃₇	2.15	H ₃ N ⁺	O ₃₇	2.32
	H-N	O _{β3}	2.91						
Thr14	H-N	O _{γ3}	2.78	H-O	H ₃₈	2.42			
	H-O	O _{γ2}	2.83	H-N	O ₃₇	1.96			
Lys89				H ₃ N ⁺	O ₁₄	2.57			

A. R: Átomo residuo; A. L: Átomo ligando; D: Distancia.

Por otro lado, es bien sabido que uno de los principales problemas que presentan los diferentes métodos de docking que se encuentran actualmente disponibles, es la incorporación de un método de tanteo que permita evaluar y ordenar las orientaciones obtenidas. Existen una serie de métodos bien establecidos para el cálculo de energías libres de unión como son AMBER, CHARM, DISCOVER y GROMOS (28). Sin embargo, este tipo de métodos requiere generalmente un elevado coste computacional y además no suelen ser muy apropiados para ordenar energías libres de unión de compuestos que se diferencian en más de unos pocos átomos. Por ello, la mayoría de métodos de docking incorporan relaciones empíricas para poder relacionar la energía libre de unión y la estructura molecular.

TABLA 4. *Interacciones por enlace de hidrógeno y van der Waals presentes en los complejos formados entre la CDK2 y: el ATP (estructura cristalina), R y S butirolactona I (docking flexible). +, - interacción presente o ausente, respectivamente.*

CDK2*	ATP		R butirolactona I		S butirolactona I	
	E. H	V. W	E. H	V. W	E. H	V. W
Glu81	+	+	-	-	-	-
Leu83	+	+	-	-	-	-
Asp86	+	+	+	+	+	+
Gln131	+	+	-	+	-	+
Lys33	+	+	+	+	+	+
Asn132	+	+	-	+	-	+
Asp145	+	+	-	+	-	+
Lys129	+	+	+	+	+	+
Thr14	+	+	+	+	-	+
Val18	-	+	-	-	-	+
Glu12	-	+	-	-	-	-
Gly11	-	+	-	-	-	-
Leu134	-	+	-	+	-	-
Phe80	-	+	-	-	-	-
Val64	-	+	-	-	-	-
Ala31	-	+	-	-	-	-
Phe82	-	+	-	-	-	-
Ile10	-	+	-	+	-	-
Lys89	-	-	+	+	-	-
Gly13	-	-	-	+	-	-
Thr158	-	-	-	+	-	-
Thr165	-	-	-	+	-	-
Tyr15	-	-	-	-	-	+
Asp127	-	-	-	-	-	+

*CDK2: Residuo en CDK2; E. H: Enlace de hidrógeno; V. W: Van der Waals.

La última versión de *autodock* incorpora este tipo de función de tanteo que ha sido calibrada con 30 complejos proteína-ligando de estructura conocida. Sin embargo, parece evidente que este tipo de función continúa siendo un factor limitante a la hora de valorar la estabilidad relativa de los complejos, especialmente si la diferencia en energía es de tan sólo 1.13 Kcal/mol.

Además como se ha indicado en la introducción todos estos métodos hacen un tratamiento rígido del receptor.

Por todo esto, y como continuación de este trabajo, hemos iniciado la realización de simulaciones de dinámica molecular para ambos complejos, que junto con la incorporación explícita del disolvente en la zona del centro activo, nos permitirán aportar más información referente a la estructura y a la estabilidad relativa de ambos complejos.

Hasta el momento la información obtenida nos ha permitido estudiar una serie de estructuras más sencillas, que han sido sintetizadas en nuestro laboratorio. En estas síntesis hemos obtenido los compuestos en su forma racémica, pues de acuerdo con los resultados expuestos en este trabajo, en principio ambos enantiómeros son capaces de formar complejos estables con la CDK2 y por lo tanto actuar como inhibidores reversibles.

Tras los resultados obtenidos al realizar el docking, pasamos a la realización de las simulaciones de dinámica molecular de la *R* y *S* butirolactona I. Se sometieron los complejos CDK2-*R* butirolactona I y CDK2-*S* butirolactona I a minimizaciones en vacío tal y como se ha descrito de forma general en el apartado de Materiales y Métodos, y seguidamente se sometieron a 800 ps de dinámica molecular en presencia explícita del disolvente alrededor del centro activo.

A continuación se recogen los resultados de las simulaciones para estos dos complejos, CDK2-*R* butirolactona I y CDK2-*S* butirolactona I:

El análisis de la desviación cuadrática estándar (RMSD) a lo largo del tiempo de simulación con respecto a la estructura inicial del complejo una vez refinada, se representa en la figura 6.

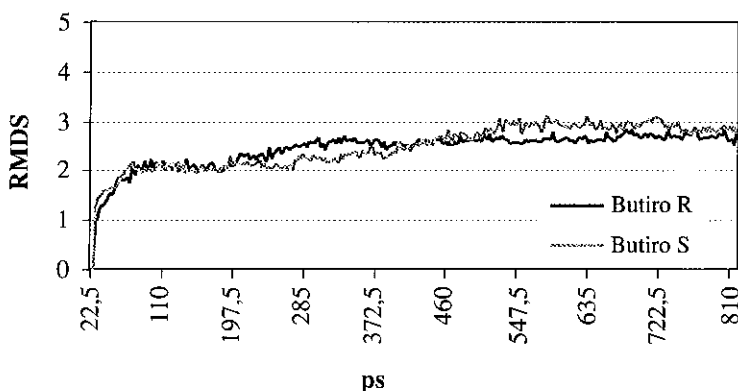


FIGURA 6. Evolución del RMSD a lo largo de la dinámica molecular para el complejo CDK2- R butirolactona I y CDK2- S butirolactona I.

En dicho gráfico, se puede apreciar que dicho parámetro se mantiene estable para ambos complejos a lo largo del tiempo de simulación, lo que indica que no se producen cambios conformacionales importantes y que por tanto los complejos se encuentran en un estado de equilibrio.

La monitorización de varias distancias a lo largo del tiempo de muestreo de las simulaciones de dinámica molecular, puso de manifiesto la formación de varios enlaces de hidrógeno en ambos complejos.

En la figura 7 y 8 se representan los valores de las distancias en Å a lo largo del tiempo de simulación. Estos datos demuestran la importancia de determinados aminoácidos en el reconocimiento molecular del ligando por parte de la CDK2. Además, se establecen una serie de enlaces de hidrógeno que se mantienen a lo largo del tiempo de simulación con la Thr14 y Asp86 para el complejo CDK2- R butirolactona I y con Asp86 para el complejo CDK2- S butirolactona I, mientras que otros solamente son estables en algunos puntos de la dinámica como Lys33, Lys89 y Lys129 para el complejo CDK2- R butirolactona I y Lys33 y Lys129 para el complejo CDK2- S butirolactona I.

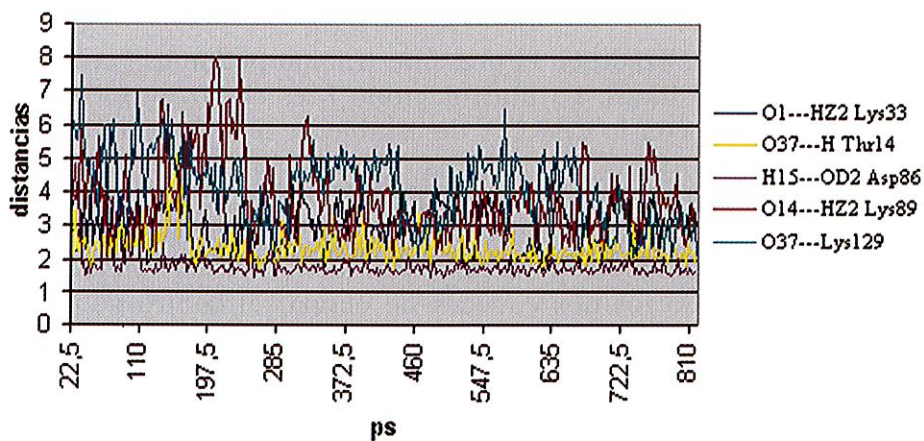


FIGURA 7. Evolución de las distancias (Å) a lo largo del tiempo de simulación del complejo CDK2-R butirolactona I.

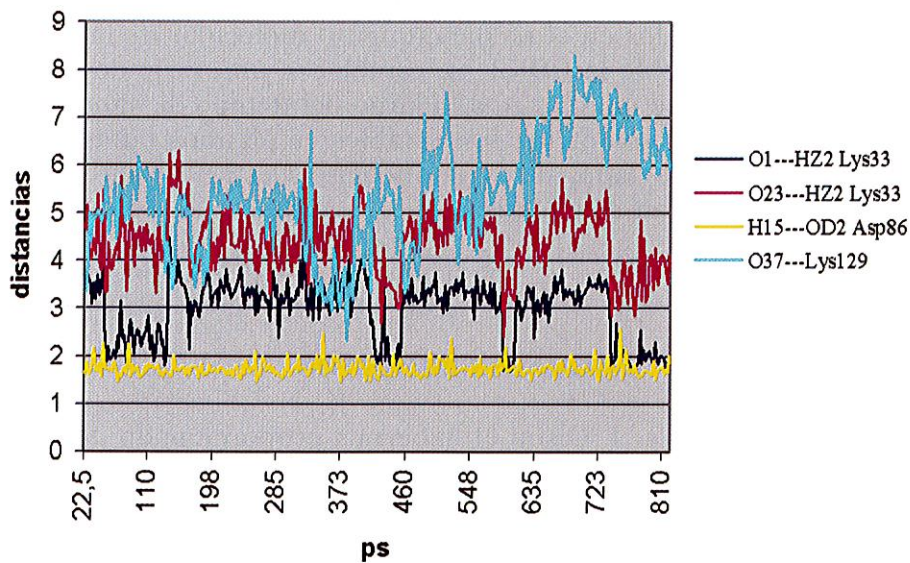


FIGURA 8. Evolución de las distancias (Å) a lo largo del tiempo de simulación del complejo CDK2-S butirolactona I.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado en el presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones: La butirolactona I, es capaz de formar un complejo estable con la CDK2, y de establecer una serie de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con dicho receptor, lo que explica su actividad biológica. Los resultados de las simulaciones llevadas a cabo para la butirolactona I tanto en configuración *R*, como *S*, nos permiten predecir que ambos isómeros interaccionan de forma similar, siendo los dos capaces de ocupar el centro activo del ATP y por tanto actuar como inhibidores competitivos. Sin embargo, en el complejo formado entre la *R* butirolactona I y la CDK2 se establecen un mayor número de interacciones en las que están involucrados aminoácidos que no se encuentran conservados en otras quinasas, y en los que parece estar el origen de la selectividad de este tipo de compuestos. Con el fin de evaluar los efectos tanto de la flexibilidad de la enzima, como del disolvente en torno al centro activo, se han llevado a cabo simulaciones de dinámica molecular utilizando el campo de fuerzas de amber. Los resultados de estas simulaciones ponen de nuevo de manifiesto la importancia de determinados aminoácidos en el reconocimiento molecular de la butirolactona I por parte de la CDK2. Se establecen una serie de enlaces de hidrógeno que se mantienen a lo largo del tiempo de simulación, mientras que otros solamente son estables en algunos puntos de la dinámica. Por otro lado, otros aminoácidos están implicados en interacciones de Van der Waals.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a A. J. Olson el habernos proporcionado de forma gratuita el programa AUTODOCK. Esta investigación recibió apoyo financiero de la Universidad San Pablo-CEU (ref de Concesión: USP-4/01 U.S.P.) y de la Dirección General de Estudios Superiores (Grant. No. PB98-0055). Agradecemos al CIEMAT la concesión de tiempo de cálculo en sus ordenadores.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GAGO, F. (1994) In *Diseño de Medicamentos*; Farmaindustria, Ed.: España.
- (2) CRAM, D. J. (1988) *Science*, *240*, 760-767.
- (3) KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. I.; LANGIDGE, R.; FERRIN, T. E. (1982) *J. Mol. Biol.* *161*, 269-288.
- (4) DEAN, P. M.; JOLLES, G.; NEWTON, C. G. (1995) In *New Perspectives in Drug Design*; Kuntz, I. D., Meng, E. C., Shoichet, B. K., Eds.; Academic Press.: London.
- (5) LEACH, A. R.; KUNTZ, I. D. (1992) *J. Comp. Chem.* *13*, 730-748.
- (6) MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; HALLIDAY, S.; BELEW, R.; OLSON, A. J. (1999) *AUTODOCK: Automated docking of flexible ligands to receptors, version 3.0.3*.
- (7) KITAGAWA, M.; OKABE, T.; OGINO, H.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI-TAKAHASHI, I.; KOKUBO, T.; HIGASHI, H.; SAITOH, S.; TAYA, Y.; YASUDA, H.; OHBA, Y.; NISHIMURA, S.; TANAKA, N.; OKUYAMA, A. (1993) *Oncogene*, *8*, 2425-2432.
- (8) KIRIYAMA, N.; NITTA, K.; SAKAGUCHI, Y.; TAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, Y. (1977) *Chem. Pharm. Bull.*, *25*, 2593-2601.
- (9) KITAGAWA, M.; HIGASHI, H.; SUZUKI TAKAHASHI, I.; OKABE, T.; OGINO, H.; TAYA, Y.; NISHIMURA, S.; OKUYAMA, A. (1994) *Oncogene*, *9*, 2549-2557.
- (10) SIELECKI, T. M.; BOYLAN, J. F.; BENFIELD, P. A.; TRAINOR, G. L. (2000) *J. Med. Chem.*, *43*, 1-18.
- (11) NISHIO, K.; ISHIDA, T.; ARIOKA, H.; KUROKAWA, H.; FUKUOKA, K.; NOMOTO, T.; FUKUMOTO, H.; YOKOTE, H.; SAJIO, N. (1996) *Anticancer Res.*, *16*, 3387-3396.
- (12) HIDA, D.; NAKATA, K.; SHIMA, Y.; MIGITA, K.; NAKAO, K.; KATO, Y.; ISHII, N.; EGUCHI, K. (1998) *Anticancer Res.*, *18*, 4317-4322.
- (13) STAHURA, F. L.; XUE, L.; GODDEN, J. W.; BAJORATH, J. (1999) *J. Mol. Graph. Model.*, *17*, 1-9.
- (14) DE BONDT, H. L.; ROSENBLATT, J.; JANCARIK, J.; JONES, H. D.; MORGAN, D. O.; KIM, S.-H. (1993) *Nature*, *363*, 595-602.
- (15) SCHULZE-GAHMEN, U.; BRANDSEN, J.; JONES, H. D.; MORGAN, D. O.; MEIJER, L.; VESELY, J.; KIM, S. H. (1995) *Proteins*, *22*, 378-391.
- (16) DE AZEVEDO, W. F.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; HAVLICEK, L.; STRNAD, M.; KIM, S. H. (1997) *Eur. J. Biochem.*, *243*, 518-526.
- (17) DE AZEVEDO, W. F.; MUELLER-DIECKMANN, H. J.; SCHULZE-GAHMEN, U.; WORLAND, P. J.; SAUSVILLE, E.; KIM, S. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *93*, 2735-2740.
- (18) LAWRIE, A. M.; NOBLE, M. E. M.; TUNNAH, P.; BROWN, N. R.; JOHNSON, N.; ENDICOTT, J. A. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, *4*, 796-801.
- (19) GRAY, N. S.; WODICKA, L.; THUNNISSEN, A.-M. W. H.; NORMAN, T. C.; KWON, S.; ESPINOZA, F. H.; MORGAN, D. O.; BARNES, G.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; KIM, S. H.; LOCKHART, D. J.; SCHULTZ, P. G. (1998) *Science*, *281*, 533-538.
- (20) MEIJER, L. (1995) *Prog. Cell. Cycle Res.*, *1*, 351-363.
- (21) MEIJER, L.; LECLERC, S.; LEOST, M. (1999) *Pharmacology & Therapeutics*, *82*, 279-284.

- (22) BERMAN, H. M.; WESTBROOK; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242.
- (23) MACROMODEL version 5.5. (1996) *MacroModel Interactive Modeling System*. Department of Chemistry, Columbia University. New York. N.Y.
- (24) SINGH, U. C.; KOLLMAN, P. A. (1984) *J. Comp. Chem.*, 5, 129.
- (25) CHANG, G.; GUIDA, W. C.; STILL, W. C. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 4379.
- (26) GAUSSIAN 94, REVISION C.3. POPLE, J. A. ET AL. GAUSSIAN INC.; PITTSBURGH, P. A. (1995) Agradecemos al CIEMAT la concesión de tiempo de computación y la utilización de este programa.
- (27) BESLER, B. H.; MERTZ, K. M. J.; KOLLMAN, P. A. (1990) *J. Comp. Chem.*, 11, 431.
- (28) MORRIS, G. M. (1998) *J. Comp. Chem.*, 19, 1639-1662.
- (29) SYBYL version 6.6. Tripos. 1699 South Hanley Road, St. Louis, Missouri 63144. <http://www.tripos.com> 1999.
- (30) AMBER 5. CASE, D. A.; PEARLMAN, D. A.; CALDWELL, J. W.; CHEATHAM III, T. E.; ROSS, W. S.; SIMMERLING, C. L.; DARDEN, T. A.; MERZ, K. M.; STANTON, R. V.; CHENG, A. L.; VICENT, J. J.; CROWLY, M.; FERGUSON, D. M.; RADMER, R. J.; SEIBEL, G. L.; SINGH, U. C.; WEINER, P. K.; KOLLMAN, P. A.
- (31) JEFFREY, G. A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: New York.
- (32) KIM, S.; SCHULZE-GAHMEN, U.; BRANDSEN, J.; DE AZEVEDO JUNIOR, W. (1996) *Prog. Cell. Cycle. Res.*, 2, 137-145.
- (33) JEFFREY, G. A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: New York.
- (34) PARKER, B. W.; SENDEROWICZ, A. M.; NIEVES-NEIRA, W.; POMMIER, Y.; SAUSVILLE, E. A. (1996) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 37, 398.
- (35) BIBLE, K. C.; KAUFMANN, S. H. (1996) *Cancer Res.*, 56, 4856-4861.
- (36) RAO, K. V.; SADIUKHAN, A. K.; VEERENDER, M.; RAVIKUMAR, V.; MOHAN, E. V. S.; DHANVANTRI, S. D.; SITARAMKUMAR, M.; BABU, J. M.; VYAS, K.; REDDY, G. O. (2000) *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 559-562.