

**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN SILICO* DE INHIBIDORES EN LA
FOSFODIESTERASA 4D (PDE4D)**

ELIANA PATRICIA VELÁSQUEZ MEJÍA

**Tesis de Grado presentada para optar al título de
Magíster en Ciencias – Biotecnología**

Director

PABLO ANDRÉS GUTIÉRREZ SÁNCHEZ. PhD

Codirector

NEIL ALDRIN VÁSQUEZ ARAQUE. MSc

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

2012

Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín a través de la vicerrectora de investigación y del Sistema de información de la investigación (Hermes) En la convocatoria nacional de investigación 2009 (código del proyecto 9712). Agradezco a los integrantes del Laboratorio de Microbiología Industrial, del Laboratorio Ciencia de los Alimentos y del Laboratorio Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	11
2	MARCO TEÓRICO	14
2.1	GENERALIDADES	14
2.1.1	CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES	14
2.1.2	CLASIFICACION Y NOMENCLATURA	15
2.1.3	IMPORTANCIA CLINICA	16
2.1.4	CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES	16
2.2	FOSFODIESTERASA TIPO 4	17
2.2.1	IMPORTANCIA	17
2.2.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES	18
2.2.3	UBICACIÓN FISIOLÓGICA	18
2.2.4	FOSFODIESTERASA TIPO 4 ISOTIPO D	20
2.2.4.1	CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS	20
2.2.4.1	CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES	20
2.3	INHIBIDORES DE PDE	24
2.3.2	INHIBIDOR DE PRIMERA GENERACIÓN: ROLIPRAM	24
2.3.3	INHIBIDORES DE SEGUNDA GENERACIÓN	25
2.3.4	INHIBIDORES DE TERCERA GENERACIÓN	26
3	BIBLIOGRAFÍA	29

4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GENERAL:	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	39
5	CAPITULO 1 : GENERACIÓN DE UN FARMACÓFORO Y CLASIFICACION DE DROGAS UTILIANDO COMPLEJOS PROTEINA-LIGANDO	40
6	CAPITULO 2: ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE DOCKING FLEXIBLE PARA FOSFODIESTERASA 4D	58
7	CAPITULO 3 – EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL IC ₅₀ LOS INHIBIDORES DE PDE4D ROLIPRAM, YM-976 Y MERCK-524717	95
8	CAPITULO 4 – CLONACIÓN DE LA PDE4D	112
8.1	CLONACIÓN DE PDE4D EN <i>E.coli</i> :	112
8.2	CLONACIÓN DE PDE4D EN <i>P.pastoris</i>	121
9	CONCLUSION	132
10	ANEXO 2: RUTINAS DE ARTÍCULOS 1 Y 2	133
10.1	RUTINAS ARTÍCULO 1	133
10.2	RUTINAS ARTÍCULO 2	141

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de hidrólisis del AMPc y GMPc mediada por fosfodiesterasas.	14
Figura 2. Estructura de los once tipos de fosfodiesterasas.	15
Figura 3. Localización celular de las fosfodiesterasas en la unidad folicular.	18
Figura 4. Variantes por <i>splicing</i> de la PDE-4D con sus diferencias estructurales en la región N-terminal o UCR.	19
Figura 5. Estructura tridimensional de los diferentes isotipos de la PDE4.	20
Figura 6. AMPc en el bolsillo catalítico de la PDE4D, con los aminoácidos que conforman el sitio activo.	21
Figura 7. Alineamiento estructural de la PDE 4D con la PDE4A (a), PDE4B (b), PDE4C (c).	22
Figura 8. Estructura del rolipram y sus interacciones con el sitio activo de PDE4D.	22
Figura 9. Estructura de los inhibidores de segunda generación roflumilast y cilomilast.	23
Figura 10. Inhibidores de tercera generación de PDE4.	24
Figura 11. Esquema de la prueba de fluorescencia.	91
Figura 12. Estructura y espectros de emisión y excitación del fluoróforo FAM.	92
Figura 13. Resultados de la prueba de actividad para el complejo PDE4D/FAM-cAMP.	93
Figura 14. Resultados de la Prueba de Fluorescencia con Rolipram, MERCK-524717 y YM-976.	94
Figura 15. Relación del porcentaje de Inhibición y la concentración del inhibidor Rolipram.	96

Figura 16. Relación del porcentaje de Inhibición y la concentración del inhibidor MERCK - 524717.	97
Figura 17. Relación del porcentaje de Inhibición y la concentración del inhibidor YM-976.	98
Figura 18. Regresión lineal de los valores de IC ₅₀ experimentales y los reportados en literatura.	99
Figura 19. Predicciones de Docking para YM-976 y MERCK-524717.	100
Figura 20. Farmacóforo para PDE4D y superposición de compuestos.	101
Figura 21. Relación entre los valores del farmacóforo y los IC ₅₀ para inhibidores de PDE4D.	102
Figura 22. Regresión lineal de los valores de IC ₅₀ predichos y los reportados en literatura.	104
Figura 23. cDNA comercial de PDE4D con características estructurales, según sus aminoácidos.	107
Figura 24. Mapa del vector de clonación pET15b.	108
Figura 25. Diagrama del proceso general de clonación en pET15b.	109
Figura 26. Gel del producto de PCR de PDE4D.	110
Figura 27. Gel del producto de PCR de PDE4D purificado.	111
Figura 28. Gel del plásmido pET15b purificado.	111
Figura 29. Gel de ladigestión con <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> .	111
Figura 30. Gel de verificación del inserto de PDE4D a partir de las colonias obtenidas de la transformación en DH5 α .	113

Figura 31. Electroferograma de la región correspondiente a la secuencia codificante de la proteína PDE4D.	114
Figura 32. Resultados obtenidos a partir del BLAST de la PDE4D.	114
Figura 33. Sitio de policlonación del vector pET15b con la secuencia codificante de la PDE4D.	115
Figura 34. Gel del perfil de expresión de la proteína recombinante PDE4D a partir de las colonias obtenidas de la transformación en BL21.	115
Figura 35. Gel de proteínas de cada uno de los pasos de purificación por columna de afinidad.	115
Figura 36. Mapa del vector de clonación pPICZ α -A.	117
Figura 37. Diagrama del proceso general de clonación en pPICZ α -A.	118
Figura 38. Gel del producto de la PCR de PDE4D.	119
Figura 39. Gel del producto de PCR de PDE4D purificado.	120
Figura 40. Gen del plásmido pPICZ α -A purificado.	120
Figura 41. Gel de los resultado de la digestión con <i>XbaI</i> y <i>EcoRI</i> .	120
Figura 42. Gel de verificación del inserto de PDE4D a partir de las colonias obtenidas de la transformación en DH5 α .	12
Figura 43. Electroferograma de la región correspondiente a la secuencia codificante de la proteína PDE4D.	123
Figura 44. Resultados obtenidos a partir del BLAST de la PDE4D.	123

Figura 45. Sitio de policlونación del vector pPICZ α -A con la secuencia codificante de la PDE4D.	124
Figura 46. Gel de verificación del inserto de PDE4D a partir de las colonias obtenidas de la transformación en DH5 α .	125
Figura 47. Gel del perfil de expresión de la proteína recombinante PDE4D a partir de las colonias obtenidas de la transformación en KM71H.	126
Figura 48. Diagrama de flujo del orden de las rutinas para hallar los RMSD.	135
Figura 49. Diagrama de flujo del orden de las rutinas para obtener trayectoria de aguas y R ² .	138

RESUMEN

La PDE4D es una enzima de gran importancia debido a su amplia distribución en diferentes tejidos de mamíferos, ya que se expresa en el sistema inmune, nervioso y endocrino. Esta enzima está involucrada en gran cantidad de enfermedades, por esto su inhibición es de gran utilidad. Sin embargo, debido a la inespecificidad de los inhibidores existentes y a la dualidad en el posicionamiento en el sitio activo de la enzima, estos compuestos presentan efectos adversos que impiden su uso generalizado a nivel médico. Con el fin de reducir los efectos secundarios de estos compuestos se han creado inhibidores de tercera generación, diseñados a partir de las características del bolsillo catalítico de las fosfodiesterasas. El desarrollo de nuevos inhibidores es un proceso costoso y para el cual, es de gran utilidad contar con herramientas computacionales que permitan predecir la actividad antes de comenzar la fase de síntesis y evaluación experimental. En este trabajo se desarrolló un modelo computacional que combina *Docking* y modelación de farmacóforos para la predicción de la actividad de inhibidores potenciales de la fosfodiesterasa 4D. Adicionalmente se desarrolló una prueba *in vitro* para la medición experimental de los IC₅₀ para inhibidores de PDE4D.

A partir de estas pruebas se obtuvieron como resultados el diseño de un farmacóforo para ser usado en la elaboración racional de nuevos inhibidores de fosfodiesterasas. Además este farmacóforo se usó para verificar los resultados de docking obtenidos para los inhibidores YM-976 y MERCK-524717, lo que nos permitió demostrar que las aguas seleccionadas en la cavidad catalítica para llevar a cabo el docking fueron las adecuadas para obtener valores de IC₅₀ acordes con los reportados en la literatura. Por otro lado la prueba *in vitro* para medir experimentalmente los IC₅₀ de los inhibidores YM-976, MERCK-524717 y Rolipram dieron como resultado valores congruentes con los reportados en la literatura. Además con el fin de disponer de enzima PDE4D recombinante para futuras pruebas se realizó un proceso de clonación tanto en sistema procarionte (*E.coli*) como

eucariote (*P.pastoris*) donde se logró la producción de la PDE4D para en estudios posteriores ser purificada y evaluar su actividad.

1 INTRODUCCIÓN

Las fosfodiesterasas (PDE) pertenecen a una gran familia enzimática, que según el sustrato que hidrolizan se pueden clasificar en tres grupos, aquellas que catalizan el 3'-5' adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en 5'-AMP (EC: 3.1.4.53), las que hidrolizan el 3'-5' guanosín monofosfato cíclico (GMPc) a 5'-GMP (EC: 3.1.4.17) y por último aquellas enzimas que presentan un efecto dual hidrolizando tanto el AMPc como el GMPc (EC: 3.1.4.35). El proceso de catálisis ocurre al hidrolizar el enlace 3' fosfodiéster de uno de los nucleótidos cíclicos AMPc o GMPc dando origen a las moléculas 5'-AMP o 5'-GMP (Yuasa *et al.*, 2001; Soderling *et al.*, 2000). Estas enzimas también pueden clasificarse en once tipos que, a su vez, se subdividen en isotipos y variantes por *splicing* (Lugnier, 2006). Estos nucleótidos cíclicos actúan como segundos mensajeros en la señalización celular y el AMPc específicamente está involucrado en el efecto intracelular de hormonas, neurotransmisores (Habener, 2001) y activación de linfocitos T (Ledbetter *et al.*, 1986; Hirose *et al.*, 2008)

A uno de estos grupos corresponde la fosfodiesterasa 4 (PDE4), la cual se encarga de hidrolizar el enlace 3'-fosfodiéster presente en el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), dando origen a la molécula 5'-AMP disminuyendo los niveles de este nucleótido cíclico (Yuasa *et al.*, 2001; Soderling *et al.*, 2000), que actúa como segundo mensajero en el proceso de señalización celular en los sistemas nervioso, inmune y endocrino. La fosfodiesterasa 4 presenta cuatro isotipos diferentes, nombrados con las letras A, B, C y D (Wang *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 1996). Debido a las funciones que desempeñan las PDE4 y su importancia a nivel fisiológico, se han convertido en blanco de inhibición para tratar enfermedades del sistema inmune y nervioso; y como alternativa para mejorar la respuesta a gonadotropinas en la inducción de la ovulación. Lo anterior se evidencia en las 1135 patentes estadounidenses reportadas en la base de datos *freepatentsonline* (<http://www.freepatentsonline.com>), que presentan al rolipram ((*RS*)-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxi-

fenil) pirrolidin-2-ona), inhibidor específico de la PDE4, como un medicamento eficiente para inducir la ovulación, al mejorar la respuesta a las gonadotropinas en tratamientos de fertilidad humana (Palmer *et al.*, 2005). Además existen patentes que reportan el uso del rolipram como alternativa para procedimientos contra enfermedades del sistema nervioso central como la esclerosis múltiple (Hedgepeth y Wacéhtel, 1997), la demencia (Imanishi *et al.*, 1991) y la depresión (Reines *et al.*, 2001). También es útil en afecciones del sistema inmune como la neoplasia de linfocitos B periféricos (Lerner y Tiwari, 2008) y en inflamación (Epstein *et al.*, 2009).

A pesar de que el rolipram es específico para PDE4, su afinidad por todos los isotipos de esta enzima (A, B, C y D) (Halpin, 2008), ocasiona efectos secundarios como náuseas, gastritis, eméesis y cefalea (Huang *et al.*, 2001). En estudios realizados en humanos se descubrió que las náuseas se debían al aumento en la secreción ácida del estómago lo que conllevaba a gastritis (Barnette *et al.*, 1998). Este inhibidor de primera generación presenta dos tipos de conformación: de alta y baja afinidad (O'Donnell y Zhang, 2004; Livi *et al.*, 1990). Cada tipo de conformación está relacionada con efectos farmacológicos diferentes. La conformación de alta afinidad del rolipram actúa como antidepresivo y estudios en sistema nervioso central demostraron que la presencia de PDE4B y PDE4D en el área postrema del cerebro son las causantes de los efectos eméticos y la cefalea (Mori *et al.*, 2010, Saccomano *et al.*, 1991; Schmiechen *et al.*, 1990; Barnette *et al.*, 1995a) mientras que la conformación de baja afinidad se ve relacionada con la proliferación de linfocitos T (Barnette *et al.*, 1995b; Duplantier *et al.*, 1996). Lo anterior se demuestra en un estudio sobre los efectos del rolipram en neuronas corticales y linfocitos T; donde se observó que el rolipram se une con alta afinidad a las neuronas, presentando una abundante difusión en este tipo de células mientras que la proliferación de linfocitos T se debe principalmente a la conformación de baja afinidad (Hirose *et al.*, 2008).

Debido a esta dualidad en la acción del rolipram, se crearon inhibidores de segunda generación como el cilomilast (4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico) (Barnette *et al.*, 1998) y el roflumilast (3-(ciclopropilmetoxi)-N-(3,5-dicloropyridin-4-il)-4-(difluorometoxy)benzamida) (Nell *et al.*, 2000) medicamentos elaborados para controlar las afecciones del sistema inmune; su principal característica fue presentar un solo tipo de afinidad (baja) para así actuar adecuadamente en células inmunocompetentes y no producir los efectos adversos que ocasionaba la alta afinidad (Chung, 2006). Tanto el rolipram como los medicamentos de segunda generación pueden unirse a todos los isotipos de PDE4 y como consecuencia siguen presentando una amplia gama de efectos secundarios (Huang *et al.*, 2001).

Recientemente, utilizando las características del sitio activo como herramienta de diseño, se han sintetizado drogas de tercera generación específicas para cada isotipo (Hirose *et al.*, 2007). El primero de ellos es el {4-[8-(3-nitrofenil)-[1,7]naftiridina-6-il]ácido benzoico} (NPV) que es de un orden de magnitud más efectivo sobre PDE4B y PDE4D (Wang *et al.*, 2007); el 4-(8-benzo[1,2,5]oxadiazol-5-il-[1,7]naftiridina-6-il)-ácido benzoico (NVP-ABE171), una variante del NVP con mayor afinidad por la PDE4D (Trifilieff *et al.*, 2001) y los inhibidores 524717 de MERCK (3,5-Dimetil-1-(3-nitrofenil)-1H-pirazol-4-acido carboxílico etil ester) (Calbiochem catalog, 2010) y YM-976 (4-(3-clorofenil)-1,7-dietilpirido[2,3-d]pirimidina-2(1H)-ona) específicos para PDE4B y PDE4D. Pese a que existen una gran cantidad de compuestos de tercera generación, no hay información clínica reportada aún, debido a que se encuentran en fase de evaluación (Aoki *et al.*, 2000a).

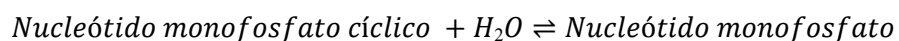
Lo anterior demuestra que es posible el diseño de medicamentos específicos para cada isotipo de PDE4, aumentando las posibilidades de que los inhibidores de esta enzima puedan ser utilizados según la variante enzimática presente en el tejido. Para este proceso es deseable contar con un sistema que permita evaluar la especificidad y eficiencia de los inhibidores de PDE4 de una manera confiable y económica. Por eso, en este trabajo se propuso el desarrollo de herramientas

computacionales y bioquímicas que permitan la selección de inhibidores específicos de PDE4D como etapa previa a su evaluación *in vivo*. Las pruebas *in vivo* emplean animales de laboratorio como el ratón y el conejo y evalúan la respuesta sistémica (prueba de inyección) o la respuesta local (prueba intracutánea) (Arias, 1999).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES

Las fosfodiesterasas (PDE) pertenecen al grupo de las nucleasas, las cuales son enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster (Devlin, 2004), como los que se establecen en los ácidos nucleicos entre la pentosa de un nucleótido y el grupo fosfato de otro. Sin embargo, las fosfodiesterasas actúan directamente sobre nucleótidos cíclicos, al hidrolizar el enlace fosfato interno de los nucleótidos cíclicos a través de moléculas de agua como el adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y el guanosin monofosfato cíclico (GMPc) como se observa a continuación:



2.1.1 RESEÑA HISTÓRICA

Las múltiples conformaciones (isoformas o isotipos) de las fosfodiesterasas fueron aisladas de cerebro de ratón usando geles de poliacrilamida a comienzo de los años setentas (Uzunov y Weiss, 1972; Strada *et al.*, 1974) y al poco tiempo se descubrió que estas enzimas eran inhibidas por una gran variedad de drogas tanto en cerebro como en otros tipos de tejidos (Weiss, 1975; Fertel y Weiss, 1976). El potencial de los inhibidores selectivos de las fosfodiesterasas para ser utilizados como agentes terapéuticos fue predicho en el año de 1977 (Waiss y Hait, 1977). Esta predicción fue de gran importancia por sus

importantes usos terapéuticos como el Viagra inhibidor de la PDE5 y el Diazepam inhibidor de la PDE4

2.1.2 CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

Según la numeración EC del Comité de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology NC-IUBMB*) las fosfodiesterasas se encuentran clasificadas dentro de los números EC 3.1.4. Según el sustrato que hidrolizan se pueden clasificar en tres grupos (Figura 1): Las enzimas que catalizan el AMPc en 5'-AMP (EC: 3.1.4.53), las que hidrolizan el GMPc a 5'-GMP (EC: 3.1.4.17) y por último aquellas enzimas que presentan un efecto dual hidrolizando tanto el GMPc como el AMPc (EC: 3.1.4.35). Existe otro tipo de agrupación en once tipos de enzimas (Figura 2) que se subdividen a su vez en isotipos y variantes por *splicing* (Lugnier, 2006). Las PDE 4, 7 y 8 hidrolizan el AMPc en 5'-AMP; las PDE 5, 6 y 9 degradan el GMPc a 5'-GMP y por último las PDE 1, 2, 3, 10 y 11 presentan un efecto dual hidrolizando tanto el GMPc como el AMPc. Estos nucleótidos cíclicos actúan como segundos mensajeros en la señalización celular y el AMPc específicamente está involucrado en el efecto intracelular de hormonas, neurotransmisores (Habener, 2001) y activación de linfocitos T (Ledbetter *et al.*, 1986; Hirose *et al.*, 2008).

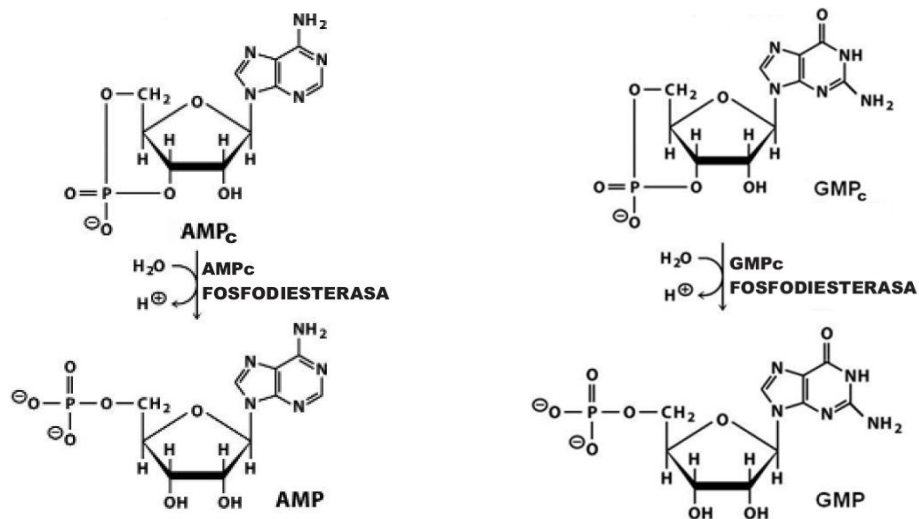


Figura 1. Reacción de hidrólisis del AMPc y GMPc mediada por fosfodiesterasas.Elaborado por Velásquez 2011.

2.1.3 IMPORTANCIA CLÍNICA

Las fosfodiesterasas son enzimas que a menudo han sido usadas como blanco de la inhibición farmacológica debido a su distribución específica en determinados tejidos, a sus propiedades estructurales y funcionales (Jeon *et al.*, 2005). Los inhibidores de PDE pueden aumentar o prolongar los efectos de los procesos fisiológicos mediados por el AMPc o el GMPc al inhibir su degradación por parte de las PDE. Inhibidores de las PDE se han identificado como las potenciales terapias nuevas en áreas como la hipertensión arterial pulmonar, enfermedades coronarias, la demencia, la depresión y la esquizofrenia (Khairallah *et al.*, 2008).

2.1.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Todas las fosfodiesterasas poseen tres dominios. El dominio N-terminal, que presenta gran variabilidad entre las diferentes PDE y es el determinante de la localización celular, además presenta sitios de fosforilación involucrados en regulación (Halpin, 2008). El dominio C-terminal es similar en todas las PDE, y en el caso particular de la PDE4 es blanco de fosforilaciones que modulan la estabilidad de la enzima (Conti y Beavo, 2007). Finalmente, el dominio central

corresponde a la región catalítica y es altamente conservado. La principal diferencia entre fosfodiesterasas radica en los residuos que determinan la especificidad por el sustrato, generado por la flexibilidad conformacional correspondiente a la glutamina 369 de las PDE4 (Zhang *et al.*, 2004).

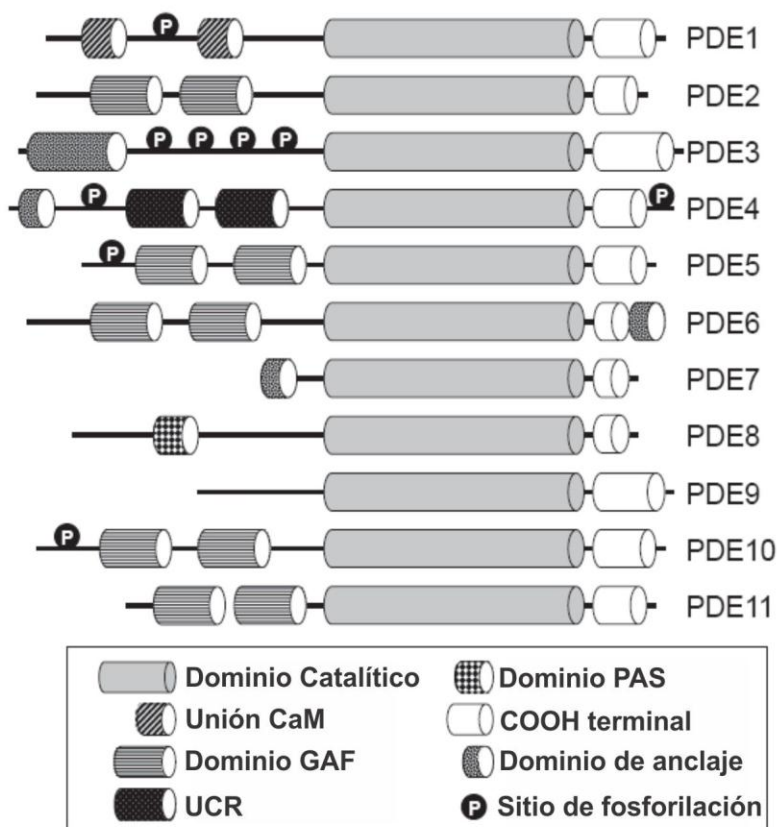


Figura 2. Estructura de los once tipos de fosfodiesterasas. Modificado de: Halpin, 2008.

2.2 FOSFODIESTERASA TIPO 4

2.2.1 IMPORTANCIA

De los once tipos de fosfodiesterasas existentes, una de las más estudiadas es la fosfodiesterasa tipo 4 (Huang *et al.*, 2001; Jones, 2004). En el caso del sistema endocrino, se encuentra presente en las células de la granulosa (Mayes, 2002) y resultados previos obtenidos en el grupo de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional sede Medellín han demostrado que la inhibición de esta enzima

presenta excelentes resultados en maduración de oocitos. Eso convierte la inhibición de PDE4 en una alternativa frente a las hormonas gonadotrópicas FSH y LH en los protocolos de producción de embriones *in vitro* (López *et al.*, 2008).

2.2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las fosfodiesterasas tipo 4 presentan hidrólisis exclusiva del AMPc y están divididas en cuatro isotipos: A, B, C y D. La PDE4D es la isoforma responsable del efecto emético producido por muchos inhibidores como el rolipram (Hirose *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 2007). Cada isotipo presenta variantes por *splicing*, dando origen aproximadamente a 20 enzimas diferentes. Pese a lo anterior, todas estas variantes presentan propiedades cinéticas relacionadas, requieren de los mismos iones como cofactores y son inhibidas por el rolipram (Conti *et al.*, 2003).

2.2.3 UBICACIÓN FISIOLÓGICA

Las PDE4 son particularmente abundantes en células inmunes (Chung, 2006) y además, están involucradas en la producción de mediadores inflamatorios, como citoquinas y especies reactivas de oxígeno (Torphy, 1998; Souness *et al.*, 2000). Las PDE4A y PDE4B son particularmente abundante en neutrófilos y monocitos (Ariga *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005) mientras que la PDE4D se encuentra presente en todas las células del sistema inmune y está relacionada con la proliferación de linfocitos T (Robichaud *et al.*, 2002; Lehnart *et al.*, 2005). Debido a la influencia de esta enzima en el sistema inmune, se han desarrollado inhibidores que actúan como antiinflamatorios y broncodilatadores (Barnette *et al.*, 2000), que evitan la producción de sustancias inflamatorias como la interleuquina-1 β y el TNF α (Chung *et al.*, 2006; Halpin, 2008)

En el sistema nervioso central, la PDE4 presente en la corteza cerebral se encarga de hidrolizar el AMPc formado por la estimulación de β -adrenorreceptores (Ye *et al.*, 1996) y la inhibición de esta enzima produce efectos antidepresivos por alterar la noradrenalina mediada por neurotransmisión (James *et al.*, 2004). Cuando se descubrió que el rolipram tenía actividad sobre el sistema nervioso

central (Wachtel, 1982), se pensó que inhibidores de la PDE4 podían ser una nueva clase de drogas antidepressivas (Wachtel, 1983). Sin embargo, los avances en el diseño de estos medicamentos han sido reducidos debido al poco conocimiento de los isotipos de PDE4 presentes en el cerebro y su función, además de los diferentes sitios de unión del inhibidor (alta y baja afinidad) (Jacobitz *et al.*, 1996).

En el caso del sistema endocrino, un estudio realizado en la unidad folicular de ratones *knockout* para la PDE4D (Jin *et al.*, 1999) reporta que las hembras de estos animales, presentaron deficiencia en la fertilidad, debido a la incapacidad para ovular y a la disminución en la sensibilidad a las gonadotropinas FSH y LH por parte de las células de la granulosa. La PDE4 se encuentra en las células de la granulosa, que hacen parte de la unidad folicular (Mayes, 2002). Las hormonas gonadotrópicas FSH y LH se unen a receptores de membrana presentes en las células de la granulosa del complejo cúmulo oocito (CCO) para comenzar la vía de señalización, que ocasiona la disminución de las uniones de abertura y la producción de ácido hialurónico como características de la mucificación que se presenta por los altos niveles de AMPc en las células de la granulosa (Calder *et al.*, 2003), dando como resultado la maduración del oocito (Jones, 2004; Josefsberg, 2002). La respuesta celular mediada por las gonadotropinas, se puede mimetizar con la inhibición de la PDE4 presente en las células de la granulosa (Tsafiriri *et al.*, 1996), que permitirá la acumulación de AMPc en estas células, desencadenando los mismos resultados que con las hormonas gonadotrópicas, dando como resultado la maduración del oocito (Figura 3) (Calder *et al.*, 2003).

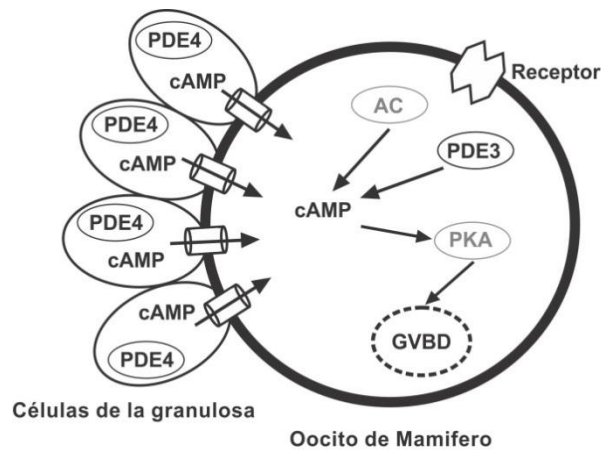


Figura 3. Localización celular de las fosfodiesterasas en la unidad folicular. Modificado de: Conti *et al.* 2002.

2.2.4 FOSFODIESTERASA TIPO 4 ISOTIPO D

2.2.4.1 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

La fosfodiesterasa tipo 4 isotipo D (PDE4D) es una de las fosfodiesterasas más estudiadas debido a su amplia distribución en los diferentes órganos de los mamíferos (Grange *et al.*, 2000; Robichaud *et al.*, 2002; Gretarsdottir *et al.*, 2003; Bolger *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000). Además es la PDE4 con mayor número de variantes por *splicing*: 9 (Figura 4), de estas variantes las PDE4D6 se encuentra principalmente en el cerebro, la PDE4D7 está presente en testículos y riñón, y la PDE4D8 está en hígado, corazón y pulmón (Richter *et al.*, 2005).

2.2.4.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

En el sitio catalítico de la PDE4 se encuentran iones metálicos como el zinc o el magnesio, que están involucrados en la catálisis y la unión del AMPc (Huang *et al.*, 2001). La PDE4 presenta las formas apoenzima (sin iones de magnesio y zinc) y holoenzima (con iones de magnesio y zinc) y se ha demostrado que el rolipram presenta mayor afinidad por el sitio activo de la PDE4 en la forma holoenzima (Laliberte *et al.*, 2000). En la región N-terminal hay dos zonas altamente conservadas

llamadas UCR1 y UCR2 (del inglés *upstream conserved region 1 y 2*), que corresponden a dominios reguladores que controlan la conformación cuaternaria de la enzima. Dependiendo de su presencia y longitud de secuencia las PDE4 se dividen en dos subgrupos: formas largas y formas cortas (Richter *et al.*, 2002). Estas regiones son determinantes en las múltiples conformaciones del sitio activo y presentan sitios de fosforilación que aumentan la actividad enzimática (Conti *et al.*, 2003).

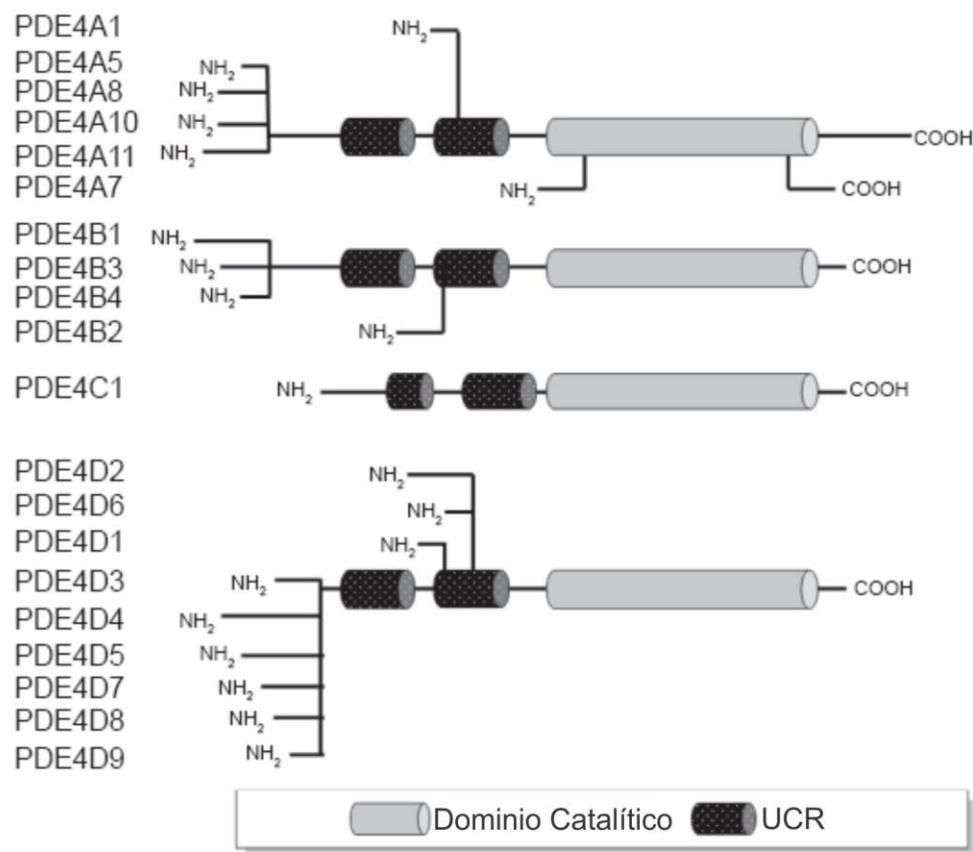


Figura 4. Variantes por *splicing* de la PDE-4D con sus diferencias estructurales en la región N-terminal o UCR. Modificado de: Halpin, 2008.

El dominio catalítico de la fosfodiesterasa tipo 4 está conformado por 16 hélices alfa altamente conservadas en los cuatro isotipos (Figura 5) (Xu *et al.*, 2000). El bolsillo catalítico tiene un volumen de 440 Å³, tamaño suficiente para acomodar una molécula de AMPc (232 Å³) o su

producto 5'-AMP (256 \AA^3). Esta cavidad se puede dividir en dos subsitios uno de unión de los metales divalentes y otro de unión al sustrato (Conti *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 1995; Houslay *et al.*, 2003). La estructura de la PDE4D en complejo con AMPc (Figura 6) muestra que las aguas coordinan uno de los dos iones metálicos que actúa como nucleófilo en la reacción de hidrólisis, los iones metálicos también pueden estabilizar el estado de transición (Xu *et al.*, 2000)

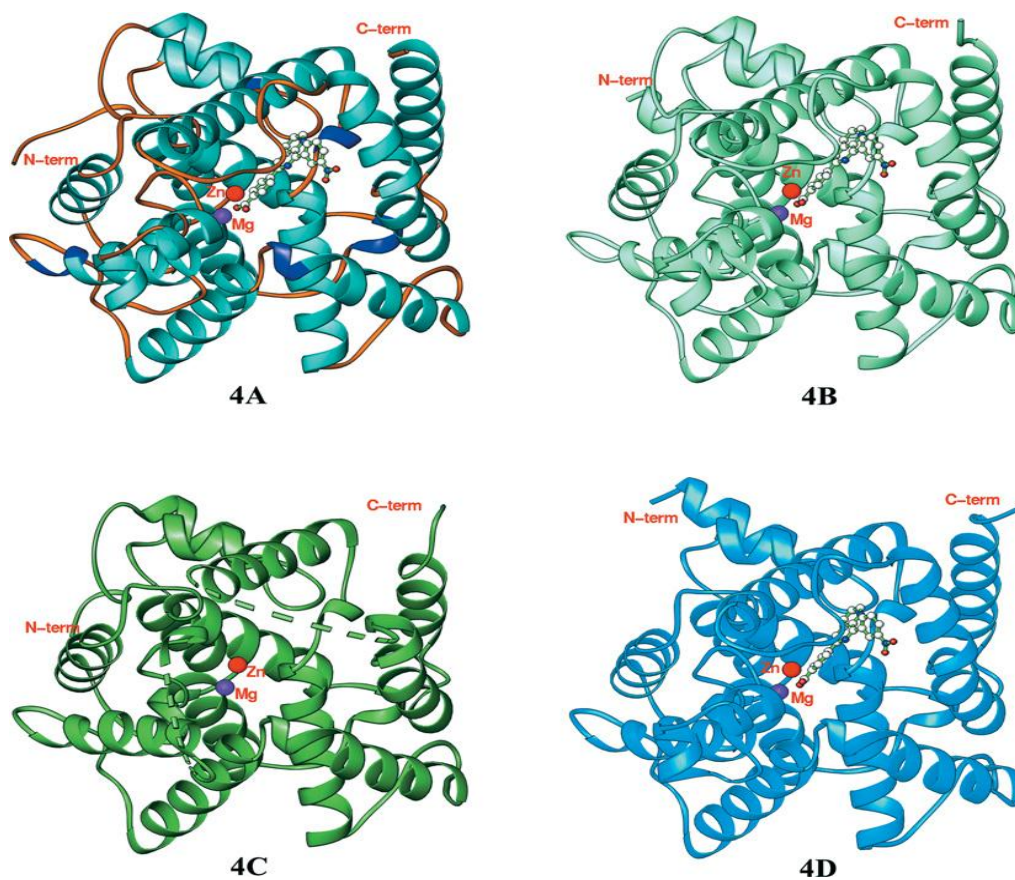


Figura 5. Estructura tridimensional de los diferentes isotipos de la PDE4. Tomado de: Wang 2007.

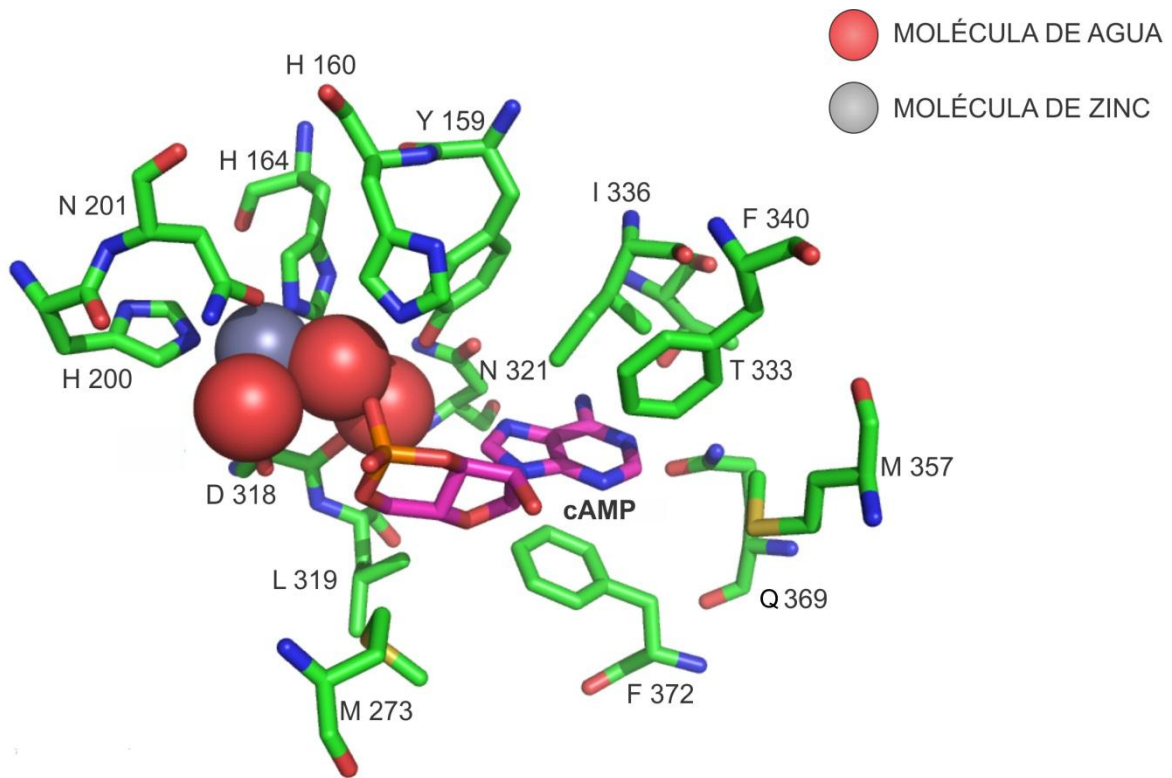


Figura 6. AMPc en el bolsillo catalítico de la PDE4D, con los aminoácidos que conforman el sitio activo. Elaborado por Velásquez 2011.

Las PDE4B y PDE4D presentan una gran similitud en el sitio activo, ya que los aminoácidos involucrados en la unión del inhibidor tienen la misma conformación en ambas enzimas. Al comparar la PDE4D con la PDE4A se observan algunas diferencias especialmente en aminoácidos cercanos a la glutamina 369 (Q369) que se encuentra en el sitio activo y es crítica para la unión del sustrato y de los inhibidores, por ser este aminoácido el encargado de discriminar entre el AMPc y GMPc. Si esta glutamina rota 180° puede hidrolizar el GMPc y si presenta un carácter rotatable del puente de hidrógeno que genera puede hidrolizar ambos nucleótidos cíclicos como en el caso de las PDE duales. Al comparar la PDE4D con la PDE4C las diferencias son mucho más obvias, ya que existen 12 aminoácidos en el sitio activo que difieren en su posición (Figura 7) (Wang *et al.*, 2007)

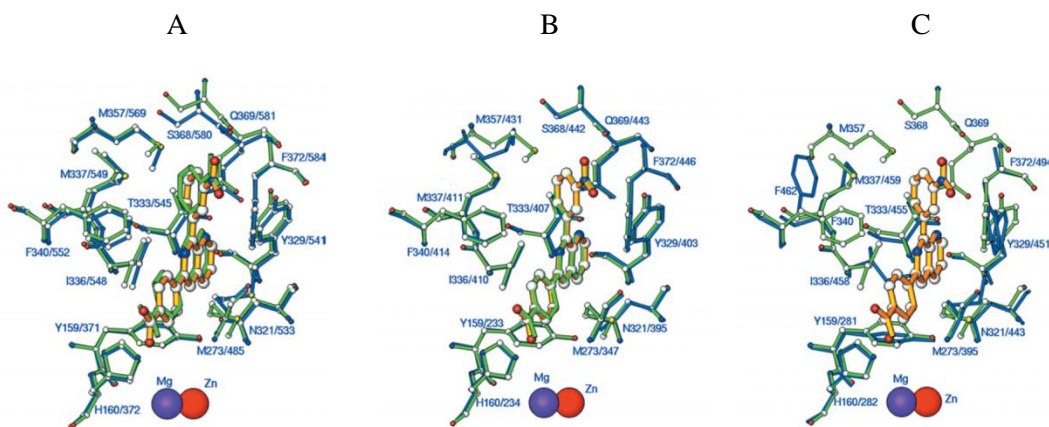


Figura 7. Alineamiento estructural de la PDE 4D con la PDE4A (a), PDE4B (b), PDE4C (c). Tomado de: Wang 2007.

2.3 INHIBIDORES DE PDE

2.3.2 INHIBIDOR DE PRIMERA GENERACIÓN: ROLIPRAM

La primera generación de inhibidores fue liderada por el rolipram (Figura 8) ((*RS*)-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxi-fenil)pirrolidin-2-ona), el cual tiene afinidad por todos los isotipos de la PDE4 (Souness *et al.*, 1997). El rolipram puede unirse en conformaciones de alta o baja afinidad (Demnitz *et al.*, 1998), que están involucrados en ciertos efectos farmacológicos indeseables (James *et al.*, 2004; Torphy, 1998)

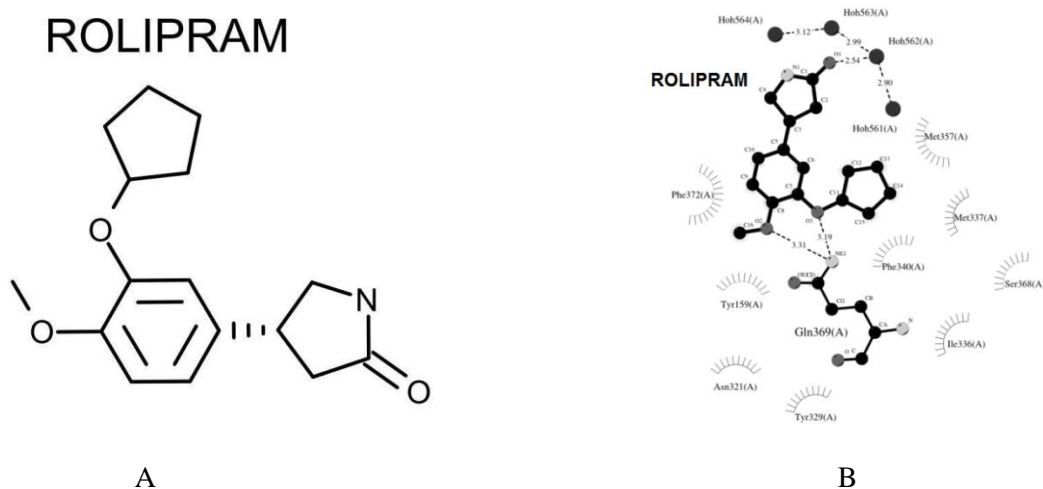


Figura 8. Estructura del rolipram y sus interacciones con el sitio activo de PDE4D. Elaborado por Velásquez 2011.

2.3.3 INHIBIDORES DE SEGUNDA GENERACIÓN

Debido a la poca especificidad del rolipram y su dualidad en el mecanismo de unión, se diseñó una segunda generación de inhibidores entre los que se encuentra el roflumilast (3-(ciclopropilmetoxi)-N-(3,5-dicloropyridin-4-il)-4-(difluorometoxi)benzamida) (Nell *et al.*, 2000) y el cilomilast (4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico) (Figura 9) (Torphy *et al.*, 1999). Estos medicamentos se diseñaron utilizando el rolipram como núcleo estructural. Para el cilomilast las modificaciones se presentaron en el grupo 4-pirrolidin-2-ona del rolipram, el cual fue reemplazado por el 4-ciano-4-ciclohexano-1-carboxílico del cilomilast, modificándose la polaridad al pasar de un ambiente básico otorgado por el NH al rolipram, a un entorno ácido por el COOH presente en el cilomilast y alterándose el tipo de interacciones con el sitio catalítico, por pasar de grupos donadores de electrones como el NH del grupo pirrolidín y el oxígeno de la cetona en el rolipram a grupos aceptores de electrones como el grupo ciano (CN) y el ácido carboxílico (COOH) en el cilomilast. La región de ambas moléculas que permanece intacta, corresponde a la posición ocupada por la base nitrogenada y el azúcar (March, 1977).

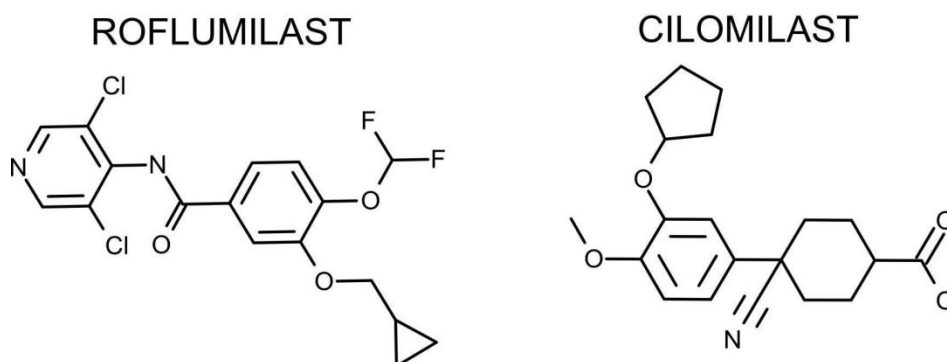
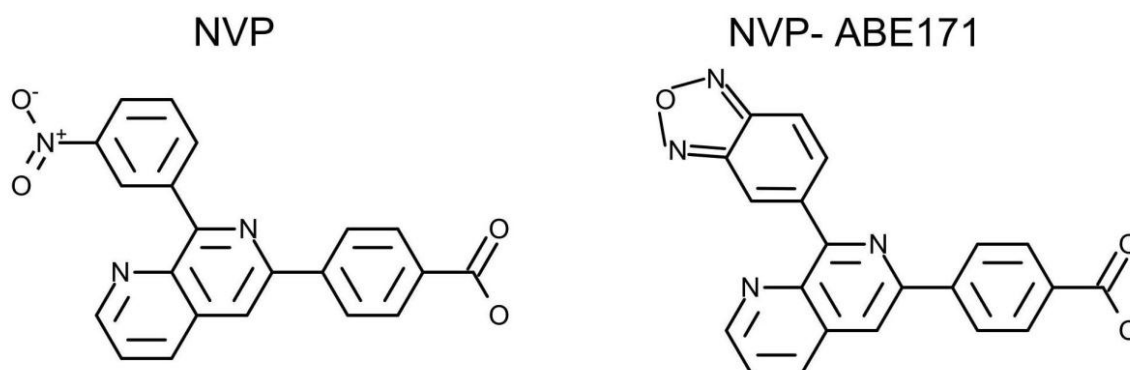
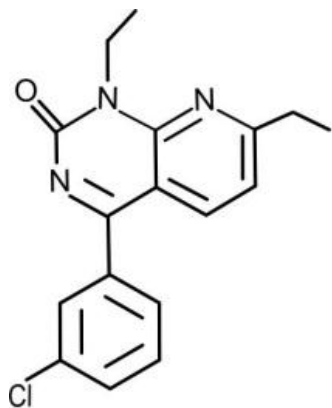


Figura 9. Estructura de los inhibidores de segunda generación roflumilast y cilomilast. Elaborado por Velásquez 2011.

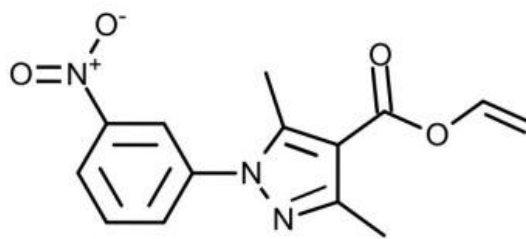
2.3.4 INHIBIDORES DE TERCERA GENERACIÓN

A pesar de estas modificaciones la afinidad del cilomilast no logró superar los efectos adversos que producía el rolipram (Huang *et al.*, 2001). Por esta razón fue necesario crear una tercera generación de inhibidores basada en el estudio del sitio catalítico de la PDE4, entre estos inhibidores se encuentra el YM-976 (4-(3-clorofenil)-1,7-dietilpirido[2,3-d]pirimidina-2(1H)-ona) el NVP (4-[8-(3-nitrofenil)-[1,7]naftiridina-6-il]ácido benzoico), el 524717-MERCK (3,5-Dimetil-1-(3-nitrofenil)-1H-pirazol-4-acido carboxílico etil ester) y el NVP-ABE171 (4-(8-benzo[1,2,5]oxadiazol-5-il-[1,7]naftiridina-6-il)-ácido benzoico) (Figura 10). La principal característica del YM-976 (Aoki *et al.*, 2000a) fue reducir el efecto emético, basado en el mimetismo que presenta la pirimidina de este inhibidor con la base nitrogenada adenina del sustrato original (AMPC) (Aoki *et al.*, 2000b), además su especificidad es superior ya que presenta un IC_{50} (concentración molar de una sustancia que reduce la unión del sustrato al 50% de la máxima unión específica) de 2.2 nM comparado con un IC_{50} de 117 nM para el cilomilast (Huang *et al.*, 2001).





YM-976



MERCK-524717

Figura 10. Inhibidores de tercera generación de PDE4. Elaborado por Velásquez 2011.

En el caso del inhibidor NVP, su estructura simula al 3'-5' adenosín monofosfato cíclico (AMPC), especialmente la región que corresponde a la base nitrogenada adenina, ya que en este compuesto se reemplaza por el grupo naftiridina, que presenta apilamiento en el sitio catalítico de la enzima con una fenilalanina conservada entre todas las fosfodiesterasas y que interactúa paralelamente con la adenina y la guanina en el caso de los sustratos originales y con grupos benzeno en diferentes inhibidores como el rolipram, el cilomilast y el YM-976. El NVP se une en la misma conformación que el AMPC en el sitio activo de la PDE4 e interactúa con los mismos residuos. Además debido a su gran tamaño ocupa prácticamente todo el bolsillo catalítico, ya que solo permite un área de accesibilidad del solvente del 10%. Debido a su mayor especificidad se reportan IC_{50} diferentes para cada uno de los cuatro isotipos de las PDE4, para la PDE4A es $3.3 \mu M \pm 0.2$, para la PDE4B es $0.65 \mu M \pm 0.01$, para la PDE4C es $5.7 \mu M \pm 0.2$ y por último para la PDE4D es $0.57 \mu M \pm 0.04$ (Wang *et al.*, 2007).

El NVP-ABE171 es un compuesto que usa como núcleo estructural al NVP, presentando una modificación del 4-8-3-nitrofenil del NVP, por el 4-8-Benzo[1,2,5]oxadiazol-5-il presente en el NVP-ABE171, incrementado la especificidad que se observa en los IC_{50} para cada isotipo de la

PDE4, ya que pasa de valores μM a nM . Los valores de IC_{50} del NVP-ABE171 son para PDE4A 602 nM , para PDE4B 34 nM , para PDE4C 1230 nM y para PDE4D 1.5 nM (Trifilieff *et al.*, 2001). Y el 524717-MERCK en lugar del ciclopentiloxi del rolipram, posee 2 grupos metilo en las posiciones 3 y 5, además posee un metil en la posición 4, estas ramificaciones incrementan su especificidad, que se observa en los IC_{50} reportados para PDE4B de 33 nM y para PDE4D de 21 nM . Los valores de IC_{50} para diferentes isotipos de PDE4 reportados para algunas drogas se representan en la tabla 1.

Inhibidor	IC_{50} genérico				Referencia
	PDE4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D	
ROLIPRAM (1)	800 nM				Calbiochem catalog, 2010
CILOMILAST (2)	117 nM				Torphy <i>et al.</i> , 1999
ROFLUMILAST (2)	0.8 nM				Nell <i>et al.</i> , 2000
	IC_{50}				
	PDE4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D	
NVP (2)	3.3 μM	0.65 μM	5.7 μM	0.57 μM	Wang <i>et al.</i> , 2007
NVP-ABE171 (3)	602 nM	34 nM	1230 nM	1.5 nM	Trifilieff <i>et al.</i> , 2001
524717-MERCK (3)	nr	33 nM	nr	21 nM	Calbiochem catalog, 2010
YM-976 (3)	3.5 nM	1.0 nM	13 nM	1.7 nM	Aoki <i>et al.</i> , 2001

Tabla 1. Inhibidores de primera, segunda y tercera generación con sus respectivos valores de IC_{50} , nr: no reporta.

3 BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez R, Sette C, Yang D, Eglen RM, Wilhelm R, Shelton ER, *et al.* Activation and selective inhibition of a cyclic AMP-specific phosphodiesterase, PDE-4D3. *Mol Pharmacol.* 1995; (48): 616-622.
- Aoki M, Fukunaga M, Kitagawa M, Hayashi K, Morokata T, Ishikawa G, *et al.* Effect of a novel anti-inflammatory compound, YM976, on antigen-induced eosinophil infiltration into the lungs in rats, mice, and ferrets. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; (295): 1149-1155.
- Aoki M, Kobayashi M, Ishikawa J, Saita Y, Terai Y, Takayama K, *et al.* A novel phosphodiesterase type 4 inhibitor, YM976 (4-(3-chlorophenyl)-1,7-diethylpyrido[2,3-d]pyrimidin-2(1H)-one), with little emetogenic activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; (295): 255-260.
- Aoki M, Fukunaga M, Sugimoto T, Hirano Y, Kobayashi M, Honda K, *et al.* Studies on Mechanisms of Low Emetogenicity of YM976, a Novel Phosphodiesterase Type 4 Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; (298): 1142-1149.
- Arias Thomas D. *Glosario de medicamentos: Desarrollo, evaluación y uso.* Washington D.C. 1999: 333 p.
- Ariga M, Neitzert B, Nakae S, Mottin G, Bertrand C, Pruniaux MP, *et al.* Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation. *J. Immunol.* 2004; (173): 7531-7538.
- Barnette MS, Grous M, Cieslinski LB, Burman M, Christensen SB, Torphy TJ. Inhibitors of phosphodiesterase IV (PDE IV) increase acid secretion in rabbit isolated gastric glands: correlation between function and interaction with high-affinity rolipram binding site. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1995a; (273): 1396-1402.

- Barnette MS, Manning CD, Cieslinski LB, Burman M, Christensen SB, Torphy TJ. The ability of phosphodiesterase IV inhibitors to suppress superoxide production in guinea pig eosinophils is correlated with inhibition of phosphodiesterase IV catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995b; (273): 674-679.
- Barnette MS, Christensen SB, Essayan DM, Grous M, Prabhakar U, Rush JA, *et al.* SB 207499 (Ariflo), a Potent and Selective Second-Generation Phosphodiesterase 4 Inhibitor: *In Vitro* Anti-inflammatory Actions. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; (284): 420-426.
- Barnette MS, Underwood DC. New phosphodiesterase inhibitors as therapeutics for the treatment of chronic lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2000; (6): 164-169.
- Bolger GB, McCahill A, Huston E, Cheung YF, McSorley T, Baillie GS, *et al.* The unique amino-terminal region of the PDE4D5 cAMP phosphodiesterase isoform confers preferential interaction with β -arrestins. *J. Biol. Chem.* 2003; (278): 49230-49238.
- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; (1): 14.
- Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, *et al.* Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol and Cell Endocrinol.* 2002; (187): 153-159.
- Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem.* 2003; (278): 5493-5496.
- Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.* 2007; (76): 481-511.

- Chung KF. Phosphodiesterase inhibitors in airway disease. *Eur J Pharmacol.* 2006; (533): 110-117.
- Demnitz J, LaVecchia L, Bacher E, Keller T, Müller T, Schürch F, *et al.* Enantiodivergent Synthesis of (R)- and (S)-rolipram. *Molecules.* 1998; (3): 107-119.
- Devlin, TM. *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona. 2004.
- Duplantier AJ, Biggers MS, Chambers RJ, Cheng JB, Cooper K, Damon DB, *et al.* Biarylcarboxylic acids and amides: inhibition of phosphodiesterase type IV versus [3H]rolipram binding activity and their relationship to emetic behavior in the ferret. *J Med Chem.* 1996; (39): 120-125.
- Epstein P, Brocke S, Dong H, Dall A. Methods of treating inflammation. Número de patente: 20090105281. Fecha de publicación: 04/23/2009.
- Fertel, R, Weiss, B.: Properties and drug responsiveness of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat lung. *Mol. Pharmacol.* 1976; (12): 678-687.
- Grange M, Sette C, Cuomo M, Conti M, Lagarde M, Prigent AF, *et al.* The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 is regulated by phosphatidic acid binding. Consequences for cAMP signaling pathway and characterization of a phosphatidic acid binding site. *J Bio Chem.* 2000; (275): 33379-33387.
- Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, Manolescu A, Jonsdottir S, Jonsdottir T, *et al.* The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat Genet.* 2003; (35): 131-138.
- Halpin MG. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2008; (3): 543-561.
- Hedgepeth J, Wachtel H. Treatment of multiple sclerosis. Número de patente: 5672622. Fecha de publicación: 09/30/1997.

- Hirose R, Manabe H, Nonaka H, Yanagawa K, Akuta K, Sato S, *et al.* Correlation between emetic effect of phosphodiesterase 4 inhibitors and their occupation of the high-affinity rolipram binding site in *Suncus murinus* brain. *Eur J Pharmacol.* 2007; (573): 93-99.
- Hirose R, Manabe H, Yanagawa K, Ohshima E, Ichimura M. Differential Effects of PDE4 Inhibitors on Cortical Neurons and T-Lymphocytes. *J Pharmacol Sci.* 2008; (106): 310-317.
- Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitisation and compartmentalization. *Biochem J.* 2003; (370): 1-18.
- Huang Z, Ducharme Y, Macdonald D, Robichaud A. The next generation of PDE4 inhibitors. *Curr Opin Chem Biol.* 2001; (5): 432-438.
- Imanishi T, Ichimaru Y, Sawa A, Konno F, Wachtel H, Ueki S, *et al.* Anti-dementia drug. Número de publicación: 5059612. Fecha de publicación: 10/22/1991.
- Jacobitz S, McLaughlin MM, Livi GP, Burman M, Torphy TJ. Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding. *Mol Pharmacol.* 1996; (50): 891-899.
- Jeon Y, Heo Y, Kim C, Hyun Y, Lee T, Ro S, Cho J. "Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development". *Cell Mol Life Sci.* 2005; (62): 1198–220.
- Jin SL, Bushnik T, Lan L, Conti M. Subcellular localization of rolipramsensitive, cAMP-specific phosphodiesterases. Differential targeting and activation of the splicing variants derived from the PDE4D gene. *J Biol Chem.* 1998; (273): 19672-19678.
- Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'Ercole AJ, Conti M. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; (96): 11998-12003.

- Jin SL, Lan L, Zoudilova M, Conti M. Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J. Immunol.* 2005; (175): 1523-1531.
- Jones KT. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 2004; (10): 1-5.
- Josefsberg LB, Dekel N. Translational and post-translational modifications in meiosis of the mammalian oocyte. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; (187): 161-171.
- Khairallah M, Khairallah RJ, Young ME, *et al.* "Sildenafil and cardiomyocyte-specific cGMP signaling prevent cardiomyopathic changes associated with dystrophin deficiency". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; (105): 7028-33.
- Laliberté F, Han Y, Govindarajan A, Giroux A, Liu S, Bobechko B, *et al.* Conformational difference between PDE4 apoenzyme and holoenzyme. *Biochemistry.* 2000; (39): 6449-6458.
- Ledbetter JA, Parsons M, Martin PJ, Hansen JA, Rabinovitch PS, June CH. Antibody binding to CD5 (Tp67) and Tp44 T cell surface molecules: effects on cyclic nucleotides, cytoplasmic free calcium, and cAMP-mediated suppression. *J Immunol.* 1986; (137): 3299-3305.
- Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, *et al.* Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell.* 2005; (123): 25-35.
- Lerner A, Tiwari S. Compositions and Methods for the Treatment of Peripheral B-Cell Neoplasms. Número de patente: 20080051379. Fecha de publicación: 02/28/2008.
- Liu H, Palmer D, Jimmo SL, Tilley DG, Dunkerley HA, Pang SC, *et al.* Expression of phosphodiesterase 4D (PDE4D) is regulated by both the cyclic AMP-dependent protein

kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. A potential mechanism allowing for the coordinated regulation of PDE4D activity and expression in cells. *J Biol Chem.* 2000; (275): 26615-26624.

- Livi GP, Kmetz P, McHale MM, Cieslinski LB, Sathe GM, Taylor DP, *et al.* Cloning and expression of cDNA for a human low-K_m, rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase. *Mol Cell Biol.* 1990; (10): 2678-2686.
- López YS, Mejía AM, Escobar EE, Agudelo B, Vásquez NA, Echavarría H. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa tipo 4-rolipram, sobre la maduración in vitro de oocitos bovinos. En: *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008; (21): 59-65.
- Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 2006; (109): 366-398.
- March J. *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanism, Structure.* International Student Edition. Adelphi University- New York, Estados Unidos. 1977: 671.
- Mayes M. The meiotic arrest of bovine oocytes. Du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.), Université Laval - Québec, Canadá. 2002: 171.
- MERCK. Calbiochem Catalog 2010.
- Mori F, Pérez-Torres S, De Caro R, Porzionato A, Macchi V, Beleta J, *et al.* The human area postrema and other nuclei related to the emetic reflex express cAMP phosphodiesterases 4B and 4D. *J Chem Neuroanat.* 2010; (40): 36-42.
- Muller T, Engels P, Fozard JR. Subtypes of the type 4 cAMP phosphodiesterases: structure, regulation and selective inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* 1996; (17): 294-298.
- Nell H, Louw C, Leichtl S, Rathgeb F, Neuhauser M, Hatzelmann A. Acute anti-inflammatory effect of the novel phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast on allergen challenge in asthmatics after a single dose. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; (161): A200.

- O'Donnell JM, Zhang HT. Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol Sci.* 2004; (3): 158-163.
- Palmer S, McKenna S, Tepper Eshkol A, MacNamee M. Methods of inducing ovulation. Número de patente: 6953774. Fecha de publicación: 10/11/2005.
- Peter D, Jin SL, Conti M, Hatzelmann A, Zitt C. Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4+ T cells: predominant role of PDE4D. *J Immunol.* 2007; (178): 4820-4831.
- Reines S, Robichaud A, Tattersall F. Method for treating or preventing depression. Número de patente: 20010049368. Fecha de publicación: 12/06/2001.
- Richter W, Conti M. Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs). *J Biol Chem.* 2002; (277): 40212-4022.
- Richter W, Jin C, Conti M. Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochem J.* 2005; (388): 803-811.
- Rock EM, Benzaquen J, Limebeer CL, Parker LA. Potential of the rat model of conditioned gaping to detect nausea produced by rolipram, a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; (91): 537-541.
- Robichaud A, Stamatiou PB, Jin SL, Lachance N, MacDonald D, Laliberté F, *et al.* Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens α 2-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis. *J Clin Invest.* 2002; (110): 1045-1052.
- Saccomano NA, Vinick FJ, Koe BK, Nielsen JA, Whalen WM, Meltz M, *et al.* Calcium-independent phosphodiesterase inhibitors as putative antidepressant: [3-(bicycloalkoxy)-4-methoxyphenyl]-2-imidazolidinones. *J Med Chem.* 1991; (34): 291-298.

- Schmiechen R, Schneider HH, Wachtel H. Close correlation between behavioural response and binding in vivo for inhibitors of the rolipram-sensitive phosphodiesterase. *Psychopharmacology*. 1990; (102): 17-20.
- Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2000; (12): 174-179.
- Souness JE, Aldous D, Sargent C. Immunosuppressive and anti inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacol*. 2000; (47): 127-162.
- Souness JE, Rao S. Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases. *Cell Signal*. 1997; (9): 227-236.
- Strada, SJ, Uzunov, P, Weiss B. Ontogenetic development of a phosphodiesterase activator and the multiple forms of cyclic AMP phosphodiesterase of rat brain. *J. Neurochem*. 1974; (23): 1097-1103.
- Tsafiriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ, Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cell: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol*. 1996; (178): 392-402.
- Torhy TJ. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; (157): 351-370.
- Torphy TJ, Barnette MS, Underwood DC, Griswold DE, Christensen SB, Murdoch RD, *et al*. Ariflo (SB 207499), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of asthma and COPD: from concept to clinic. *Pulm Pharmacol Ther*. 1999; (12): 131-135.
- Trifilieff A, Wyss D, Walker C, Mazzoni L, Hersperger R. Pharmacological profile of a novel phosphodiesterase 4 inhibitor 4-(8-Benzo[1,2,5]oxadiazol-5-yl-[1,7]naphthyridin-6-

yl)-benzoic Acid (NVP-ABE171), a 1,7-Naphthyridine Derivative, with anti-inflammatory activities. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; (321): 241-248.

- Uzunov P, Weiss B. Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972; (284): 220-226.
- Wachtel H. Characteristic behavioral alterations in rats induced by rolipram and other selective adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Psychopharmacology.* 1982; (77): 309-316.
- Wachtel H. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Neuropharmacology.* 1983; (22): 267-272.
- Wang D, Deng C, Bugaj-Gaweda B, Kwan M, Gunwaldsen C, Leonard C, *et al.* Cloning and characterization of novel PDE4D isoforms PDE4D6 and PDE4D7. *Cell Signal.* 2003; (15): 883-891.
- Wang H, Peng MS, Chen Y, Geng J, Robinson H, Houslay MD, *et al.* Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors. *Biochem J.* 2007; (408): 193-201.
- Wang C. "Phosphodiesterase-5 inhibitors and benign prostatic hyperplasia". *Curr. Opin. Urol.* 2010; (20): 49-54.
- Weiss B: Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 1975; (5): 195-211.
- Weiss B, Hait WN. Selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors as potential therapeutic agents. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1977; (17): 441-477.

- Xu RX, Hassell AM, Vanderwall D, Lambert MH, Holmes WD, Luther MA, *et al.* Atomic structure of PDE4: Insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. *Science*. 2000; (288): 1822-1824.
- Ye Y, O'Donnell JM. Diminished noradrenergic stimulation reduces the activity of rolipram-sensitive, high-affinity cyclic AMP phosphodiesterase in rat cerebral cortex. *J. Neurochem*. 1996; (66): 1894-1902.
- Yuasa K, Kanoh Y, Okumura K, Omori K. Genomic organization of the human phosphodiesterase PDE11A gene evolutionary relationship with other PDEs containing GAF domains. *Eur J Biochem*. 2001; (268): 168-178.
- Zhang KY, Card GL, Suzuki Y, Artis DR, Fong D, Gillette S, *et al.* A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Mol Cell*. 2004; (15): 279-286.
- Zhu J, Mix E, Winblad B. The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. *CNS Drug Rev*. 2001; (7): 387-398.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Implementar un sistema de evaluación *in vitro* e *in silico* de inhibidores de fosfodiesterasa tipo 4.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Establecer un sistema computacional para la evaluación *in silico* de potenciales inhibidores de fosfodiesterasa tipo 4.
- Diseñar e implementar una estrategia de clonación para la expresión de fosfodiesterasa tipo 4 recombinante.
- Evaluar la expresión de la proteína recombinante.
- Diseñar un sistema *in vitro* para la evaluación de inhibidores de fosfodiesterasa tipo 4 usando enzimas recombinantes.
- Cuantificar el efecto inhibitorio de YM-976, 524717-MERCK y rolipram sobre fosfodiesterasa tipo 4 recombinante.

RESULTADOS

5 CAPITULO 1

En este artículo se desarrollo una metodología para la clasificación de inhibidores de fosfodiesterasas de acuerdo a su mecanismo de unión utilizando un amplio grupo de compuestos para poder tener las herramientas necesarias que permitan el diseño de rutinas computacionales para la modelación de farmacóforos útiles que permita conocer las condiciones del sitio activo de esta enzima y la posición relativa que toman los inhibidores en la unión enzima-ligando. Además este farmacoforo también fue usado para la predicción de los valores de IC₅₀ para la evaluación *in silico* de nuevos inhibidores de fosfodiesterasas.

GENERATION OF PHARMACOPHORES AND DRUG CLASSIFICATION USING PROTEIN-LIGAND COMPLEXES

GENERACIÓN DE FARMACÓFOROS Y CLASIFICACIÓN DE DROGAS UTILIZANDO COMPLEJOS PROTEÍNA-LIGANDO

SOMETIDO:

REVISTA VITAE (ISSN 0121 - 4004)

Eliana P. VELÁSQUEZ¹, Neil A. VÁSQUEZ², Pablo A. GUTIÉRREZ^{1*}.

¹ Grupo de Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Colombia.

² Grupo de Biotecnología Animal. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Colombia.

* Corresponding author: paguties@unal.edu.co

ABSTRACT

Identification of pharmacophores is a very important step in *de novo* design, lead optimization, chemogenomics and virtual screening of drugs. Unfortunately, the high cost of commercial software for pharmacophore detection is a common limiting factor for researchers with limited funding. In this paper we present a set of freely available perl routines that were designed to aid in the process of 3D pharmacophore identification and QSAR studies. These routines also allowed the classification of ligands based on their tridimensional similarity and binding mechanism. As test model we used the family of phosphodiesterases and their inhibitors.

Keywords: Pharmacophore, Inhibitor, Protein, Enzyme, Drug.

RESUMEN

La identificación de farmacóforos es uno de los pasos más importantes en el diseño de novo, identificación de compuestos líder, quimiogenómica y tamizaje virtual de nuevos medicamentos. Sin embargo, el alto costo de los paquetes comerciales para la detección de farmacóforos es un factor limitante para investigadores con recursos limitados. En este artículo presentamos un conjunto de rutinas en perl que fueron diseñadas para la identificación de farmacóforos en 3 dimensiones y estudios de QSAR. Estas rutinas también permitieron una clasificación de ligandos basada en su similitud tridimensional y mecanismo de unión. La utilidad de estos programas fue probada sobre los inhibidores de la familia de las fosfodiesterasas.

Palabras claves: Farmacóforo, inhibidor, proteína, enzima, droga.

INTRODUCTION

The pharmacological effect of drugs is generally the result of their interaction with a specific protein target. Compounds with similar activities at the same enzyme or receptor must possess related properties that facilitate their specific binding. A pharmacophore is defined as the 3D arrangement of ligand features responsible for its activity (1, 2). Identification of the pharmacophore is a very important step in *de novo* design, lead optimization, ADME/TOX studies, chemogenomics and virtual screening (3-5). The simplest approach for the identification of pharmacophores is based on the alignment of protein-bound ligands and finding their common pharmacophore (1). This method also gives the highest level of resolution as the output consists of a 3D position of an atom associated with its properties (6-8). The performance and applicability of pharmacophore modeling depends on two main factors: the definition and placement of pharmacophoric features and the alignment techniques used to overlay 3D pharmacophore models and small molecules. Identification of the pharmacophore can be a tedious and cumbersome task when many protein-ligand complexes are available. In this case for this, it is necessary to superimpose available structures of the protein-ligand complexes. Unfortunately, compounds of different nature can bind to the same protein pocket and, sometimes, the same compound can bind in multiple conformations. For these reasons it is difficult to generalize the chemical features required for binding. Additionally, the high cost of commercial software for pharmacophore can be a limiting factor use for researchers with limited funding.

In this paper we present a set of freely available perl routines designed to aid in the process of 3D pharmacophore identification and QSAR studies. These routines also allow the classification of ligands based on their tridimensional similarity and binding mechanism. As test model we used the family of phosphodiesterases (PDE) and their inhibitors, which comprise a complex set of ligands that can also bind in different conformations.

MATERIALS AND METHODS

Scripts

All scripts were written in Perl 5.10 (9). Scripts and instructions on how to use them are freely available upon request to the corresponding author (ANEXO 1)

Data

Comparisons were performed on the following set of phosphodiesterase complexes obtained from the Protein Data Bank.

- **PDE3:** 1SO2, 1SOJ.
- **PDE4:** 1PTW, 2QYK, 3I8V, 1RO6, 1RO9, 1ROR, 1TB5, 1XLX, 1XLZ, 1XM4, 1XM6, 1XMU, 1XMY, 1XN0, 1XOS, 1XOT, 1Y2H, 1Y2J, 2QYL, 1MKD, 1OYN, 1Q9M, 1TB7, 1TBB, 1XOM, 1XON, 1XOQ, 1XOR, 1Y2B, 1Y2C, 1Y2D, 1Y2E, 1Y2K, 1ZKN, 2FM0, 2FM5, 2PW3, 2QYN, 3D3P, 3G45, 3G4G, 3G4I, 3G4K, 3G4L, 3G58, 3IAD, 3IAK, 3K4S, 3KKT.
- **PDE5:** 1UDT, 1UDU, 1UHO, 1T9S, 1TBF, 1XOZ, 1XP0.
- **PDE7:** 1ZKL.

A list of all ligands and their structures are shown in table 1 and figure 1

ID	Name
0CP	5-{3-[(1S,2S,4R)-bicyclo[2.2.1]hept-2-yloxy]-4-methoxyphenyl}tetrahydropyrimidin-2(1H)-one
15X	1-[4-[[2-fluoro-4-methoxy-3-(3-nitrophenyl)phenyl]methyl]phenyl]urea
20A	N-benzyl-1-ethyl-4-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylamino)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxamide
3DE	4-(ethoxycarbonyl)-3,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazol-2-iummethyl 3,5-dimethyl-1-phenyl-pyrazol-2-ium-4-carboxylate
4DE	Ethyl 1-(4-methoxyphenyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate

5DE	Ethyl 1-(4-aminophenyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate
5GP	Guanosine-5'-monophosphate
5RM	(R)-Mesopram
666	(5R)-6-(4-([2-(3-iodobenzyl)-3-oxocyclohex-1-en-1-yl]amino)phenyl)-5-methyl-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-one
6DE	Ethyl 1-(2-chlorophenyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate
7DE	Ethyl 3,5-dimethyl-1-(3-nitrophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate
8BR	8-bromo-adenosine-5'-monophosphate
988	8-(3-nitrophenyl)-6-(pyridin-4-ylmethyl)quinoline
AMP	Adenosinemonophosphate
CIA	Tadalafil
CIO	Cilomilast
CMP	Adenosine-3',5'-cyclic-monophosphate
D71	1-(3-nitrophenyl)-3-(pyridin-4-ylmethyl)pyrido[3,2-e]pyrimidine-2,4-dione
DEE	ethyl 3,5-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxylate
EV1	Papaverine
FIL	Filamilast
IBM	3-isobutyl-1-methylxanthine
M98	2-{2-[(1R)-1-[3-(cyclopropyloxy)-4-(difluoromethoxy)phenyl]-2-(1-oxidopyridin-3-yl)ethyl]-1,3-thiazol-5-yl}-1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
M99	2-{2-[(1S)-1-[3-(cyclopropyloxy)-4-(difluoromethoxy)phenyl]-2-(1-oxidopyridin-3-yl)ethyl]-1,3-thiazol-5-yl}-1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
NPV	4-[8-(3-nitrophenyl)-1,7-naphthyridin-6-yl]benzoic acid
OMO	(4R)-4-[(3-butoxy-4-methoxy-phenyl)methyl]imidazolidin-2-one
PIL	Piclamilast
ROF	Roflumilast
ROL	Rolipram
VDN	Vardenafil
VIA	Sildenafil
ZAR	Zardaverine

Table 1. Identification codes of compounds used in this study.

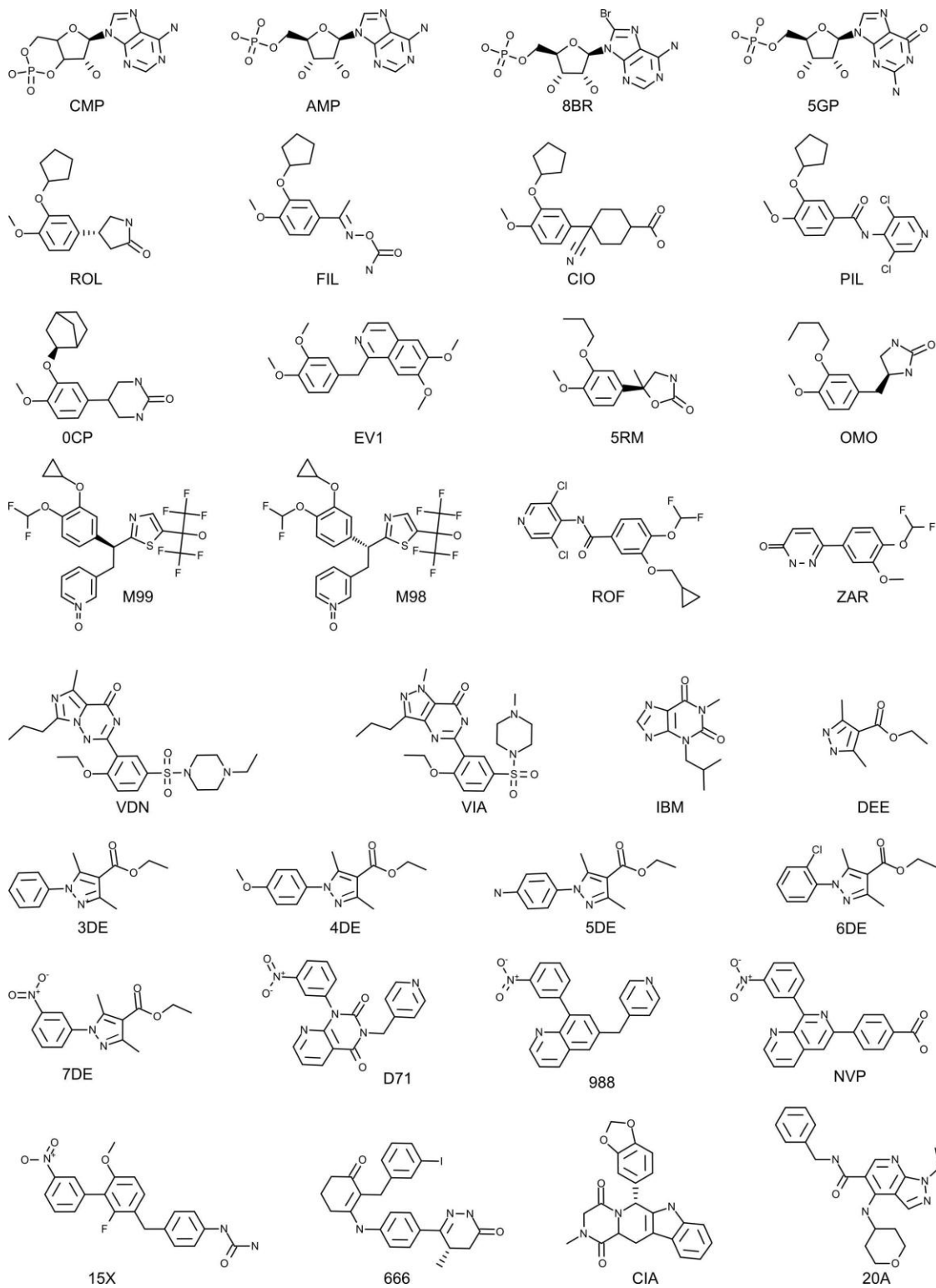


Figure 1. Chemical structures of the set compounds used in this study.

Cluster analysis

Ligands were superimposed with PyMOL (10). Dissimilarity between compounds was measured using the Jaccard distance defined by equation 1.

$$J_{\delta}(A,B) = \frac{|A \cup B| - |A \cap B|}{|A \cap B|} \quad \text{Equation (1)}$$

$|A \cap B|$ corresponds to the number of atoms closer than 0.7 Å between compounds A and B. $|A \cup B|$ is the total atom count for both compounds. Clustering was done using the Neighbor-Joining method of Nei and Saitou (11) implemented in PHYLIP (12). The tree was drawn using Dendroscope (13).

Pharmacophore detection and scoring

A total of 27 PDE4D inhibitors were used. The pharmacophore was built by sequentially averaging the position of each pair of atoms closer than a threshold distance of 1.2 Å. The total number of atoms used for each average was written into the temperature factor field of the PDB field. Atom type was assigned to the most frequent atom in the average. Scores were assigned to each inhibitor by adding the temperature field of each matching atom of the pharmacophore.

RESULTS AND DISCUSSION

Phosphodiesterases are a diverse family of enzymes that hydrolyse cyclic nucleotides that play a key role in regulating intracellular levels of the second messenger's cAMP and cGMP (14). PDEs are clinical targets for a range of biological disorders, such as congestive heart failure, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, depression, retinal degradation, and inflammation (15-17). Currently there is a great interest in developing new phosphodiesterase inhibitors with higher selectivity and lower side effects (18). Our set of routines was tested as an aid to understand the

binding mechanisms of PDE inhibitors and support the *in silico* evaluation of potential novel drugs.

A flowchart describing the sequential use of these routines is shown in figure 2.

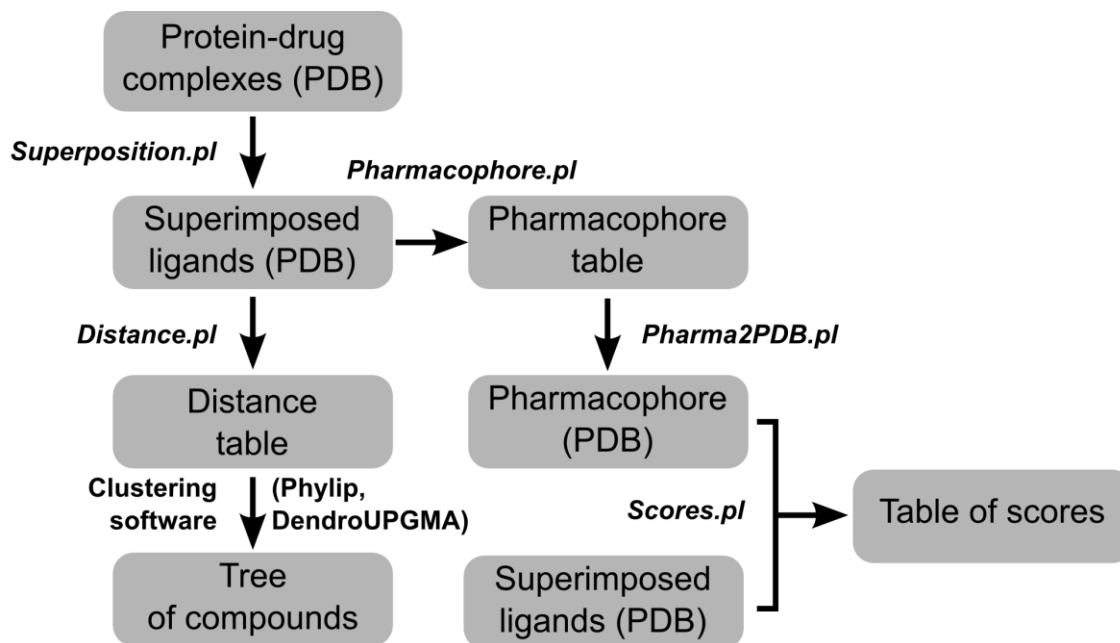
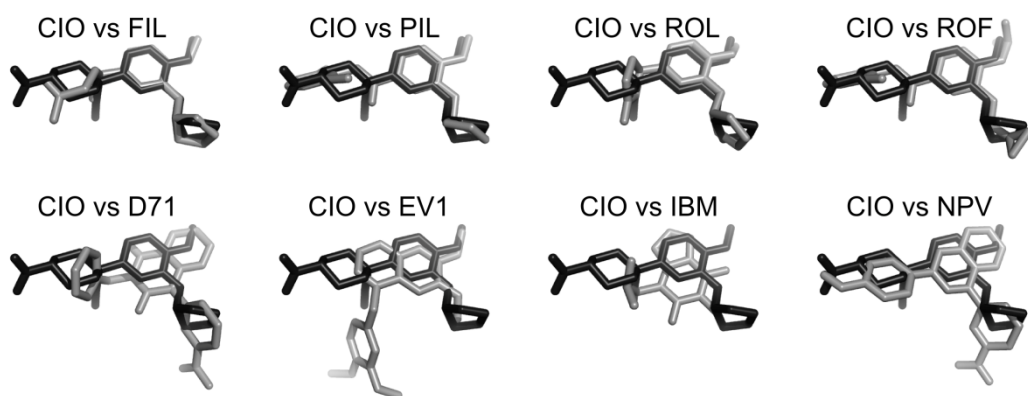


Figure 2. Flowchart explaining the input and output files of each script

Clustering of compounds.

The first set of scripts performs the structural alignment of compounds and calculates a distance matrix that can be used as input many freely available clustering software such as Phylip or dendroUPGMA (12, 19), (in figure 3). Scripts were tested using 32 PDE inhibitors from a total of 59 PDB files. However some ligands can bind to the same protein target in two or three alternative conformations (ROL, CIO, ZAR). In total, 66 ligand conformations were analyzed. As a first step, protein complexes must be superimposed. The superposition script, *superposition.pl*, produces a PyMOL routine that will automatically perform a 3D alignment on the selected structures. The output will be a set of superimposed ligands in PDB format. All protein information and other non-relevant atoms will be removed at this stage. Output files are named using the compound name,

chain id and pdb code from the protein data bank. For example, file ROL_B1OYN_lig.pdb corresponds to the rolipram (ROL) in conformation B as observed in the 1OYNpdb file. Superimposed ligands are used as input for the *distance.pl* script that will calculate the Jaccard distance for each pair of compounds. A value of zero indicates a complete 3D match correspondence for all atoms present in both ligands. A Jaccard distance of one corresponds to zero 3D matches. A match is defined as a pair of atoms separated by a distances smaller than 0.7Å. The user can adjust this threshold value. A graphical comparison of Jaccard distance between cilomilast (CIO) and some selected compounds is shown in figure 3. The output of the *distance.pl* script will be a square matrix containing the Jaccard distance for each pair of compounds saved as a *distance.tbl* file (in figure 3).



CIO_A1XLX	0.0000	0.7736	0.8400	0.2174	0.8537	0.8462	0.4400	0.5294	0.4667
D71_A3G4I	0.7736	0.0000	0.8868	0.7551	0.9091	0.8909	0.8491	0.8519	0.7500
EV1_A3IAK	0.8400	0.8868	0.0000	0.7826	0.8537	0.7692	0.8400	0.7255	0.9111
FIL_A1XLZ	0.2174	0.7551	0.7826	0.0000	0.8378	0.8333	0.5217	0.4894	0.2195
IBM_A1ZKN	0.8537	0.9091	0.8537	0.8378	0.0000	0.8140	0.8537	0.8571	0.8333
NPV_A2QYN	0.8462	0.8909	0.7692	0.8333	0.8140	0.0000	0.8077	0.8113	0.8298
PIL_A1XM4	0.4400	0.8491	0.8400	0.5217	0.8537	0.8077	0.0000	0.0980	0.6000
ROF_A1XMU	0.5294	0.8519	0.7255	0.4894	0.8571	0.8113	0.0980	0.0000	0.4783
ROL_A1Q9M	0.4667	0.7500	0.9111	0.2195	0.8333	0.8298	0.6000	0.4783	0.0000

Figure 3. Graphical illustration of the Jaccard distance between cilomilast and some selected compounds (above). The corresponding *distance.tbl* file is shown below.

Compounds were clustered using the *distance.tbl* file and the Neighbor-Joining algorithm (11). Nine well-defined sets of compounds, A-H, were obtained (in figure 4). Cluster A corresponds to

rolipram and new generation inhibitors sharing the 4-methoxy-phenyl substructure. Depending on the type of substituents and PDE type, this cluster can be further divided into 5 distinct subsets (A1-A5). It is evident that rolipram can bind in many different conformations, as reported previously (20). Cluster B groups inhibitor NVP bound to different phosphodiesterases. As reported in literature, the active sites of PDE4B and PDE4D are mostly comparable. However, PDE4A shows significant displacements of the residues next to the invariant glutamine residue that is critical for substrate and inhibitor binding (21). The difference between PDE4A, PDE4B and PDE4D is clearly seen in tree, where PDE4A (NPV_A2QYN) is an out group of compounds PDE4B (NPV_A2QYL) and PDE4D (NPV_2QYK). Cluster C is comprised by zardaverine (ZAR) and papaverine (EV1). These compounds form an independent branch because share the Dialkoxypheyl group present in rolipram but bind PDEs with lower affinity. These compounds fill only a portion of the active site pocket and lack additional functional groups that can utilize the remaining empty space (22). Clusters D and G group vardenafil (VDN) and sildenafil (VIA). These clusters correspond to complexes with PDE4B and PDE5 respectively. The binding mechanism for these compounds is highly dependent on the type of phosphodiesterase. This is why the same compound belongs to two different clusters. Inhibitors from cluster E include compounds with a 3-nitrophenyl group such as 988, D71 and 15X. In spite of being very similar to NPV, these compounds are bulkier and require a different binding conformation (23). Cluster F comprises compounds 1-7DEE, which have a pyrazole carboxylic ester scaffold with substitutions at three sites (24). Finally, cluster H is composed by nucleotides and analogs. Four compounds did not cluster into any group: tadalafil (CIA), IBMX (IBM), 666 and 20A. An illustration of all clusters is shown in figure 5.