

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

**Validazione di un metodo per identificare potenziali inibitori di HDAC per il
trattamento dell'Alzheimer**

Relatore

Prof. Alberto Massarotti

Alberto Massarotti

Candidato

Riccardo Fontana

Anno Accademico 2022-23

Sessione Straordinaria

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	5
1.1.HDACs: istone deacetilasi.....	6
1.1.1. Struttura e classificazione.....	8
1.2. Tasca di legame	11
1.2.1 Profilo di flessibilità	13
1.3 HDACi: Inibitori delle istone deacetilasi	15
1.4. HDACs e Alzheimer	17
2. SCOPO DEL LAVORO.....	21
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	25
3.1. Idea del progetto.....	27
3.2. Ricerca di isoforme di HDAC cristallizzate	28
3.3. Confronto dei cristalli con PyMol.....	29
3.4. Il docking.....	32
3.4.1 Tautomers.....	32
3.4.2. Omega	33
3.4.3. Babel2.....	34
3.4.4. Make_receptor.....	34
3.4.5. Fred.....	36
3.5. Database ChEMBL.....	38
3.6. Filter	39
3.7. Criticità ed errori	40
3.8. Accuratezza del metodo	41
3.8.1. DUD-E e DUDE-Z.....	41
3.8.2. Curve ROC	42
3.8.3. Fattore di arricchimento (EF).....	46
3.9. Database ZINC15	48
4. CONCLUSIONI.....	51
5. MATERIALI E METODI	55
5.1. Lo script.....	57
6. BIBLIOGRAFIA.....	91
7. RINGRAZIAMENTI	95

1. INTRODUZIONE

1.1.HDACs: istone deacetilasi

Le istone deacetilasi sono degli enzimi appartenenti alla famiglia delle idrolasi, ed hanno la funzione di rimuovere il gruppo acetile dalle lisine acetilate delle proteine istoniche. Sono perciò un elemento importante nella regolazione genica, poiché rimuovendo i gruppi acetili sui residui di lisina aumenterà la carica positiva delle code degli istoni e di conseguenza si condenserà la struttura del DNA e verrà impedita la trascrizione.

L'azione delle HDACs è opposta a quella delle HAT ovvero le istone acetiltransferasi, cioè gli enzimi che provocano l'acetilazione dei residui di lisina spiazzando le cariche positive presenti sui gruppi amminici e trasformandoli in ammidi, diminuendo così la capacità degli istoni di legarsi al DNA e permettendo l'espansione della cromatina e di conseguenza il processo di trascrizione genica (figura 1).¹



Figura 1: funzioni di HATs e HDACs nel processo di rimodellamento del DNA.²

L'espressione delle HDACs è deregolata in patologie come cancro, disordini immunitari e neurologici. La loro anormale regolazione in molte cellule neoplastiche modifica l'espressione dei geni oncosoppressori, impedendo alle cellule di andare in apoptosi e promuovendo perciò lo sviluppo del tumore.

1.1.1. Struttura e classificazione

Le HDACs sono una famiglia di idrolasi Zinco(II)-dipendenti, poiché all'interno del loro sito attivo è presente un atomo di zinco bivalente.

Le HDACs umane sono una famiglia di 11 isoforme enzimatiche zinco dipendenti classificate in quattro classi sulla base dell'omologia nella loro sequenza genica con le proteine del lievito: Hda1 e Rpd3.

Hda1 gioca un ruolo di primaria importanza nella regolazione dell'espressione genica coinvolta nel trasporto e nell'utilizzo dei carboidrati, mentre Rpd3 è il principale regolatore dei processi di trascrizione collegati alla progressione del ciclo cellulare.³

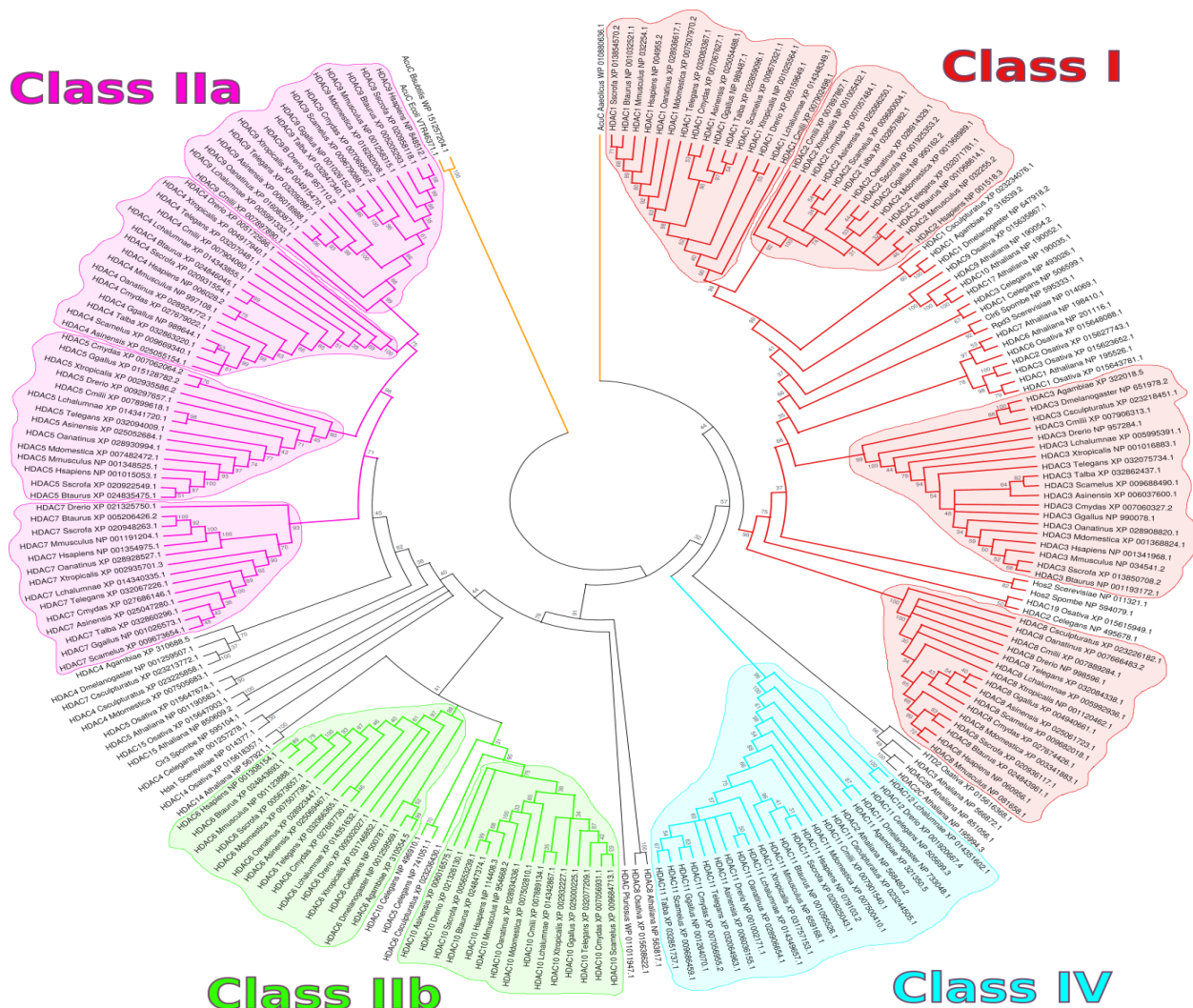


Figura 2: albero topologico filogenetico della famiglia delle HDACs.³

Si tratta di una famiglia di enzimi estremamente conservata con diversi omologhi diffusi in tutti gli organismi eucarioti (figura 2).

L'interconnessione tra le HDACs ed i pathways cellulari venne scoperta nel 1997, quando fu dimostrato che l'overespressione di HDACs in cellule di topo portava all'arresto del ciclo cellulare, e la prima HDAC fu scoperta nel 1998 e fu chiamata HDAC 1, e la completa caratterizzazione della famiglia delle HDACs di Homo Sapiens fu completata nel 2002 (tabella 1).

Successivamente vennero scoperte altre isoforme relative anche ad altri organismi eucarioti e procarioti.³

CLASSE	ISOFORMA
Classe I	HDACs 1,2,3,8
Classe II A	HDACs 4,5,7,9
Classe II B	HDACs 6,10
Classe III	Sirtuine
Classe IV	HDAC 11

Tabella 1: tabella delle classi di HDACs.

1.1.1.1 Classe I

La classe I include le isoforme HDAC 1, 2, 3 e 8, e si tratta di HDACs localizzate nel nucleo cellulare e tutte quante deacetilano il core istonico, regolando finemente la trascrizione genica. Esse possono deacetilare molti residui di lisina sulle code degli istoni, e molti di questi ultimi vengono deacetilati da più di una HDAC classe I.

Un'altra particolarità è che principalmente le HDACs di classe I sono presenti ed operano all'interno di complessi proteici; spesso per funzionare molte HDAC sono associate a corepressori multi proteici come per esempio l'inositolo tetrafosfato, una piccola molecola che funge da collante tra HDAC e corepressore (figura 3).³

1.1.1.2 Classe IIa

La classe II include le isoforme HDAC 4, 5, 7 e 9, e si tratta di HDACs in grado di transitare tra nucleo e citoplasma, sono perciò definite HDACs nucleocitoplasmatiche. Questo transito nucleare è causato dalla fosforilazione di uno specifico residuo di serina in grado di legare delle molecole regolatrici note come proteine 14-3-3; queste ultime interagiscono con le HDACs IIa e sono in grado di mascherare il segnale di localizzazione nucleare (NLS) o di smascherare il segnale di export nucleare (NES).

Rispetto alle HDACs di classe I le HDACs di classe IIa possiedono una inferiore attività catalitica sulle lisine acetilate delle code degli istoni, e ciò è causato dalla sostituzione di un residuo amminoacidico sulla Tirosina 345 la quale viene rimpiazzata da un residuo di Istidina, la cui catena laterale è troppo corta per raggiungere il sito attivo. La sostituzione Tyr-His non impatta però sull'impatto che ha questa classe di HDACs sulla repressione della trascrizione genica (figura 3).³

1.1.1.3 Classe IIb

La classe IIb include le isoforme 6 e 10 e si tratta di HDACs citoplasmatiche ed i loro target sono principalmente le proteine non-istoniche. HDAC 6 presenta due domini per la deacetilasi noti come CD1 e CD2 ed un dominio zinc finger c-terminale che mostra una elevata affinità per il legame di proteine poliubiquitinate.

Entrambi i domini CD possiedono una attività catalitica con CD1 che esercita la sua azione prevalentemente sulle lisine acetilate del C-terminale, mentre CD2 esercita la sua azione su qualsiasi lisina acetilata. HDAC 6 è in grado anche di stabilizzare i microtubuli andando a deacetilare l'alfa tubulina ed è inoltre in grado di controllare l'attività della proteina pro-apoptotica p53 andando a deacetilare la acetil-lisina 381/382.

L'isoforma 10 è meno conosciuta, ma essa è coinvolta nel metabolismo delle poliammine, che sono molecole molto importanti in vari processi biologici i quali se deregolati portano allo sviluppo di neoplasie. Sebbene con una attività inferiore rispetto all' isoforma 6 HDAC 10 esplica la sua attività di deacetilasi su proteine citosoliche come Hsc70/Hsp70 e media il processo di autofagia per la sopravvivenza cellulare (figura).³

1.1.1.4 Classe III

La classe III include una particolare tipologia di HDACs note come sirtuine. Esse a differenza delle altre isoforme non sono zinco dipendenti ma NAD dipendenti, ed invece di idrolizzare i residui di acetil-lisina le sirtuine mediano una coppia di reazioni di acetilazione della lisina e di idrolisi del NAD, andando a produrre il substrato deacetilato e nicotinammide che sono inibitori dell'attività delle sirtuine.³

1.1.1.5 Classe IV

La classe IV include solo l'isoforma 11 la quale è stata scoperta recentemente, perciò non sono stati ancora ben caratterizzati i suoi substrati e le sue funzioni non sono state ancora del tutto capite.³

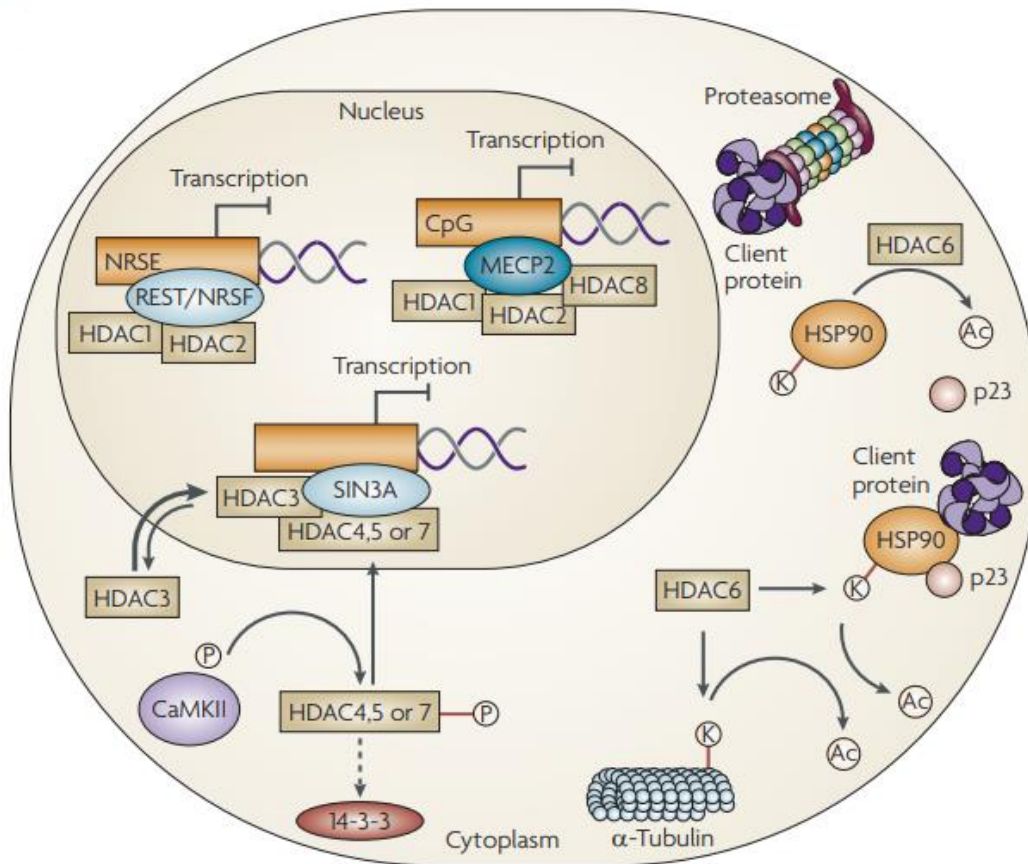


Figura 3: rappresentazione degli effetti delle HDACs nel nucleo e nel citoplasma.²

1.2. Tasca di legame

Nel loro sito attivo le HDACs grazie all'atomo di zinco legano una lisina N-acetilata, e a seguito del legame il gruppo N-acetile viene attaccato da una molecola d'acqua che produce una lisina deacetilata e acido acetico.

La tasca di legame delle HDACs risulta anch'essa essere molto conservata, con pochissime differenze tra le varie isoforme.

Strutturalmente le HDACs condividono come tasca di legame un canale di 11 Å che include un atomo di zinco bivalente responsabile della attività di deacetilasi, e tale struttura risulta essere ampiamente conservata in tutte le isoforme di HDACs. L'accesso all'atomo di zinco avviene proprio tramite questo canale il quale accomoda i quattro carboni della catena laterale delle

lisine, mentre la superficie esterna interagisce con altri residui del substrato da deacetilare, contribuendo alla stabilità del sistema durante il processo.

Molto importante però è la presenza delle HDACs di classe I di un secondo canale che misura 14 Å perpendicolare al primo, molto conservato tra le isoforme di questa classe; questo canale viene chiamato cavità interna e la sua funzione è quella di permettere, a seguito di deacetilazione, l'uscita dell'acetato dal sito catalitico.¹

Un canale dalla struttura così conservata rende difficile la progettazione di inibitori selettivi su una specifica isoforma, perciò si ritiene che il l'estremità più superficiale del canale da 11 Å sia il sito perfetto per lo sviluppo di potenziali inibitori selettivi per le HDACs, poiché all'entrata del canale si hanno le principali differenze tra residui amminoacidici.

Nella classe I l'accesso al canale è anche estremamente conservato ed è delineato da due fenilalanine che generano un'interazione π -stacking e il sito di coordinazione dello zinco è altamente conservato in tutte le isoforme.

Piccole differenze si riscontrano sulla superficie esterna nelle isoforme 3 e 8 rispetto alle altre HDACs 1 e 2, i cui residui chiave sono Lys33, Ile34, Tyr100, Pro205, Pro273, Met274, Ser276. La Tyr204/209 in HDAC1/2 è rimpiazzata da Phe199/207 in HDAC3/8. La presenza di Gly206 permette alla seguente Pro205 di essere nella stessa posizione di Asn203/208 in HDAC1/2 e di Asn197 in HDAC3. Altre differenze chiave in HDAC8 sono Lys33 al posto della istidina e la Tyr100 che va a sostituire Glu98/104 in HDAC1/2 e Asp92 in HDAC3. Infine a livello dell'entrata del canale le altre modifiche nell'isoforma 8 sono Ile34, Pro273, e Met274 che sostituiscono rispettivamente Pro, Arg e Leu nelle altre isoforme di classe I (figura 4).

Per le isoforme di classe II HDAC 4,6 e 7 condividono la stessa configurazione del sito attivo catalitico, ma differiscono al di fuori della tasca di legame con lo zinco. La principale differenza si riscontra sul residuo donatore di protoni coinvolto nel meccanismo di idrolisi che è una Tyr293 in HDAC 6 mentre è una istidina in HDAC4/7. HDAC 4 e 7 possiedono inoltre un secondo atomo di zinco che non è conservato nel modello di omologia dell'isoforma 6.¹

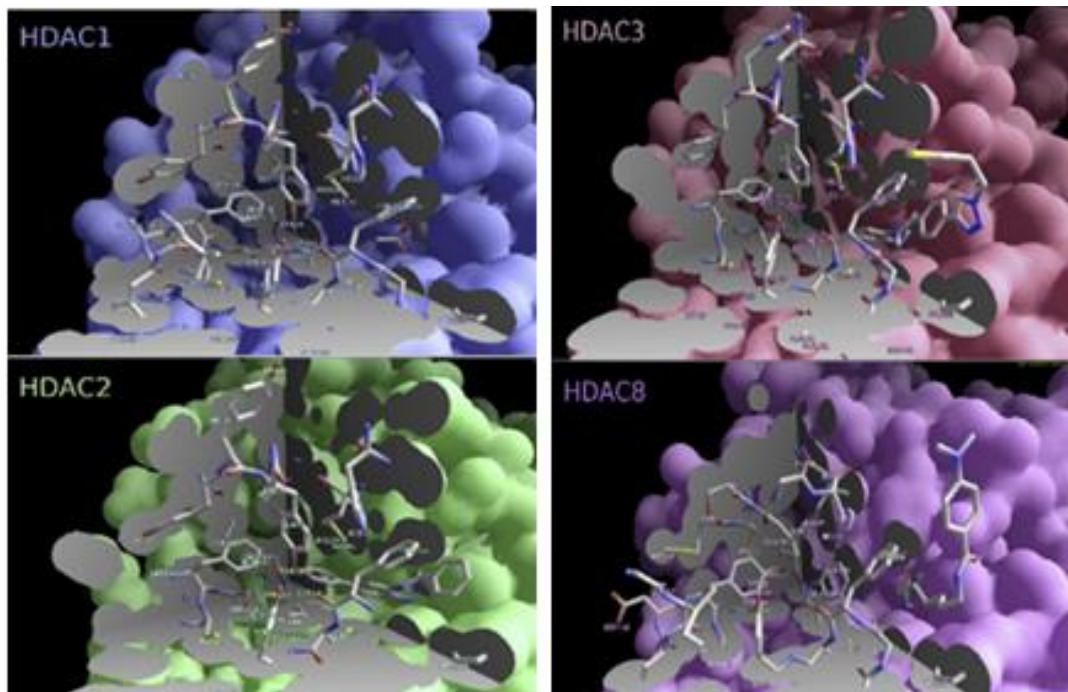
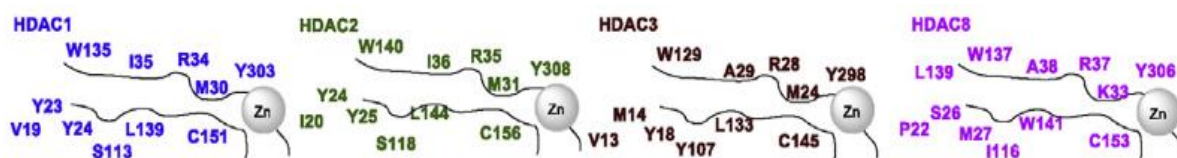


Figura 4: cavità interne di HDACs di classe I.¹

1.2.1 Profilo di flessibilità

Il profilo di flessibilità delle HDACs ci permette di comprendere i loro aspetti dinamici che sono alla base della loro attività catalitica, ed è uno dei punti di partenza per progettare nuovi inibitori selettivi.

Il profilo meglio caratterizzato è quello dell'isoforma 8, in cui sono stati osservati due importanti cambiamenti conformazionali, in cui vediamo coinvolti movimenti di massa che coinvolgono intere regioni della proteina, e movimenti definiti one-off in cui si ha una variazione di una singola catena amminoacidica.

Tramite studi di allineamento dei cristalli di HDAC 8 si è osservato che il sito di legame può convertirsi da uno stadio wide-open, in cui si avrà una grande tasca aperta ad uno stadio sub-open in cui si avrà una prima cavità adiacente al tunnel da 11 Å il quale è lo stadio conformazionale chiuso; queste transizioni sono in equilibrio e sono una conseguenza del legame con il ligando, sia esso il substrato o l'inibitore (figura 5).⁴

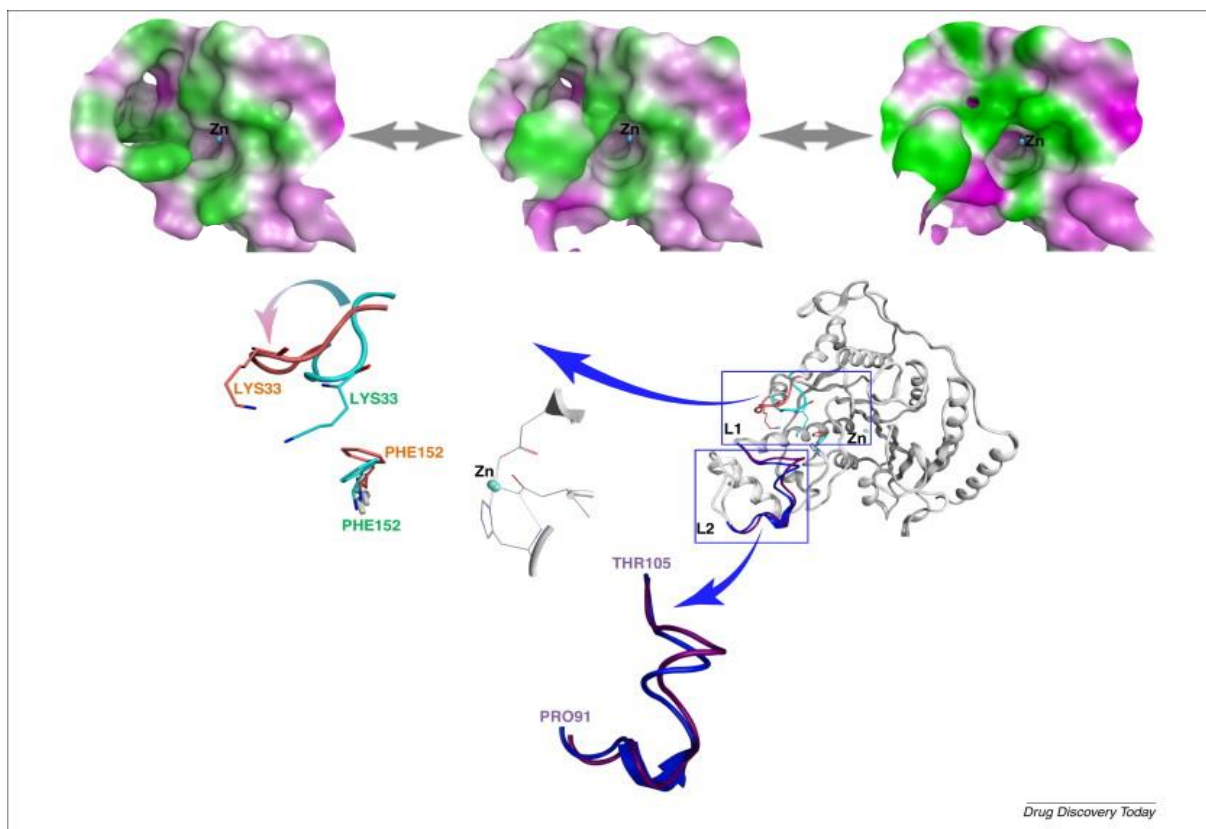


Figura 5: cambi conformazionali in HDAC 8.⁴

Sono stati identificati due loop in HDAC 8: L1 che comprende 7 residui tra Ser30 e Lys36, e L2 che comprende residui tra Pro91 e Thr105.

L1 si muove esternamente dal sito catalitico al fine di allargare la cavità di ingresso, oppure internamente per occludere ogni cavità adiacente e creare lo stadio conformazionale chiuso, in cui solo la cavità da 11 Å è accessibile.

I residui amminoacidici più importanti sono Tyr306 che costituisce il fondo del canale da 11 Å ed è coinvolto nel riconoscimento del ligando. Phe152 può essere avvicinato alla catena laterale di Lys33 da L1 andando ad occludere la seconda cavità dello stadio sub-open, oppure può essere ruotato lontano da Lys33 in una posizione lontana 6 Å creando così lo stadio wide-open.

Per quanto riguarda le isoforme 1 e 2 sono state riscontrate diverse cavità nel ruolo di gatekeeper o di canali di uscita per l'acetato.

L'ingresso della cavità da 11 Å è delimitato da un muro aromatico formato da una serie di fenilalanine poste frontalmente, Phe150/Phe155 e Phe205/Phe210; inoltre il canale di uscita in HDACs 1 e 2 è mediato da un meccanismo zip-on zip-off che consiste nell'inclinare un

residuo di tirosina verso uno di fenilalanina.

Una delle lievi differenze tra queste due isoforme consiste in una cavità presente unicamente in HDAC 1 che permette l'uscita del ligando per mezzo di due aminoacidi gatekeeper che sono Met30 e Tyr303.⁴

1.3 HDACi: Inibitori delle istone deacetilasi

Data l'importanza di questi enzimi sono stati progettati inibitori che andassero ad agire sulla loro capacità di deacetilare i residui di lisina, al fine di evitare il silenziamento della trascrizione genica.

Gli HDACi agiscono andando ad interagire con la tasca di legame in cui è presente lo zinco bivalente, inibendo in maniera competitiva l'enzima.

Il primo componente del gruppo farmacoforico deve essere uno zinc binding group (ZBG). I gruppi più utilizzati sono gli acidi carbossilici, i tioli, le benzamidi, gli acidi idrossamici, i trifluorometilchetoni, e i tetrapeptidi ciclici (figura 6).¹

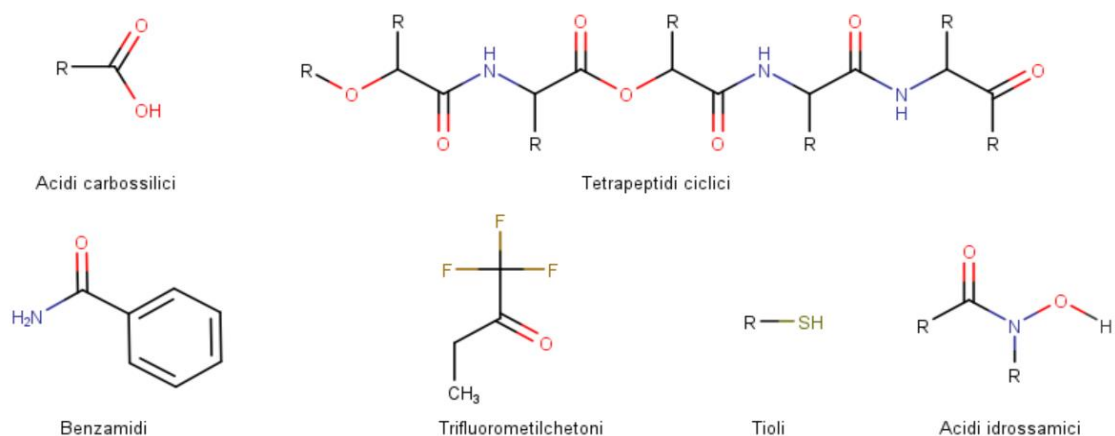


Figura 6: ZBGs maggiormente utilizzati in inibitori delle HDACs.

Il secondo componente deve essere un linker a cui ZBG deve essere collegato; lo scopo del linker è quello di mimare la catena laterale della lisina andando a riempire l'accesso tubulare allo ione zinco. Infine il terzo componente sarà un cap-group di struttura aromatica, che si troverà in fondo al linker e che andrà ad interagire con la superficie esterna del sito di legame (figura 7).¹

Ad oggi sono stati approvati solo 4 inibitori delle HDACs, e tre di questi esprimono la naturale capacità degli acidi idrossamici di chelare lo zinco: Vorinostat, Belinostat e Panobinostat.

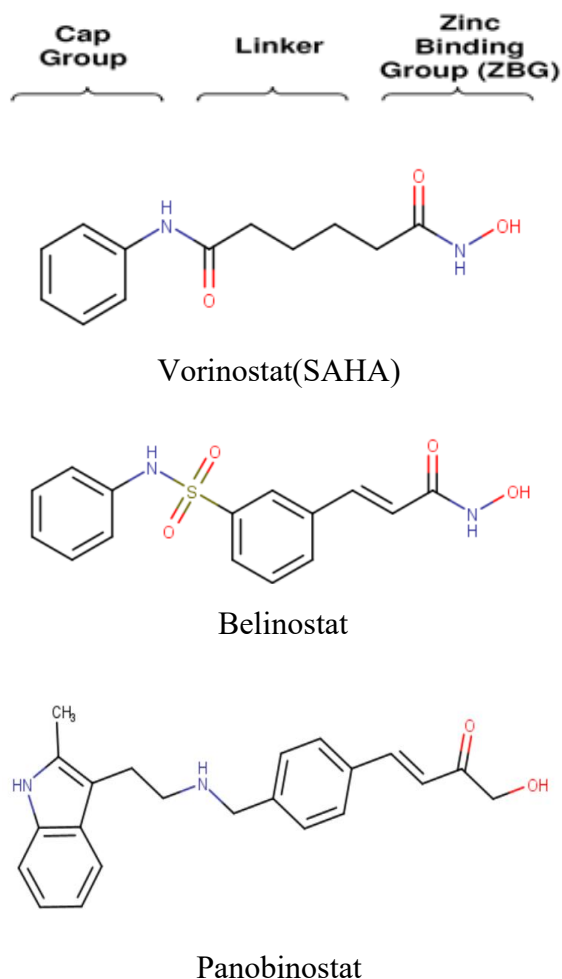


Figura 7: i tre HDACi con approvati con acido idrossamico come ZBG.

Gli inibitori di questo tipo presentano un problema di stabilità in vivo e vengono rapidamente metabolizzati; il SAHA possiede un'emivita molto breve inferiore alle due ore, e subisce successivamente glucuronazione. Per ovviare a ciò vengono quindi formulate delle prodrugs o si lavorano nuove strategie per il rilascio del farmaco, ma risulta ancora complicato risolvere il problema della selettività degli inibitori nei confronti delle HDACs, mostrando una attività pleiotropica con conseguenze spesso indesiderate ed imprevedibili.¹

1.4. HDACs e Alzheimer

Il morbo di Alzheimer è una tipologia di demenza degenerativa caratterizzata da un danno cognitivo permanente e dalla perdita di memoria.

La sua eziologia non è ancora chiara ma si sa che il deposito anormale della proteina amiloide- β è neurotossico e nel tempo provoca cambiamenti patologici che danneggiano la corteccia cerebrale e provocano l'apoptosi delle cellule nervose.

Per contrastare il morbo di Alzheimer si è pensato di agire alla base dei meccanismi epigenetici in particolare su metilazione del DNA, modificazioni di microRNA e l'acetilazione delle proteine istoniche; queste ultime sono una unità fondamentale della cromatina, la cui struttura dipende fortemente dalle modificazioni sugli istoni (figura 8).

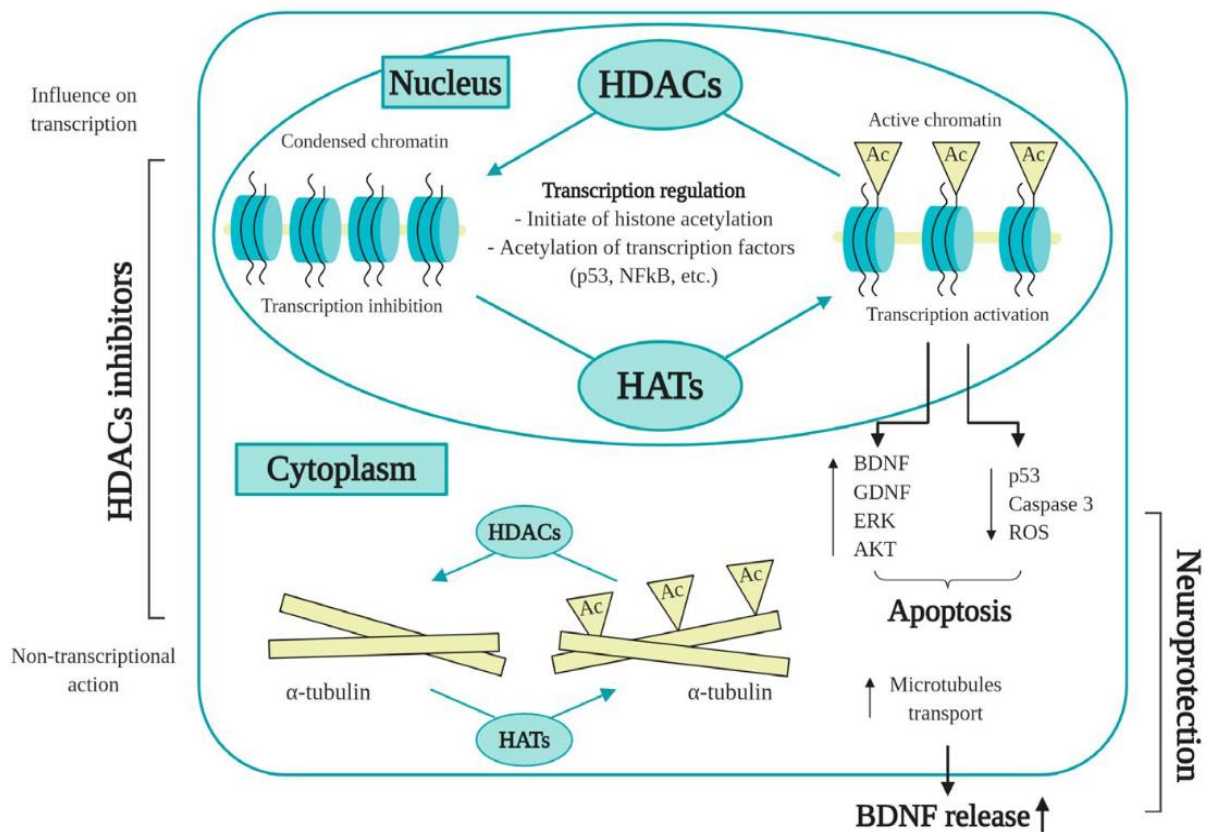


Figura 8: azione degli HDACi nella cellula in patologie neurodegenerative.⁶

In neuroni sani l'attività di HATs e HDACs è bilanciata, tuttavia questa omeostasi viene alterata in caso di stadio neurodegenerativo.

Le isoforme di HDACs maggiormente coinvolte nello studio di nuovi inibitori per contrastare il morbo di Alzheimer sono HDAC 1 e 2, ma a causa della loro grande omologia strutturale la più grande sfida resta quella di poter progettare inibitori selettivi, limitando così effetti collaterali indesiderati ed aumentando l'efficacia della terapia.⁷

Ciononostante queste due isoforme svolgono compiti diversi: da studi condotti in laboratorio su modelli di topo si è verificato che l'overespressione di HDAC 2 provoca danni alla memoria, inoltre HDAC 2 è stata identificata come il principale target del Vorinostat.

HDAC 1 interagisce con un complesso noto come SIRT1 il quale promuove la stabilità genomica nei neuroni; la sua azione neurotossica dipende dalla sua localizzazione a livello subcellulare. Infatti HDAC 1 induce il blocco del trasporto a livello assonale quando è esportata dal nucleo al citoplasma, dove si lega a proteine di movimento quali chinesine ed α -tubulina, causando danni nel trasporto mitocondriale nei neuroni danneggiati.

Per HDAC 3 è stato dimostrato che la sua overespressione induce la morte nei neuroni della corteccia e nella zona del cervelletto. L'effetto tossico di HDAC 3 si manifesta tramite l'azione di una chinasi nota come chinasi glicogeno sintasi 3 β (GSK-3 β) e la presenza di HDAC 1.

Per quanto riguarda le HDACs di classe II la più importante è HDAC 6 la quale, a causa della sua localizzazione citoplasmatica agisce su proteine non istoniche quali HSP-90, α -tubulina, β -catenina, e la proteina Tau.

in pazienti affetti da morbo di Alzheimer HDAC 6 è overespressa a livello della corteccia e dell'ippocampo; essa non è direttamente coinvolta nella regolazione della memoria e dei processi cognitivi, ma nella deacetilazione della proteina Tau, promuovendo così il suo accumulo e la sua tossicità. I residui di lisina grazie alle loro interazioni elettrostatiche ed idrofobiche giocano un ruolo chiave nell'accumulo di Tau (figura 9).

Si è inoltre osservato che una diminuzione dell'attività di HDAC 6 riduce la fosforilazione di Tau e favorisce la sua eliminazione.⁸

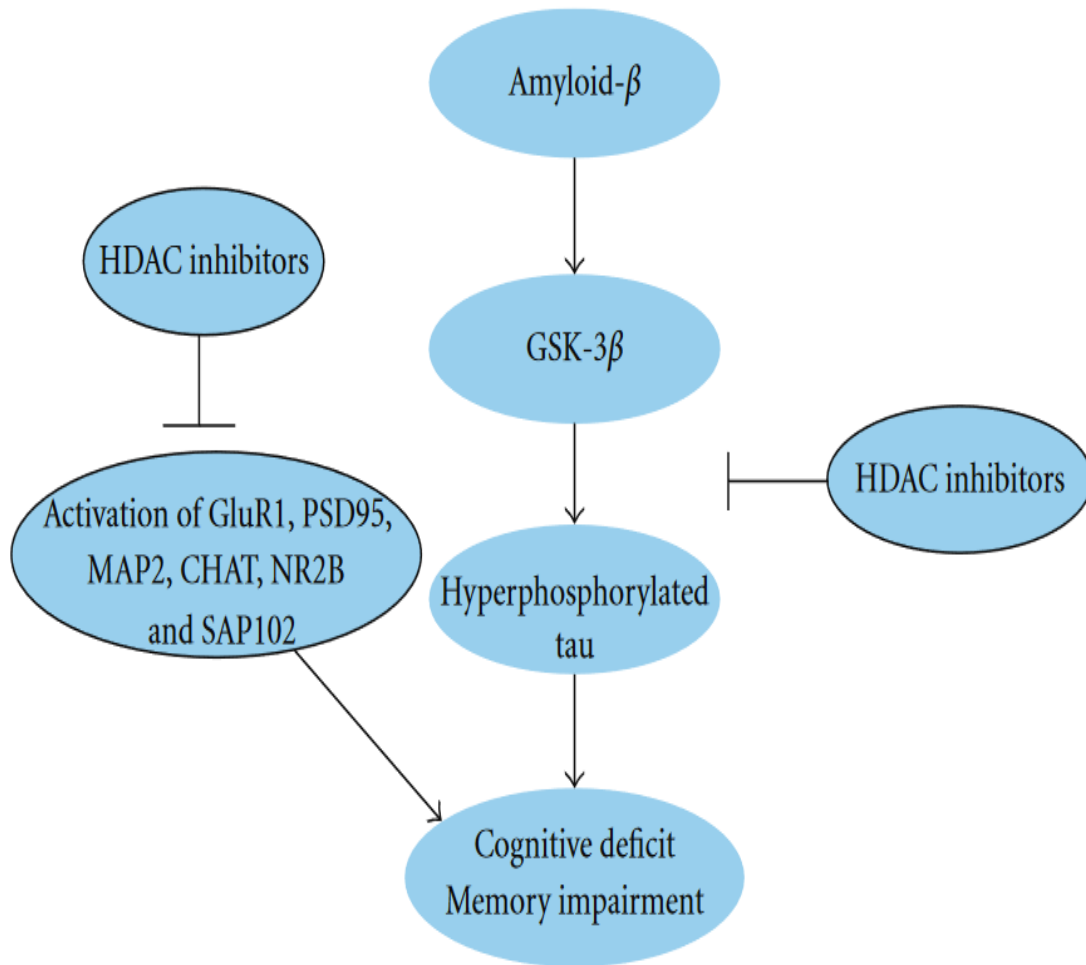


Figura 9: ruolo degli HDACi nel morbo di Alzheimer.⁹

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo progetto è quello di sperimentare e validare l'efficacia di un metodo, utilizzando programmi a riga di comando per il docking, il quale sia in grado di identificare i migliori compounds da una libreria di molecole.

Il metodo sarà validato effettuando un virtual screening partendo da una struttura cristallizzata di HDAC umana e utilizzando come input diversi database di molecole, tra cui farmaci attualmente in commercio e decoys generati a partire da molecole esistenti o in fase di studio. L'obiettivo finale è quello di validare un metodo che sarà in grado di generare un output di molecole con il migliore score tra tutte quelle del database di partenza; tale output finale di molecole fornirà un supporto importante ai chimici, i quali potranno lavorare a modificazioni della struttura chimica di molecole esistenti risparmiando una grande quantità di tempo.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Idea del progetto

L'idea alla base del progetto è di validare e sperimentare un metodo di virtual screening che sia in grado di processare un cospicuo database di molecole, effettuando il docking su cristalli di HDAC umana maggiormente coinvolti nel morbo di Alzheimer, e quindi selezionare i compounds con le migliori caratteristiche chimico fisiche e con le migliori modifiche strutturali, al fine di facilitare il lavoro dei chimici nella prima fase di ricerca di nuovi inibitori selettivi per HDAC (figura 10).

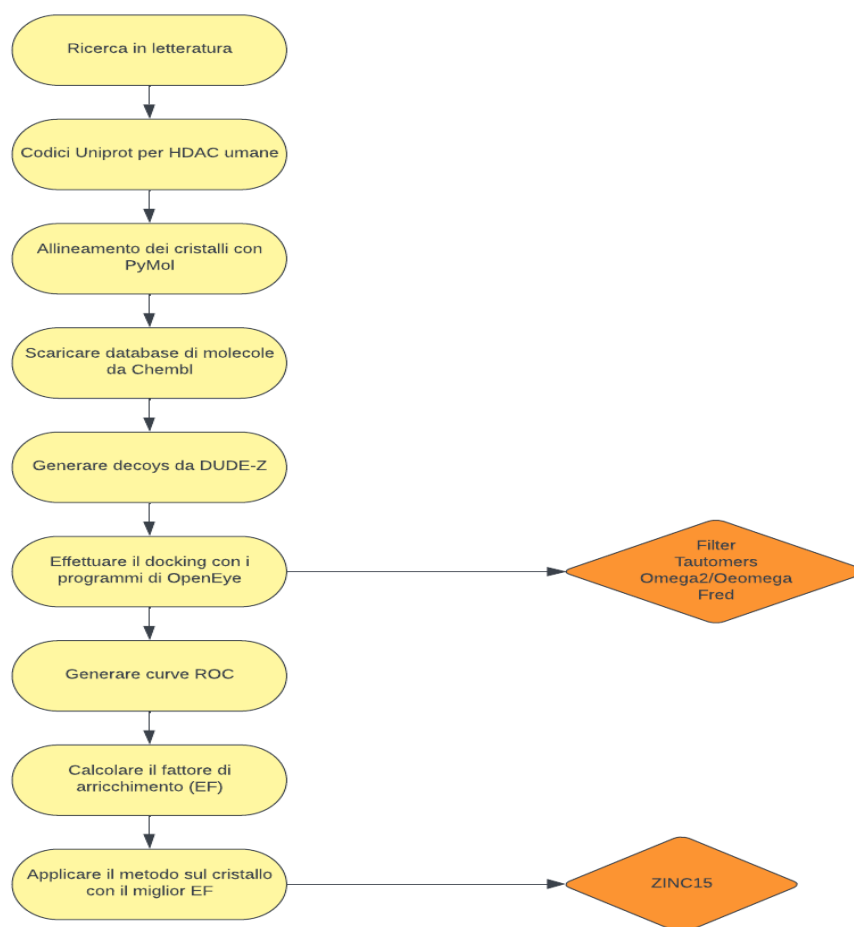


Figura 10: schema del metodo.

3.2. Ricerca di isoforme di HDAC cristallizzate

La prima fase del progetto inizia con la ricerca delle isoforme di HDAC umane che sono state cristallizzate, e per farlo si deve risalire al codice UniProt di ciascuna isoforma.

UniProt è il più grande database informatico per le sequenze proteiche di tutti gli organismi viventi e dei virus¹⁰.

Con una semplice ricerca online si è risaliti agli otto codici UniProt delle prime otto isoforme di HDAC umane; digitando i codici nella barra di ricerca di UniProt si ottengono informazioni riguardanti nomenclatura, tassonomia, struttura, sequenza genica ed isoforma.

La sezione di interesse è “Struttura” in cui viene fornita un’immagine dell’enzima cristallizzato, e sono indicati tutti i codici PDB relativi all’isoforma desiderata.

I codici PDB sono composti da 4 caratteri alfanumerici e indentificano i cristalli delle isoforme presenti su un database chiamato Protein Data Bank, il quale è un archivio per dati di struttura in 3D di proteine e acidi nucleici.

Per ognuna delle otto isoforme sono stati tabulati tutti i cristalli presenti sul Protein Data Bank, ma sulla base dello studio in letteratura si è riscontrato che le HDAC1 e HDAC2 sono quelle maggiormente coinvolte nelle cause dello sviluppo del morbo di Alzheimer perciò si è stabilito di continuare il lavoro su queste due isoforme.

HDAC1 è stata cristallizzata solo assieme a complessi multimerici, come NuRD oppure complessata con Inositolo-6-fosfato, e senza alcun ligando presente nella tasca di legame. HDAC2 invece possiede moltissimi cristalli in cui sono evidenziati dei ligandi nella tasca di legame; per questa ragione, e in virtù dell’elevata analogia strutturale delle due isoforme si è stabilito di lavorare esclusivamente su HDAC2 (tabella 2).

CODICE PDB	LIGANDO	RISOLUZIONE
4LXZ	SAHA(VORINOSTAT)	1,85 Å
3MAX	N-(2-ACETAMINOFENE)BENZAMIDE	2,05 Å
5IWG	BRD4884	1,66 Å
5IX0	BRD7232	1,72 Å
6WBZ	ETIL CHETONE	1,32 Å
6WBW	ETIL CHETONE CON GRUPPO SPIROCICLICO	1,46 Å
6XDM	ARIL CHETONE	1,56 Å
6XEB	CHETONE (COMPOUND E)	1,50 Å
6XEC	CHETONE (COMPOUND O)	1,70 Å
7JS8	ETIL CHETONE (COMPUND 22)	1,63 Å
7KBG	BENZAMIDE (COMPOUND 20)	1,26 Å
7LTG	APICIDINA	1,80 Å
7MOS	INIBITORE MACROCICLICO	1,70 Å
7MOT	COMPOUND 9	1,54 Å
7MOX	COMPOUND 14	1,69 Å
7MOY	COMPOUND 19	1,78 Å
7MOZ	COMPOUND 25	1,54 Å

Tabella 2: codici PDB di HDAC2 e relativi ligandi.

3.3. Confronto dei cristalli con PyMol¹¹

Confrontare i cristalli di HDAC2 tra di loro è fondamentale per capire se il ligando di ciascun cristallo si trova all'interno della tasca di legame per lo zinco e per capire quali amminoacidi sono coinvolti nei legami che si formano nel sito attivo dell'enzima.

Per farlo si utilizza un programma di visualizzazione molecolare chiamato PyMol, il quale è un software di grafica 3D utilizzato per la rappresentazione delle biomolecole; inserendo i codici PDB in PyMol si avrà l'immagine della proteina cristallizzata e si potrà mettere in evidenza il ligando nella tasca di legame. Infine si utilizzerà la funzione di allineamento dei cristalli per verificare se i ligandi si trovano tutti nella tasca di legame in cui è presente un atomo di zinco.

Si deve stabilire un cristallo di riferimento ed è stato scelto 4LXZ, il quale possiede come ligando nella tasca di legame il Vorinostat (SAHA), un farmaco in commercio che funziona come inibitore non selettivo delle HDAC poiché agisce sulle classi I, II e IV.

Si farà l'allineamento degli altri cristalli su 4LXZ e si verificherà se gli altri ligandi condividono lo stesso sito attivo, la medesima orientazione, e gli amminoacidi coinvolti nel binding (figura 11).

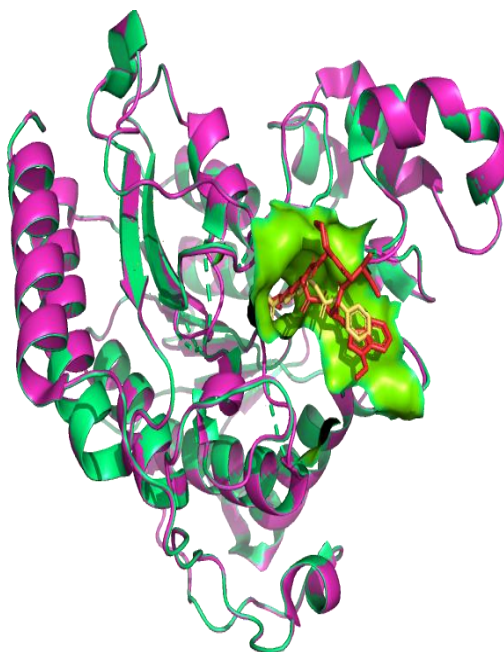


Figura 11: esempio di allineamento dei cristalli 4LXZ (ligando giallo) e 7LTG (ligando rosso).

Dopo avere allineato tutti i cristalli si è visto che tutti includono ligandi che competono assieme al Vorinostat per il sito di legame in cui è presente lo zinco, esclusi due, che sono i PDB 5IWG e 5IX0; questi ultimi competono solo in parte con il sito di legame poiché possiedono un'orientazione completamente diversa, trovandosi in un canale perpendicolare che permette l'uscita del gruppo acetato (figura 12).

5IWG e 5IX0 sono quindi stati esclusi perché nei successivi studi docking i loro ligandi e i loro decoys non saranno localizzati all'interno della tasca di legame con lo zinco.

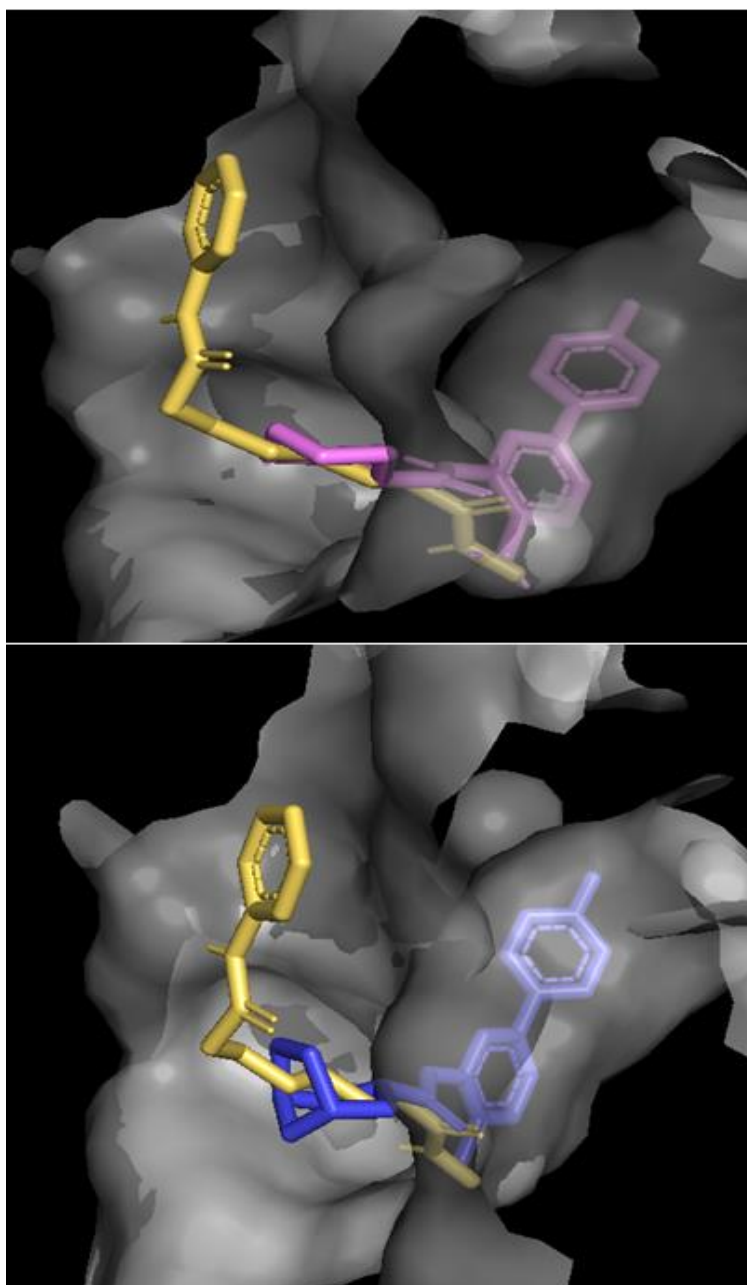


Figura 12: 5IWG (sopra in violetto) e 5IX0 (sotto in blu).

3.4. Il docking

Tutti gli altri ligandi tabulati delle altre isoforme possono essere considerati come un primo database di prova per iniziare a delineare il metodo; per creare il database è necessario che tutti i ligandi siano codificati come SMILES, ossia un metodo che è in grado di descrivere la formula di struttura di una molecola utilizzando una stringa ASCII (figura 13).

Gli SMILES di ogni ligando sono presenti sul Protein Data Bank, perciò si possono copiare e incollare direttamente su un file di testo creando così il database, composto da 64 molecole, che è stato denominato LIGANDS.smi.

```
c1ccc(cc1)NC(=O)CCCCC(=O)NO
```

Figura 13: esempio di SMILES di Vorinostat (SAHA).

3.4.1 Tautomers¹²

Per ognuna di queste 64 molecole si dovrà tenere conto della presenza di eventuali tautomeri, poiché nella creazione di un database spesso le tautomerie in alcuni composti portano a voci duplicate che potrebbero portare ad errori nel corso del lavoro.

Quindi il primo step è di utilizzare un programma a riga di comando del pacchetto di OpenEye, chiamato Tautomers, il quale è in grado di convertire qualsiasi forma tautomerica di una data molecola in un'unica rappresentazione.

Tautomers non genera dei conformeri ma cerca di posizionare gli atomi di idrogeno in un modo ragionevole.

Essendo Tautomers un programma a linea di comando andrà lanciato dal terminale del computer, in questo caso dalla bash di Linux, immettendo un input che corrisponde al database LIGANDS.smi e denominare il file di output, che conterrà i tautomeri, come LIGANDS.oeb.gz.

```
> tautomers -in LIGANDS.smi -out LIGANDS.oeb.gz
```


3.4.2. Omega¹²

Omega è un programma a linea di comando del pacchetto di OpenEye utilizzato per generare conformazioni 3D di molecole organiche.

L'output di Tautomers è stato utilizzato come input per Omega, il quale genererà un output, che è chiamato conFLIGANDS.oeb.gz, contenente i conformeri derivati dai tautomeri.

Assieme al file di input e output, sulla riga di comando è necessario impostare altri parametri da terminale:

- progress percent, per avere una misura della progressione del lavoro.
- prefix, pone un prefisso accanto ad ogni file di output per facilitare il loro riconoscimento.
- mpi_np, per indicare il numero di processori che si intende adoperare.

```
> omega2 -in LIGANDS.oeb.gz -out conFLIGAND.oeb.gz -progress percent -prefix conFLIGANDS -  
mpi_np 16 -strict false
```

3.4.2.1. Oeomega¹²

Omega rilascia tra i suoi file di output un file chiamato conFLIGANDS.fail, il quale contiene tutte le strutture di cui Omega non è stato in grado di creare conformeri, essendo essi dei macrocicli.

Omega infatti opera attraverso due metodi per generare i conformeri; il primo si chiama metodo della guida torsionale e funziona meglio su molecole che non contengono anelli grandi e flessibili, mentre il secondo si chiama metodo della geometria della distanza ed è stato progettato proprio per i macrocicli.

Quest'ultima modalità di Omega è chiamata Omega macrocycle oppure Oeomega.

I fails sono stati quindi tradotti in SMILES e utilizzati come input per Oeomega, e si è denominato l'output come macroLIGANDS.oeb.gz.

```
> oeomega macrocycle -in conFLIGANDS.fail.smi -out macroLIGANDS.oeb.gz -progress percent -  
prefix MACRO
```

3.4.3. Babel2

Gli output di Omega e Oeomega devono essere uniti per formare il database definitivo, ciò di solito viene eseguito direttamente da terminale tramite il comando “cat”, ma per i files “oeb.gz” questo non accade.

Occorre quindi utilizzare un programma a linea di comando chiamato Babel2, il quale funziona come convertitore di file di dati di modellazione chimica e molecolare.

Si utilizzano i due file “oeb.gz” come input e come output si imposta invece un file con formato “.sdf”(spatial data file).

```
> babel2 -in conFLIGANDS.oeb.gz -out conFLIGANDS.sdf -mc true  
> babel2 -in macroLIGANDS.oeb.gz -out macroLIGANDS.sdf -mc true
```

A questo punto è possibile utilizzare il comando “cat” per unire i due file di output “.sdf”, e denominare il nuovo file dataLIGANDS.sdf.

```
> cat *sdf > dataLIGANDS.sdf
```

Infine il file dataLIGANDS.sdf può essere convertito in un file oeb.gz utilizzando ancora Babel2, ottenendo così il database definitivo.

```
> babel2 -in dataLIGANDS.sdf -out dataLIGANDS.oeb.gz
```

3.4.4. Make_receptor¹³

Una volta creato il database di molecole si passa alla seconda fase di preparazione al docking, e si utilizza un'utilità grafica inclusa nel pacchetto di OpenEye chiamata Make_receptor.

Questo programma è dotato di una interfaccia grafica che permette un maggiore controllo sul processo di creazione di un recettore rispetto ai programmi a riga di comando; un recettore è inteso come file di unità di progettazione specializzata (OEDU), e contiene informazioni sulla posizione e le caratteristiche della tasca di legame.

Per creare un recettore si parte da un file PDB di uno dei cristalli di HDAC che si intende studiare, e una volta caricato nell'ambiente di lavoro verranno fornite diverse informazioni, tra cui la forma del target, il ligando, altre molecole non coinvolte nell'interazione con la tasca di legame, ioni metallici presenti nella proteina come lo zinco, e le molecole di solvente che circondano la proteina.

Selezionando il ligando esso verrà messo in primo piano nell'ambiente di lavoro e incluso all'interno di un box, il quale potrà essere modificato al fine di includere l'intero sito attivo della regione in cui saranno posizionati gli atomi pesanti del ligando nella fase di docking (figura 14).

Qualsiasi posa che si troverà ancorata nel sito attivo con atomi pesanti che si trovano fuori dal box sarà rifiutata.

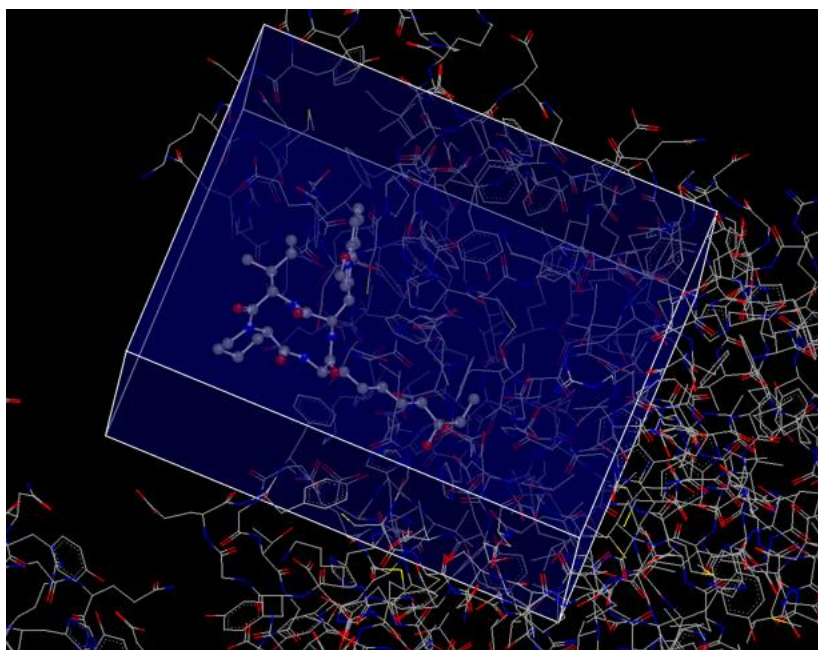


Figura 14: il box che include il ligando.

Successivamente si passa alla fase di forma, in cui `make_receptor` è in grado di definire i contorni interni ed esterni del recettore; viene così impostato un potenziale di forma che selezionerà automaticamente i contorni interni ed esterni più ragionevoli (figura 15). Al termine di questa fase si salva il recettore come “recettore.oedu”.

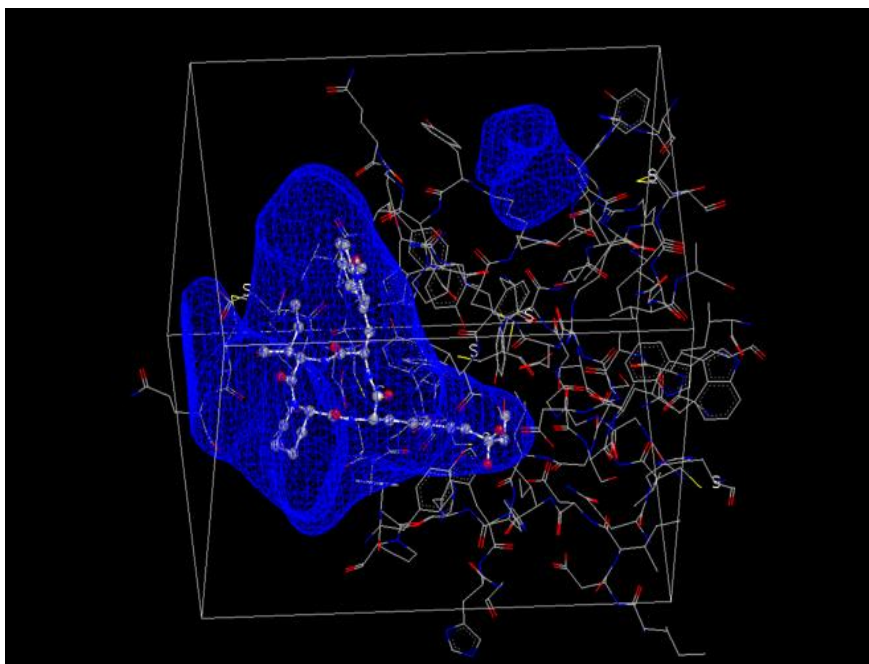


Figura 15: la forma del recettore dentro il box.

3.4.5. Fred¹³

La fase di docking avviene utilizzando un programma a linea di comando del pacchetto di OpenEye chiamato Fred, il quale permette il docking di un'ampia raccolta di molecole nel sito attivo di una proteina bersaglio a partire da un database di conformeri.

I file di input di Fred sono il recettore creato con `make_receptor` denominato `4LXZ.oedu`, il quale rappresenta il sito attivo, e il file `dataLIGANDS.oeb.gz` ottenuto da Omega e Oeomega che rappresenta il database di molecole che effettueranno il docking con il recettore.

```
> fred -receptor 4LXZ.oedu -dbase dataLIGANDS.oeb.gz -prefix 4LXZ -mpi_np 16
```

Gli output generati da Fred saranno:

- `4LXZ_docked.oeb.gz`, è un file che indica le molecole che sono state ancorate nel sito attivo.
- `4LXZ_undocked.oeb.gz`, è un file che indica le molecole che non possono essere ancorate nel sito attivo.
- `4LXZ_score.txt`, è un file di testo che contiene il nome e lo score dei primi 500 ligandi.
- `4LXZ_report.txt`, è un file di testo che fornisce un rapporto del processo di docking.

- 4LXZ-settings.param, è un file che contiene i parametri utilizzati per l'esecuzione in questione.

Una volta delineato e sperimentato il metodo sul cristallo di riferimento, lo si applica a tutti gli altri cristalli trovati in precedenza di HDAC2, si creerà quindi con `make_receptor` un recettore per ognuna delle isoforme trovate.

In questo modo si andrà a valutare quali sono i cristalli che a seguito del processo di docking hanno ancorato correttamente nella tasca di legame tutte le molecole contenute nel database.

3.5. Database ChEMBL

Dopo aver sperimentato il metodo su tutti cristalli di HDAC2 si è riscontrato che solo in sette cristalli il docking è risultato soddisfacente, mentre gli altri otto sono risultati pessimi poiché la maggior parte delle molecole non erano ancorate alla tasca di legame contenente lo zinco.

I cristalli rimasti sono: 3MAX, 4LXZ, 7LTG, 7MOS, 7MOT, 7MOY, 7MOZ.

Su questi cristalli verrà sperimentato il metodo utilizzando un database molto più grande, prelevandolo da un database chiamato ChEMBL, il quale fornisce dati sulla bioattività dei composti rispetto a bersagli farmacologici ma anche database di molecole relativi a enzimi come le HDAC.

Ragionando sulla omologia strutturale di HDAC2 con HDAC1 si è stabilito di utilizzare i database relativi a quest'ultima isoforma.

I database si presentano come file Excel in cui nelle varie colonne sono presenti il nome ChEMBL dei composti, scritti come CHEMBL con un numero a fianco che identifica il composto, i rispettivi SMILES e il valore di attività espressa in nM la quale può essere minore, uguale o maggiore di zero.

Tramite le funzioni di filtro di Excel si andranno ad isolare tutti i composti che sono senza SMILES e senza il valore di attività espressa in nM, e si elimineranno.

Ciò che rimane sono i composti attivi con attività nM minore di zero, e quelli inattivi con valore di attività maggiore o uguale a zero.

Il database relativo a HDAC1, chiamato CHEMBL325, contiene 6555 composti attivi e 908 composti inattivi, mentre quello di HDAC2, chiamato CHEMBL2937, contiene 2271 composti attivi e 436 composti inattivi; entrambi andranno uniti formando due grandi database, uno di attivi e uno di inattivi.

Su attivi ed inattivi di ogni isoforma si applicherà l'intero processo del metodo fino ad ottenere il database che si andrà ad utilizzare in Fred.

3.6. Filter¹²

Quando si lavora con grandi database composti da migliaia o a volte milioni di molecole, c'è il rischio di trovare polipeptidi, macromolecole, strutture duplicate o molecole molto flessibili; ciò potrebbe provocare degli errori nel processo di generazione dei conformeri e di conseguenza anche durante il processo di docking.

Per risolvere questo problema si utilizza un'utilità a riga di comando del pacchetto di OpenEye chiamato Filter, deputato alla preparazione dei file di input di set di dati di grandi dimensioni.

Filter elimina quindi i composti indesiderati, permettendo così la corretta generazione di conformeri da parte di Omega.

Il programma ha come input il file che contiene tutte le molecole del database sotto forma di SMILES, mentre come output ha il file da riempire con tutte le molecole che superano i filtri specificati; il filtro in questo caso discrimina sulla base del conteggio dei legami ruotabili.

Perciò prima di eseguire Tautomers e Omega sui due database ottenuti da ChEMBL si utilizzerà Filter, specificando i seguenti parametri:

- Unique true, accetta il nome di un file che contiene molecole che Filter deve ignorare quindi solo le molecole univoche che non compaiono in questo file vengono inviate all'output.
- Filter file, fornisce limiti accettabili per tutte le proprietà fisiche e i gruppi funzionali nel filtro predefinito.

```
> filter -in 2937att.smi -out filt2937att.smi -unique true -filter file -dots true
```

L'output di filter sarà utilizzato ora come input per Tautomers, dopodiché si procede come stabilito dal metodo fino alla fase di docking con Fred.

3.7. Criticità ed errori

A seguito della creazione del database, può capitare che durante il processo di docking Fred si blocchi inaspettatamente rilasciando un messaggio di errore.

Si è scoperto che ciò accade quando Fred riconosce dei file presenti all'interno del database che non vengono considerate come strutture chimiche.

Questo rappresenta un problema poiché questi file bloccano il processo di docking, e l'unico modo per eliminarli sarebbe cercarli manualmente all'interno del database, il che risulterebbe impossibile data la grande quantità di composti, e per il fatto che all'apparenza tutti i file risultano identici.

Tutto ciò rappresenta una criticità importante, perciò si è pensato di individuare i file difettosi dividendo i database in clusters utilizzando le funzioni del programma Babel2; ognuno di questi clusters sarà un database che verrà utilizzato per fare il docking con Fred, e quando quest'ultimo si bloccherà significherà che in quel cluster è presente un file difettoso.

Ogni cluster che blocca Fred verrà quindi a sua volta diviso nuovamente, finché non resteranno pochi clusters, ciascuno composto da un solo file che sarà quello difettoso.

Una volta trovato il file difettoso è sufficiente eliminarlo dagli SMILES del database di partenza, e riapplicando il metodo il docking si concluderà con successo.

Per trovare l'errore si inizia utilizzando il file del database finale come “.sdf”, e con Babel2 si imposta la seguente riga di comando:

```
> - babel2 -in CHEMBL2937.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 500 -chunk_prefix  
chembl2937 -ofmt oeb.gz
```

- Chunk true, permette la creazione di clusters.
- Chunk_molcount, specifica quante molecole si trovano in ciascun cluster.
- Ofmt, specifica in che formato si desidera ottenere l'output.

Successivamente si imposta Fred e mantenendo un recettore di riferimento si effettua il docking utilizzando i cluster come database; si prosegue poi per esclusione finché vengono individuati i file difettosi.

3.8. Accuratezza del metodo

Conclusa la fase di docking è necessario valutare l'accuratezza del metodo appena applicato e per farlo si utilizza un indice statistico noto come curva ROC, il quale mette in relazione su un grafico cartesiano i composti attivi e quelli inattivi.

Per risultare coerente una curva ROC deve avere una proporzione tra attivi ed inattivi pari a 1:50; per avere un numero così elevato di inattivi è necessario generare delle nuove molecole, chiamate decoys, basandosi sulla struttura di quelle già esistenti .

3.8.1. DUD-E e DUDE-Z¹⁴

I decoys sono generati in base a proprietà fisiche simili ma strutture chimiche diverse, e per ottenerli si è deciso di utilizzare un sito per la creazione di nuovi decoys chiamato DUD-E.

Inserendo gli SMILES con accanto il nome ChEMBL, DUD-E creerà 50 nuovi decoys per ogni composto attivo.

DUD-E però possiede una limitazione, in quanto l'input massimo che è possibile inserire è di 50 SMILES, quindi è necessario dividere il database in clusters da 50 SMILES e poi immetterli in DUD-E per generare i decoys.

Durante il lavoro di tesi però DUD-E non funzionava correttamente e non era in grado di generare decoys; questo perché il sito stava compiendo una transizione verso una sua nuova versione denominata DUDE-Z, la quale aveva le stesse caratteristiche di creazione di nuovi composti.

Attraverso gli SMILES e il nome ChEMBL dei composti DUDE-Z, nonostante fosse ancora in una fase sperimentale, fu in grado di generare un numero compreso tra i 20 e i 45 decoys per ogni molecola del database, ottenendo infine un database complessivo con un numero di molecole inferiore alle attese, di 54610 decoys.

Non potendo ottenere di meglio si è comunque deciso di proseguire con la creazione delle curve ROC .

3.8.2. Curve ROC¹⁵

La curva ROC (Receiving Operating Curve) è una rappresentazione grafica che è in grado di fornire un'indicazione sulla accuratezza del metodo di virtual screening utilizzato.

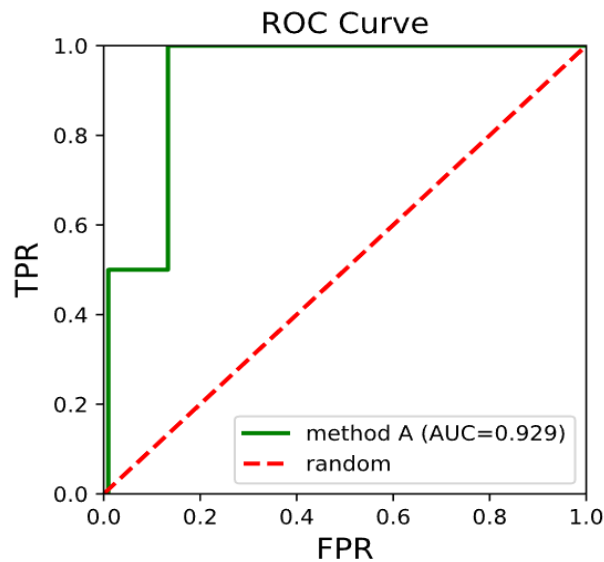


Figura 15: semplice esempio di una curva ROC.

La curva ROC opera utilizzando una classificazione binaria, riportando su un grafico bidimensionale il TPR, ossia il True Positive Rate, e l'FPR, ossia il False Positive Rate (figura 15).

Questi due valori vengono definite rispettivamente come entità positive, che corrispondono ai composti attivi e sono rappresentati sull'asse Y, ed entità negative, che corrispondono ai decoys e sono rappresentati sull'asse X.

Il grafico che si forma rappresenta l'AUC (area sotto la curva), ed è una misura aggregata delle prestazioni rispetto a tutte le possibili soglie di classificazione.

Il valore di AUC varia da [0.0 – 1.0], e tanto più è vicino a 1 tanto più il metodo è valido nelle sue previsioni e la curva è spostata verso sinistra; al contrario tanto più è spostata verso destra tanto più il metodo è imperfetto e fallace nelle sue previsioni¹⁵. Una condizione in cui il valore di AUC è di 0.5, significa che il grafico corrisponde alla bisettrice rossa tratteggiata ed indice la totale randomicità del metodo.

Il valore di AUC può essere quindi interpretato come la probabilità che il modello del metodo classifichi un composto positivo, quindi un attivo, più in alto di un composto negativo, ossia un decoy.

Per trovare su quale cristallo di HDAC2 il metodo funziona meglio, si costruisce una curva ROC per ognuno dei sette cristalli, e quello con il valore di AUC più alto sarà il cristallo definitivo (figura 16 e 17).

Per fare ciò bisogna immettere due input dalla riga di comando del terminale, e sono due file di testo:

- Actives.txt, ossia l'elenco dei composti attivi.
- Scores.txt, gli scores ottenuti dall'output di Fred.

```
> python3 roc2img.py actives.txt scores.txt rov.svg
```

L'output sarà un file contenente il grafico della curva ROC.

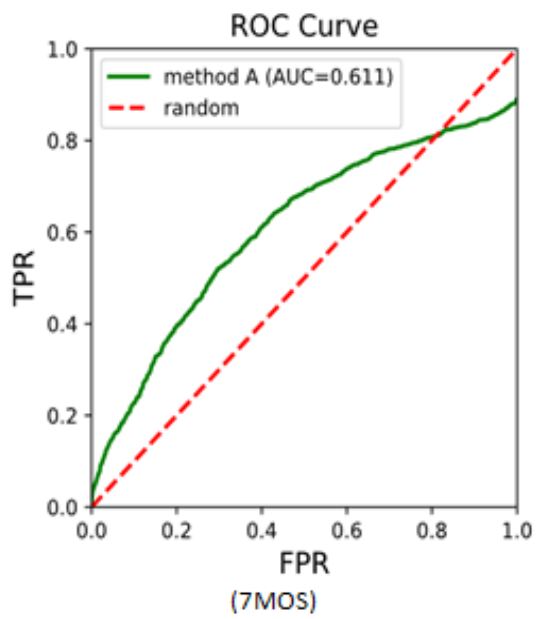
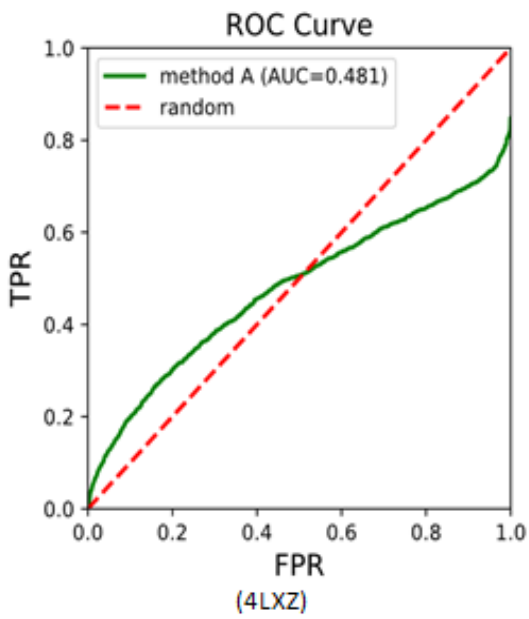
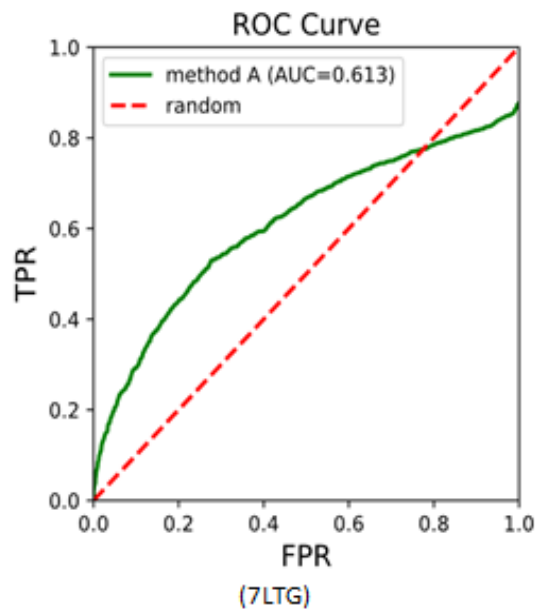
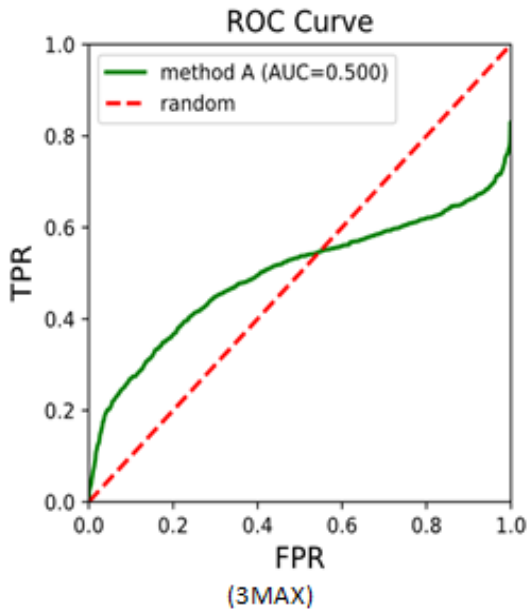


Figura 16: curve ROC di 3MAX, 4LXZ, 7LTG, 7MOS.

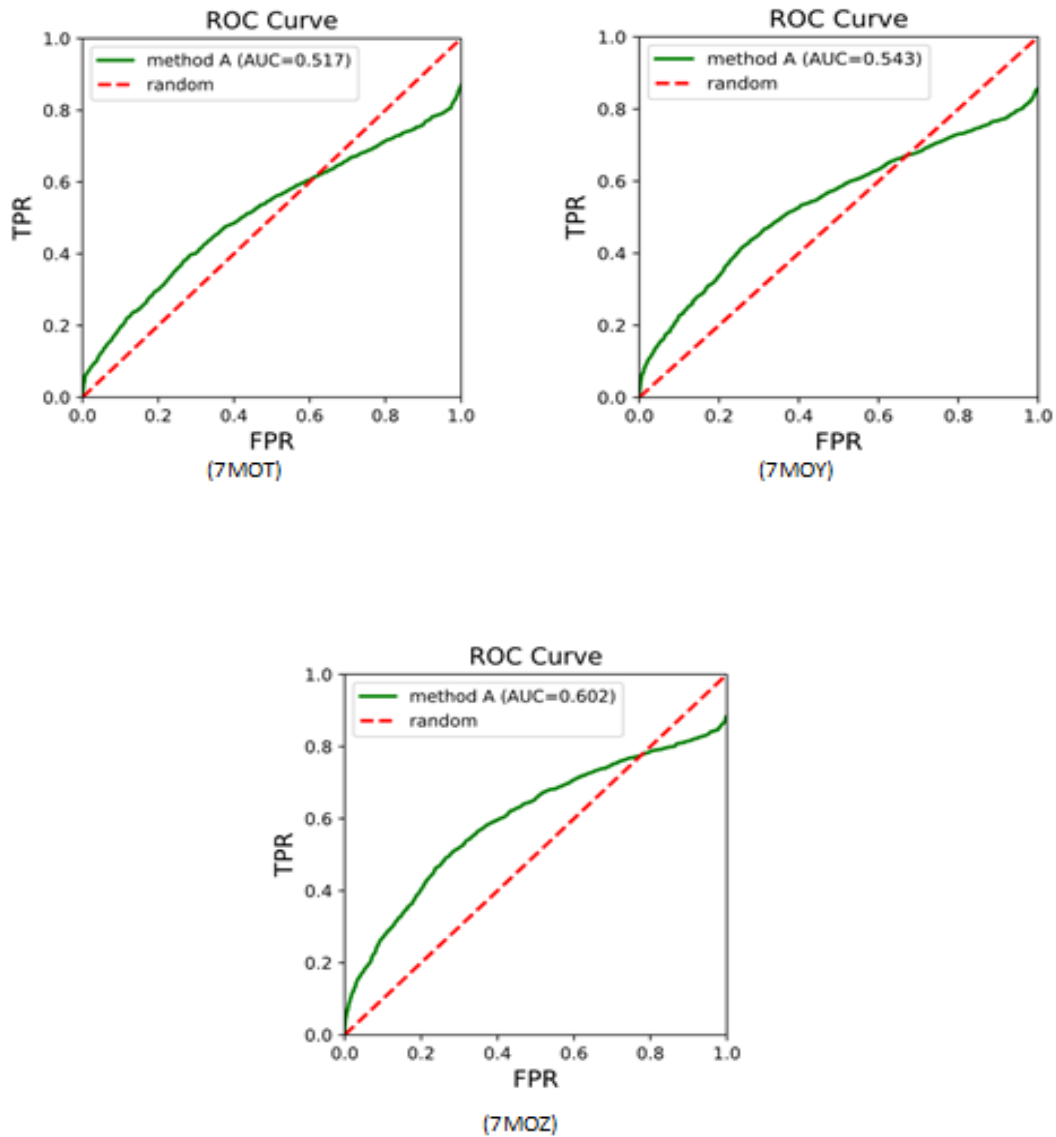


Figura 17: curve ROC di 7MOT, 7MOY, 7MOZ.

Osservando le curve ROC si è notato che hanno tutte un andamento sinusoidale come prevedibile, causato dalla proporzione non perfetta 1:50, a causa del minor numero di decoys attesi generati da DUDE-Z.

Le curve sono comunque valide e i loro valori di AUC suggeriscono che il cristallo 7LTG con il valore di 0.613 sia quello migliore, sebbene la curva del cristallo 7MOS con valore 0.611 sia molto simile.

3.8.3. Fattore di arricchimento (EF)¹⁶

Osservando i grafici si è notato che la parte ascendente alla base degli assi risulta particolarmente ripida ed evidenzia la possibilità reale di trovare molte molecole di composti attivi, e per tradurre tale probabilità in un valore numerico si è calcolato il fattore di arricchimento.

Il fattore di arricchimento esprime il numero di composti attivi trovati impiegando una determinata strategia di virtual screening; concettualmente è quindi la misura di quanti attivi si trovano entro una frazione di riconoscimento precoce di una lista ordinata relativa ad una distribuzione casuale¹⁶.

Il fattore di arricchimento viene calcolato come:

$$EF = (a/n)/(A/N)$$

- a = numero di molecole attive in n
- n = numero totale di hits
- A = numero totale di attivi nel database
- N = numero totale di molecole nel database

Partendo dagli scores di Fred si può quindi partire utilizzando delle percentuali che possono essere del 2%, 5%, 10%, le quali mostreranno quanti attivi ci sono, e successivamente si fa il rapporto.

Si è deciso di utilizzare la percentuale al 2% perché fornirà il valore percentuale di EF più alto.

61696 scores

Cristallo 3MAX:

- 10% = 6170 di cui 713 attivi

$$\frac{713}{6170} = 0.12\%$$

- 5% = 3085 di cui 528 attivi

$$\frac{528}{3085} = 0.17\%$$

- 2% = 1234 di cui 272 attivi

$$\frac{272}{1234} = 0,22\%$$

Si ripete l'operazione su tutti i cristalli e poi si confrontano i valori di EF e di AUC.

- 3MAX EF=0.22%
- 4LXZ EF=0.14%
- 7LTG EF=0.22%
- 7MOS EF=0.16%
- 7MOT EF=0.16%
- 7MOY EF=0.19%
- 7MOZ EF=0.22%

Con un valore di AUC di 0.613 ed un EF di 0.22% il cristallo 7LTG è risultato essere il cristallo migliore (figura 18).

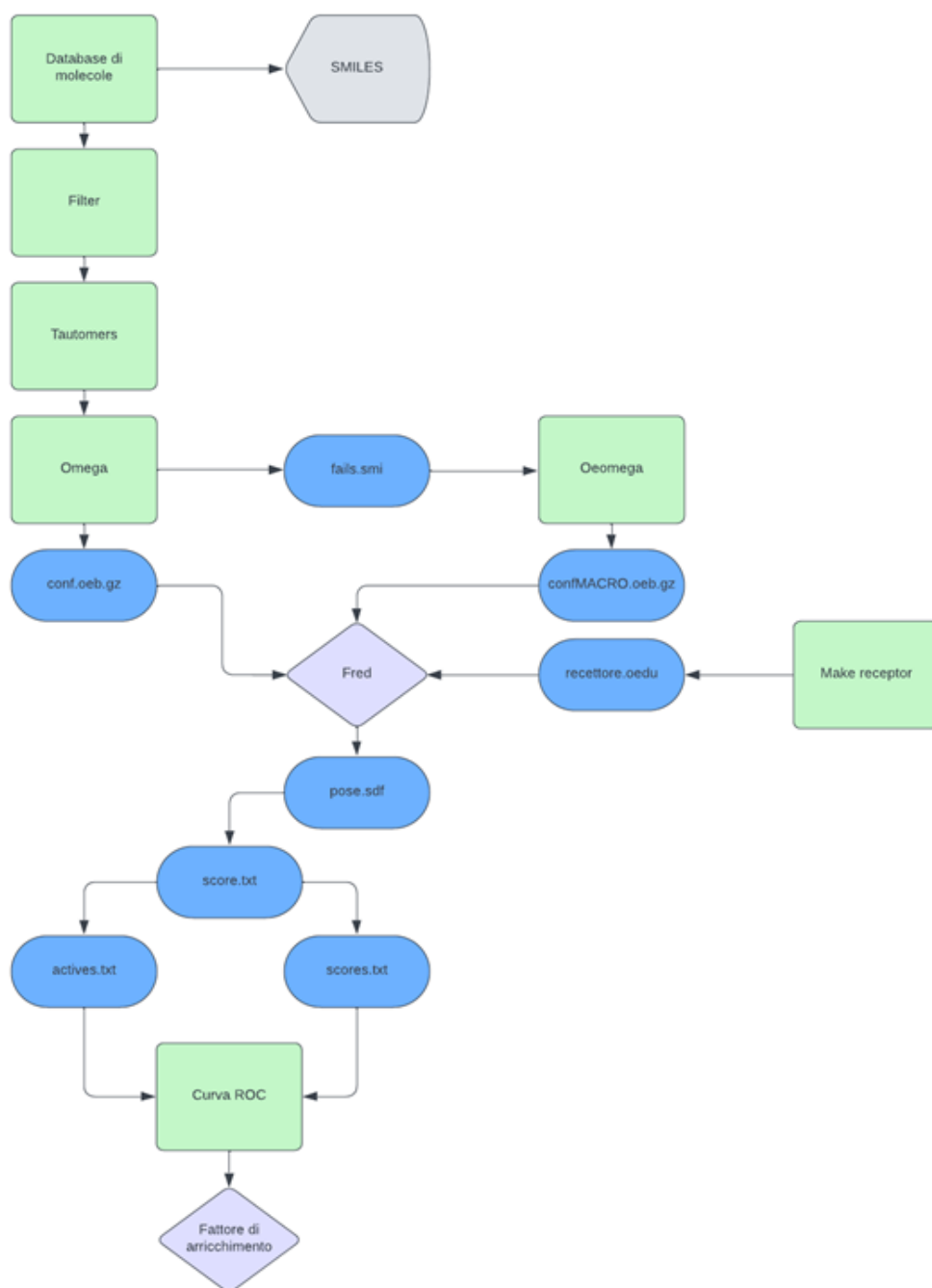


Figura 18: schema riassuntivo della strategia del metodo.

3.9. Database ZINC15

Dopo aver quindi validato il metodo ed individuato il cristallo migliore per il docking, si applica il metodo utilizzando un database di molecole ottenuto da ZINC15, il quale è il più grande database di composti commerciali disponibili per il virtual screening¹⁷.

Entrando in ZINC si andrà a selezionare un database composto da molecole che possiederanno un logP minore o uguale di 5, e un peso molecolare incluse tra i 200 Da e i 350 Da (figura 19).

Il database verrà quindi scaricato in clusters che includono gli SMILES di tutti i composti con accanto il loro nome ZINC, e su ognuno di questi clusters si applicherà il metodo.

	200	250	300	325	350	375	400	425	450	500	>500	Totals, by LogP
-1	6,983	4,872	6,160	3,072	3,195	2,316	1,605	1,227	1,047	1,818	5,512	24,282
0	25,064	14,280	20,924	12,273	12,788	9,576	5,875	3,104	2,836	2,174	3,859	85,329
1	68,295	57,603	89,093	55,185	58,890	58,207	25,604	13,457	7,984	7,516	7,080	329,066
2	95,368	135,194	219,877	149,361	177,006	141,881	90,155	51,537	34,593	28,715	16,417	776,806
2.5	35,264	80,162	154,491	115,080	147,089	125,312	87,880	57,871	40,950	55,901	16,882	532,086
3	20,563	68,510	155,591	123,995	172,255	155,063	120,576	86,103	64,255	62,238	27,773	540,914
3.5	8,919	44,795	127,299	112,524	159,869	162,782	141,042	111,698	89,637	92,146	47,962	453,406
4	2,757	22,199	85,077	83,773	125,581	143,906	140,363	126,445	149,236	122,298	75,666	319,387
4.5	575	8,077	45,618	54,011	85,000	107,846	120,572	121,883	153,755	141,350	108,908	193,281
5	94	2,293	18,611	28,113	48,883	69,054	85,673	95,141	134,181	144,525	136,747	97,994
>5	28	793	8,856	16,434	35,453	64,780	100,483	127,892	199,811	340,649	733,281	0

Figura 19: il numero di composti estratto da ZINC15.

Essendo dei clusters molto numerosi, al fine di rendere automatico l'avanzamento del lavoro, si sono preparati tutti i comandi relativi ai programmi a riga di comando che costituiscono il metodo in file di testo, e sono stati poi lanciati da terminale utilizzando in comando:

```
> sh nome file di testo
```

Infine prima di eseguire il docking si è convertito ogni file in formato .sdf, sono stati uniti in un unico database con il comando cat, e successivamente riconvertito in formato oeb.gz con Babel2.

Si è poi eseguito il docking con Fred su tale database, composto da circa 3.4 milioni di composti.

```
> fred -receptor 7LTG.oedu -dbase ZINC.oeb.gz -prefix ZINC -mpi_np 32
```

Negli output di Fred all'interno del file.txt si troveranno gli scores delle migliori 500 molecole.

4. CONCLUSIONI

In conclusione il metodo utilizzato si è rivelato valido e funzionale, sebbene con alcune criticità e rallentamenti provocati da occasionali malfunzionamenti ed alcune imprecisioni del sito per la creazione di nuovi decoys.

L'obiettivo di questo progetto è stato quello di velocizzare un processo di selezione di molecole dagli enormi database presenti online, al fine di ottenere dei compounds che i chimici potessero sintetizzare e studiare; accorciare questa prima fase di screening delle molecole permette di risparmiare tempo e denaro, e rende di conseguenza il lavoro per i chimici meno aleatorio e dispersivo.

Partendo dai cristalli di HDAC presenti sul Protein Data Bank e confrontandoli con PyMol, si è poi iniziato a generare decoys dalle molecole presenti su database come ChEMBL; ci si è infine concentrati su HDAC2, essendo l'isoforma maggiormente coinvolta nel morbo di Alzheimer.

Con MakeReceptor e i programmi a linea di comando del pacchetto OpenEye, Omega2 e Fred, si è ottenuto un file di scores dai quali si sono ricavate delle curve ROC; a causa dei valori poco convincenti è stato calcolato il fattore di arricchimento relativo a ciascuna curva ROC, trovando così il cristallo con il valore migliore. Su tale cristallo si è applicato il metodo utilizzando un database di molecole creato da ZINC15, indicando come unica discriminante strutture con peso molecolare compreso tra 200 Da e 350 Da. Fred ha rilasciato infine un output con le migliori 500 molecole, ottenute partendo da un database di oltre 3.4 milioni di strutture.

I principali problemi sono derivati dal malfunzionamento di DUDEZ, il sito per generare nuovi decoys, il quale a volte non funzionava o non generava un sufficiente numero di decoys necessario per l'attendibilità delle curve ROC.

Un altro problema è stato rappresentato dal fatto che i file di alcune molecole del database di ChEMBL non venivano riconosciute come strutture chimiche, e quindi durante il processo di docking il programma Fred si bloccava, costringendo a cercare ed eliminare i file difettosi.

Il metodo quindi è ancora grezzo e bisogna ancora lavorare sui punti sopra descritti per migliorarlo, ma è risultato funzionante permettendo di ottenere un numero di molecole su cui un chimico potrà lavorare in futuro per sintetizzare molecole che potranno essere destinate a diventare nuovi farmaci.

5. MATERIALI E METODI

5.1. Lo script

Alcune precisazioni riguardo allo script:

- Il comando “bg” è usato per mantenere in background Make receptor.
- Omega_macrocycle e Oomega macrocycle sono due modi di esprimere la stessa cosa.
- Il comando “sh” permette di lanciare in serie comandi copiati su un file di testo, al fine di rendere automatico l’avvio delle utilità a riga di comando.
I comandi verranno tutti mostrati prima del comando “sh”.
- Il parametro “hitlist 0” di Fred permette di ottenere nell’output degli scores tutte le molecole processate nella fase di docking, e non solo le migliori 500.

```
1    make_receptor
2    bg
3    cat *.pdb >file.pdb
4    omega2 -in file.pdb -out conformazioni.oeb.gz -progress percent
5    fred -receptor 3MAX.oedu -dbase conformazioni.oeb.gz
6    babel2 -in fred_docked.oeb.gz -out fred_docked.sdf
7    omega2 -in ALL LIGANDS.pdb -out conf4LXZ.oeb.gz -progress percent
8    cat *.pdb >files.pdb
9    omega2 -in files.pdb -out conf4LY1.oeb.gz -progress percent
10   fred -receptor 4LY1.oedu -dbase conf4LY1.oeb.gz
11   babel2 -in fred_docked.oeb.gz -out fred_docked.sdf
12   omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf4LXZ.oeb.gz -progress percent -prefix 4LXZ -mpi_np 16
13   fred -receptor RECETTORI/4LXZ.oedu -dbase conf4LXZ.oeb.gz
14   fred -receptor RECETTORI/4LXZ.oedu -dbase conf4LXZ.oeb.gz -prefix 4LXZ
15   babel2 -in 4LXZ_docked.oeb.gz -out 4LXZ_docked.sdf
16   omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6WBZ.oeb.gz -progress percent -prefix 6WBZ -mpi_np 16
17   fred -receptor RECETTORI/6WBZ.oedu -dbase conf6WBZ.oeb.gz -prefix 6WBZ
18   babel2 -in 6WBZ_docked.oeb.gz -out 6WBZ_docked.sdf
19   omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf3MAX.oeb.gz -progress percent -prefix 3MAX
20   fred -receptor RECETTORI/3MAX.oedu -dbase conf3MAX.oeb.gz -prefix 3MAX
```

21 babel2 -in 3MAX_docked.oeb.gz -out 3MAX_docked.sdf
22 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6WBW.oeb.gz -progress percent -prefix 6WBW -mpi_np 16
23 fred -receptor RECETTORI/6WBW.oedu -dbase conf6WBW.oeb.gz -prefix 6WBW
24 babel2 -in 6WBW_docked.oeb.gz -out 6WBW_docked.sdf
25 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6XDM.oeb.gz -progress percent -prefix 6XDM -mpi_np 16
26 fred -receptor RECETTORI/6XDM.oedu -dbase conf6XDM.oeb.gz -prefix 6XDM
27 babel2 -in 6XDM_docked.oeb.gz -out 6XDM_docked.sdf
28 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6XEB.oeb.gz -progress percent -prefix 6XEB -mpi_np 16
29 fred -receptor RECETTORI/6XEB.oedu -dbase conf6XEB.oeb.gz -prefix 6XEB
30 babel2 -in 6XEB_docked.oeb.gz -out 6XEB_docked.sdf
31 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6XEC.oeb.gz -progress percent -prefix 6XEC -mpi_np 16
32 fred -receptor RECETTORI/6XEC.oedu -dbase conf6XEC.oeb.gz -prefix 6XEC
33 babel2 -in 6XEC_docked.oeb.gz -out 6XEC_docked.sdf
34 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf7JS8.oeb.gz -progress percent -prefix 7JS8 -mpi_np 16
35 fred -receptor RECETTORI/7JS8.oedu -dbase conf7JS8.oeb.gz -prefix 7JS8
36 babel2 -in 7JS8_docked.oeb.gz -out 7JS8_docked.sdf
37 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 6xec.oeb.gz
38 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 6xec.oeb.gz.oeb.gz -progress percent -prefix 6xec -mpi_np 16
39 fred -receptor RECETTORI/6XEC.oedu -dbase 6xec.oeb.gz -prefix 6xec -mpi_np 16
40 babel2 -in 6xec_docked.oeb.gz -out 6xec_docked.sdf

41 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf4LXZ.oeb.gz -prefix 4LXZ
42 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf4LXZ.oeb.gz -progress percent -prefix 4LXZ -mpi_np 16
43 fred -receptor RECETTORI/4LXZ.oedu -dbase conf4LXZ.oeb.gz -prefix 4LXZ -mpi_np 16
44 babel2 -in 4LXZ_docked.oeb.gz -out 4LXZ_docked.sdf
45 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 6WBW.oeb.gz -prefix 6WBW
46 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6WBW.oeb.gz -progress percent -prefix 6WBW -mpi_np 16
47 fred -receptor RECETTORI/6WBW.oedu -dbase conf6WBW.oeb.gz -prefix 6WBW -mpi_np 16
48 babel2 -in 6WBW_docked.oeb.gz -out 6WBW_docked.sdf
49 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 6WBZ.oeb.gz -prefix 6WBZ
50 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6WBZ.oeb.gz -progress percent -prefix 6WBZ -mpi_np 16
51 fred -receptor RECETTORI/6WBZ.oedu -dbase conf6WBZ.oeb.gz -prefix 6WBZ -mpi_np 16
52 babel2 -in 6WBZ_docked.oeb.gz -out 6WBZ_docked.sdf
53 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 6XDM.oeb.gz -prefix 6XDM
54 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6XDM.oeb.gz -progress percent -prefix 6XDM -mpi_np 16
55 fred -receptor RECETTORI/6XDM.oedu -dbase conf6XDM.oeb.gz -prefix 6XDM -mpi_np 16
56 babel2 -in 6XDM_docked.oeb.gz -out 6XDM_docked.sdf
57 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 6XEB.oeb.gz -prefix 6XEB
58 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6XEB.oeb.gz -progress percent -prefix 6XEB -mpi_np 16
59 fred -receptor RECETTORI/6XEB.oedu -dbase conf6XEB.oeb.gz -prefix 6XEB -mpi_np 16
60 babel2 -in 6XEB_docked.oeb.gz -out 6XEB_docked.sdf

61 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 7KBG.oeb.gz -prefix 7KBG
62 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf7KBG.oeb.gz -progress percent -prefix 7KBG -mpi_np 16
63 fred -receptor RECETTORI/7KBG.oedu -dbase conf7KBG.oeb.gz -prefix 7KBG -mpi_np 16
64 babel2 -in 7KBG_docked.oeb.gz -out 7KBG_docked.sdf
65 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out 7MOT.oeb.gz -prefix 7MOT
66 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf7MOT.oeb.gz -progress percent -prefix 7MOT -mpi_np 16
67 fred -receptor RECETTORI/7MOT.oedu -dbase conf7MOT.oeb.gz -prefix 7MOT -mpi_np 16
68 babel2 -in 7MOT_docked.oeb.gz -out 7MOT_docked.sdf
69 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf6XEC.oeb.gz -progress percent -prefix 6XEC -mpi_np 16
70 fred -receptor RECETTORI/6XEC.oedu -dbase conf6XEC.oeb.gz -prefix 6XEC
71 babel2 -in 6XEC_docked.oeb.gz -out 6XEC_docked.sdf
72 omega2 -in ALL\ LIGANDS.pdb -out conf7JS8.oeb.gz -progress percent -prefix 7JS8 -mpi_np 16
73 fred -receptor RECETTORI/7JS8.oedu -dbase conf7JS8.oeb.gz -prefix 7JS8
74 babel2 -in 7JS8_docked.oeb.gz -out 7JS8_docked.sdf
75 tautomers -in all\ ligands.pdb -out 3MAX.oeb.gz -prefix 3MAX
76 tautomers -in all\ ligands.pdb -out LIGANDS.oeb.gz -prefix LIGANDS
77 omega2 -in LIGANDS.oeb.gz -out conf3MAX.oeb.gz -progress percent -prefix 3MAX -mpi_np 16
78 omega_macrocycle -in 3MAX.fail.smi -out 3MAXmacro.oeb.gz -progress percent -prefix 3MAXmacro -mpi_np 16
79 tautomers -in ALL\ LIGANDS.pdb -out LIGANDS.oeb.gz -prefix LIGANDS
80 omega2 -in LIGANDS.oeb.gz -out confLIGANDS.oeb.gz -progress percent -prefix confLIGANDS -mpi_np 16

81 omega_macrocycle -in conflIGANDS.fail.smi -out macroLIGANDS.oeb.gz -prefix MACRO -progress percent
82 babel2 -in conflIGANDS.oeb.gz -out conflIGANDS.sdf
83 babel2 -in macroLIGANDS.oeb.gz -out macroLIGANDS.sdf
84 cat *.sdf > file.sdf
85 babel2 -in MOLECOLE.sdf -out MOLECOLE.oeb.gz
86 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/4BKX.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 4BKX -mpi_np 16
87 babel2 -in 4BKX_docked.oeb.gz -out 4BKX_docked.sdf
88 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5ICN.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 5ICN -mpi_np 16
89 babel2 -in 5ICN_docked.oeb.gz -out 5ICN_docked.sdf
90 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 3MAX -mpi_np 16
91 babel2 -in 3MAX_docked.oeb.gz -out 3MAX_docked.sdf
92 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/4LXZ.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 4LXZ -mpi_np 16
93 babel2 -in 4LXZ_docked.oeb.gz -out 4LXZ_docked.sdf
94 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5IWG.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 5IWG -mpi_np 16
95 babel2 -in 5IWG_docked.oeb.gz -out 5IWG_docked.sdf
96 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5IX0.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 5IX0 -mpi_np 16
97 babel2 -in 5IX0_docked.oeb.gz -out 5IX0_docked.sdf
98 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6WBZ.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 6WBZ -mpi_np 16
99 babel2 -in 6WBZ_docked.oeb.gz -out 6WBZ_docked.sdf
100 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6WBW.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 6WBW -mpi_np 16

101 babel2 -in 6WBW_docked.oeb.gz -out 6WBW_docked.sdf
102 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6XDM.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 6XDM -mpi_np 16
103 babel2 -in 6XDM_docked.oeb.gz -out 6XDM_docked.sdf
104 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6XEB.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 6XEB -mpi_np 16
105 babel2 -in 6XEB_docked.oeb.gz -out 6XEB_docked.sdf
106 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6XEC.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 6XEC -mpi_np 16
107 babel2 -in 6XEC_docked.oeb.gz -out 6XEC_docked.sdf
108 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7JS8.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 7JS8 -mpi_np 16
109 babel2 -in 7JS8_docked.oeb.gz -out 7JS8_docked.sdf
110 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7KBG.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 7KBG -mpi_np 16
111 babel2 -in 7KBG_docked.oeb.gz -out 7KBG_docked.sdf
112 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase MOLECOLE.oeb.gz -prefix 7LTG -mpi_np 16
113 babel2 -in 7LTG_docked.oeb.gz -out 7LTG_docked.sdf
114 tautomers -in ALL\ LIGANDS.smi -out ALL\ LIGANDS.oeb.gz
115 omega2 -in ALL\ LIGANDS.oeb.gz -out conflIGANDS.oeb.gz -progress percent -prefix conflIGANDS -mpi_np 16 -strict false
116 omega_macrocycle -in conflIGANDS.fail.smi -out macroLIGANDS.oeb.gz -prefix MACRO -progress percent
117 babel2 -in conflIGANDS.oeb.gz -out conflIGANDS.sdf
118 babel2 -in macroLIGANDS.oeb.gz -out macroLIGANDS.sdf
119 cat *.sdf > file.sdf
120 babel2 -in LIGANDS.sdf -out LIGANDS.oeb.gz

121 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/4BKX.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 4BKX -mpi_np 16
122 babel2 -in 6WBZ_docked.oeb.gz -out 6WBZ_docked.sdf
123 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6WBW.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 6WBW -mpi_np 16
124 babel2 -in 6WBW_docked.oeb.gz -out 6WBW_docked.sdf
125 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6XDM.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 6XDM -mpi_np 16
126 babel2 -in 6XDM_docked.oeb.gz -out 6XDM_docked.sdf
127 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6XEB.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 6XEB -mpi_np 16
128 babel2 -in 6XEB_docked.oeb.gz -out 6XEB_docked.sdf
129 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6XEC.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 6XEC -mpi_np 16
130 babel2 -in 6XEC_docked.oeb.gz -out 6XEC_docked.sdf
131 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7JS8.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7JS8 -mpi_np 16
132 babel2 -in 7JS8_docked.oeb.gz -out 7JS8_docked.sdf
133 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7KBG.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7KBG -mpi_np 16
134 babel2 -in 7KBG_docked.oeb.gz -out 7KBG_docked.sdf
135 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7LTG -mpi_np 16
136 babel2 -in 7LTG_docked.oeb.gz -out 7LTG_docked.sdf
137 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7MOS.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7MOS -mpi_np 16
138 babel2 -in 7MOS_docked.oeb.gz -out 7MOS_docked.sdf
139 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7MOT.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7MOT -mpi_np 16
140 babel2 -in 7MOT_docked.oeb.gz -out 7MOT_docked.sdf

141 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7MOX.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7MOX -mpi_np 16
142 babel2 -in 7MOX_docked.oeb.gz -out 7MOX_docked.sdf
143 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7MOY.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7MOY -mpi_np 16
144 babel2 -in 7MOY_docked.oeb.gz -out 7MOY_docked.sdf
145 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7MOZ.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7MOZ -mpi_np 16
146 babel2 -in 7MOZ_docked.oeb.gz -out 7MOZ_docked.sdf
147 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5IWG.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5IWG -mpi_np 16
148 babel2 -in 5IWG_docked.oeb.gz -out 5IWG_docked.sdf
149 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5IX0.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5IX0 -mpi_np 16
150 babel2 -in 5IX0_docked.oeb.gz -out 5IX0_docked.sdf
151 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/2VQM.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 2VQM -mpi_np 16
152 babel2 -in 2VQM_docked.oeb.gz -out 2VQM_docked.sdf
153 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/2VQJ.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 2VQJ -mpi_np 16
154 babel2 -in 2VQJ_docked.oeb.gz -out 2VQJ_docked.sdf
155 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/2VQO.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 2VQO -mpi_np 16
156 babel2 -in 2VQO_docked.oeb.gz -out 2VQO_docked.sdf
157 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/2VQQ.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 2VQQ -mpi_np 16
158 babel2 -in 2VQQ_docked.oeb.gz -out 2VQQ_docked.sdf
159 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/2VQV.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 2VQV -mpi_np 16
160 babel2 -in 2VQV_docked.oeb.gz -out 2VQV_docked.sdf

161 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/4CBT.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 4CBT -mpi_np 16
162 babel2 -in 4CBT_docked.oeb.gz -out 4CBT_docked.sdf
163 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/4CBY.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 4CBY -mpi_np 16
164 babel2 -in 4CBY_docked.oeb.gz -out 4CBY_docked.sdf
165 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6FYZ.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 6FYZ -mpi_np 16
166 babel2 -in 6FYZ_docked.oeb.gz -out 6FYZ_docked.sdf
167 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5EDU.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5EDU -mpi_np 16
168 babel2 -in 5EDU_docked.oeb.gz -out 5EDU_docked.sdf
169 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6ODB.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 6ODB -mpi_np 16
170 babel2 -in 6ODB_docked.oeb.gz -out 6ODB_docked.sdf
171 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/6ODC.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 6ODC -mpi_np 16
172 babel2 -in 6ODC_docked.oeb.gz -out 6ODC_docked.sdf
173 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7JVU.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7JVU -mpi_np 16
174 babel2 -in 7JVU_docked.oeb.gz -out 7JVU_docked.sdf
175 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7JVW.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 7JVW -mpi_np 16
176 babel2 -in 7JVW_docked.oeb.gz -out 7JVW_docked.sdf
177 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5BWZ.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5BWZ -mpi_np 16
178 babel2 -in 5BWZ_docked.oeb.gz -out 5BWZ_docked.sdf
179 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5D1B.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5D1B -mpi_np 16
180 babel2 -in 5D1B_docked.oeb.gz -out 5D1B_docked.sdf

181 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5DC5.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5DC5 -mpi_np 16
182 babel2 -in 5DC5_docked.oeb.gz -out 5DC5_docked.sdf
183 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5FCW.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5FCW -mpi_np 16
184 babel2 -in 5FCW_docked.oeb.gz -out 5FCW_docked.sdf
185 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5THS.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5THS -mpi_np 16
186 babel2 -in 5THS_docked.oeb.gz -out 5THS_docked.sdf
187 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5THT.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5THT -mpi_np 16
188 babel2 -in 5THT_docked.oeb.gz -out 5THU_docked.oeb.gz_docked.sdf
189 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5THU.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5THU -mpi_np 16
190 babel2 -in 5THU_docked.oeb.gz -out 5THU_docked.sdf
191 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/5THV.oedu -dbase LIGANDS.oeb.gz -prefix 5THV -mpi_np 16
192 babel2 -in 5THU_docked.oeb.gz -out 5THU_docked.sdf
193 babel2 -in 5THV_docked.oeb.gz -out 5THV_docked.sdf
194 filter -in 1829att.smi -out chembl1829att.smi -unique true -filter file -dots true
195 filter -in 1829inatt.smi -out chembl1829inatt.smi -unique true -filter file -dots true
196 tautomers -in chembl1829att.smi -out chembl1829att.oeb.gz -prefix 1829att
197 tautomers -in chembl1829inatt.smi -out chembl1829inatt.oeb.gz -prefix 1829inatt
198 oeomega macrocycle -in 1829ATTfail.smi -out oeo1829ATT.oeb.gz -prefix oeo1829ATT -progress percent -mpi_np 32
199 oeomega macrocycle -in 1829INATTfail.smi -out oeo1829INATT.oeb.gz -prefix oeo1829INATT -progress percent -mpi_np 32
200 babel2 -in 1829INATT.oeb.gz -out 1829INATT.sdf -mc true

201 babel2 -in oeo1829INATT.oeb.gz -out oeo1829INATT.sdf -mc true
202 babel2 -in oeo1829ATT.oeb.gz -out oeo1829ATT.sdf -mc true
203 cat *.sdf > file.sdf
204 babel2 -in CHEMBL1829.sdf -out CHEMBL1829.oeb.gz -mc true
205 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/4A69.oedu -dbase CHEMBL1829.oeb.gz -prefix 4a69CHEMBL1829 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
206 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/4A69.oedu -dbase CHEMBL1829.oeb.gz -prefix 4a69CHEMBL1829 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
207 babel2 -in CHEMBL1829.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 500 -chunk_prefix CHEMBL1829 -ofmt oeb.gz
208 babel2 -in CHEMBL182907.oeb out CHEMBL182911.smi
209 babel2 -in CHEMBL182907.oeb -out CHEMBL182911.smi
210 babel2 -in CHEMBL182911.oeb -out CHEMBL182911.smi
211 babel2 -in CHEMBL182920.oeb -out CHEMBL182920.smi
212 babel2 -in CHEMBL182935.oeb -out CHEMBL182935.smi
213 filter -in 1865att.smi -out chembl1865att.smi -unique true -filter file -dots true
214 filter -in 1865inatt.smi -out chembl1865inatt.smi -unique true -filter file -dots true
215 tautomers -in chembl1865att.smi -out chembl1865att.oeb.gz -prefix 1865att
216 omega2 -in chembl1865att.oeb.gz -out 1865ATT.oeb.gz -progress percent -prefix 1865ATT -mpi_np 16 -strict false
217 omega_macrocycle -in 1865ATTfail.smi -out macro1865ATT.oeb.gz -prefix macro1865ATT -progress percent -mpi_np 32
218 oeomega macrocycle -in 1865ATTfail.smi -out oeo1865ATT.oeb.gz -prefix oeo1865ATT -progress percent -mpi_np 32
219 tautomers -in chembl1865inatt.smi -out chembl1865inatt.oeb.gz -prefix 1865inatt
220 omega2 -in chembl1865inatt.oeb.gz -out 1865INATT.oeb.gz -progress percent -prefix 1865INATT -mpi_np 32 -strict false

221 oeomega macrocycle -in 1865INATTfail.smi -out oeo1865INATT.oeb.gz -prefix oeo1865INATT -progress percent -mpi_np 32
222 babel2 -in 1865ATT.oeb.gz -out 1865ATT.sdf
223 babel2 -in oeo1865ATT.oeb.gz -out oeo1865ATT.sdf
224 cat *.sdf > file.sdf
225 babel2 -in 1865INATT.oeb.gz -out 1865INATT.sdf
226 babel2 -in oeo1865INATT.oeb.gz -out oeo1865INATT.sdf
227 cat *.sdf > file.sdf
228 babel2 -in CHEMBL1865.sdf -out CHEMBL1865.oeb.gz
229 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR\5EDU.oedu -dbase CHEMBL1865.oeb.gz -prefix 5eduCHEMBL1865 -mpi_np 32
230 omega2 -in chembl2937inatt.oeb.gz -out 2937INATT.oeb.gz -progress percent -prefix 2937INATT -mpi_np 32 -strict false
231 oeomega macrocycle -in 2937ATTfail.smi -out oeo2937ATT.oeb.gz -prefix oeo2937ATT -progress percent -mpi_np 32
232 oeomega macrocycle -in 2937INATTfail.smi -out oeo2937INATT.oeb.gz -prefix oeo2937INATT -progress percent -mpi_np 32
233 babel2 -in 2937ATT.oeb.gz -out 2937ATT.sdf
234 babel2 -in 2937INATT.oeb.gz -out 2937INATT.sdf
235 babel2 -in oeo2937ATT.oeb.gz -out oeo2937ATT.sdf
236 babel2 -in oeo2937INATT.oeb.gz -out oeo2937INATT.sdf
237 cat *.sdf > file.sdf
238 babel2 -in CHEMBL2937.sdf -out CHEMBL2937.oeb.gz
239 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR\3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937.oeb.gz -prefix 3maxCHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
240 oeomega macrocycle -in 2937ATTfail.smi -out oeo2937ATT.oeb.gz -prefix oeo2937ATT -progress percent -mpi_np 32

241 oeomega macrocycle -in 2937INATTfail.smi -out oeo2937INATT.oeb.gz -prefix oeo2937INATT -progress percent -mpi_np 32
242 babel2 -in oeo2937ATT.oeb.gz -out oeo2937ATT.sdf
243 babel2 -in oeo2937INATT.oeb.gz -out oeo2937INATT.sdf
244 cat *sdf > file.sdf
245 babel2 -in CHEMBL2937.sdf -out CHEMBL2937.oeb.gz
246 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937.oeb.gz -prefix 3maxCHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
247 babel2 -in CHEMBL2937.sdf -out CHEMBL2937.oeb.gz -mc true
248 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937.oeb.gz -prefix 3maxCHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
249 babel2 -in CHEMBL2937.sdf -out CHEMBL2937.oeb.gz -mc true -chunk true -chunk_filecount 6 -chunk_prefix CHEMBL2937
250 babel2 -in CHEMBL2937.sdf -mc true -chunk true -chunk_filecount 6 -chunk_prefix CHEMBL2937 -ofmt oeb.gz
251 babel2 -in CHEMBL2937.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 500 -chunk_prefix CHEMBL2937 -ofmt oeb.gz
252 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937_01.oeb.gz -prefix 3max1CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
253 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937_02.oeb.gz -prefix 3max2CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
254 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937_03.oeb.gz -prefix 3max3CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
255 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937_04.oeb.gz -prefix 3max4CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
256 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase CHEMBL2937_05.oeb.gz -prefix 3max5CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
257 babel2 -in CHEMBL2937_05.oeb.gz -out CHEMBL2937_05.sdf
258 babel2 -in CHEMBL2937_05.oeb.gz -mc true -chunk true -chunk_molcount 50 -chunk_prefix CHEMBL2937_05 -ofmt oeb.gz
259 babel2 -in CHEMBL2937_05.oeb.gz -mc true -chunk true -chunk_molcount 50 -chunk_prefix CHEMBL2937_05
260 babel2 -in CHEMBL2937_05.oeb.gz -out CHEMBL2937_05.smi

261 babel2 -in CHEMBL2937.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 500 -chunk_prefix CHEMBL2937 -ofmt oeb.gz
262 babel2 -in CHEMBL2937_05.oeb -out CHEMBL2937_05.sdf
263 babel2 -in CHEMBL2937_05.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 23 -chunk_prefix chembl2937 -ofmt oeb.gz
264 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_01.oeb.gz -prefix 3MAX1CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
265 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_02.oeb.gz -prefix 3MAX2CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
266 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_03.oeb.gz -prefix 3MAX3CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
267 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_04.oeb.gz -prefix 3MAX4CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
268 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_05.oeb.gz -prefix 3MAX5CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
269 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_06.oeb.gz -prefix 3MAX6CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
270 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_07.oeb.gz -prefix 3MAX7CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
271 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_08.oeb.gz -prefix 3MAX8CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
272 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_09.oeb.gz -prefix 3MAX9CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
273 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_010.oeb.gz -prefix 3MAX10CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
274 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_011.oeb.gz -prefix 3MAX11CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
275 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_012.oeb.gz -prefix 3MAX12CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
276 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_013.oeb.gz -prefix 3MAX13CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
277 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_014.oeb.gz -prefix 3MAX14CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
278 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_10.oeb.gz -prefix 3MAX10CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
279 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_11.oeb.gz -prefix 3MAX11CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
280 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_12.oeb.gz -prefix 3MAX12CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0

281 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_13.oeb.gz -prefix 3MAX13CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
282 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_14.oeb.gz -prefix 3MAX14CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
283 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_15.oeb.gz -prefix 3MAX15CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
284 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_16.oeb.gz -prefix 3MAX16CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
285 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_17.oeb.gz -prefix 3MAX17CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
286 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_18.oeb.gz -prefix 3MAX18CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
287 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_19.oeb.gz -prefix 3MAX19CHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
288 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl2937_.oeb.gz -prefix 3MAXCHEMBL2937 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
289 cat *.oeb > filechembl.oeb
290 babel2 -in filechembl.oeb -out filechembl.sdf
291 babel2 -in filechembl.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 15 -chunk_prefix filechembl -ofmt oeb.gz
292 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl2937_01.oeb.gz -prefix 3MAXfilechembl2937 -mpi_np 32 -hitlist_size
0
293 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl_01.oeb.gz -prefix 3MAXfilechemb -mpi_np 32 -hitlist_size 0
294 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl_02.oeb.gz -prefix 3MAXfilechemb2 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
295 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl_03.oeb.gz -prefix 3MAXfilechemb3 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
296 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl_04.oeb.gz -prefix 3MAXfilechemb4 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
297 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl_05.oeb.gz -prefix 3MAXfilechemb5 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
298 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl_06.oeb.gz -prefix 3MAXfilechemb6 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
299 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase filechembl_07.oeb.gz -prefix 3MAXfilechemb7 -mpi_np 32 -hitlist_size 0


```
300  cat *.oeb > chembl.oeb
301  babel2 -in chembl.oeb -out chembl.sdf
302  babel2 -in chembl.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 5 -chunk_prefix chembl -ofmt oeb.gz
303  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_01.oeb.gz -prefix chemb1 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
304  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_02.oeb.gz -prefix chemb2 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
305  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_03.oeb.gz -prefix chemb3 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
306  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_04.oeb.gz -prefix chemb4 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
307  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_05.oeb.gz -prefix chemb5 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
308  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_06.oeb.gz -prefix chemb6 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
309  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_07.oeb.gz -prefix chemb7 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
310  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_08.oeb.gz -prefix chemb8 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
311  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_09.oeb.gz -prefix chemb9 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
312  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_10.oeb.gz -prefix chemb10 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
313  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_11.oeb.gz -prefix chemb11 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
314  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chembl_12.oeb.gz -prefix chemb12 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
315  cat *.oeb > chemb.oeb
316  babel2 -in chemb.oeb -out chemb.sdf
317  babel2 -in chemb.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 2 -chunk_prefix chemb -ofmt oeb.gz
318  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_01.oeb.gz -prefix chem1 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
319  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_02.oeb.gz -prefix chem2 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
```

320 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_03.oeb.gz -prefix chem3 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
321 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_04.oeb.gz -prefix chem4 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
322 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_05.oeb.gz -prefix chem5 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
323 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_06.oeb.gz -prefix chem6 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
324 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_07.oeb.gz -prefix chem7 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
325 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_08.oeb.gz -prefix chem8 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
326 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_09.oeb.gz -prefix chem9 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
327 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_10.oeb.gz -prefix chem10 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
328 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_11.oeb.gz -prefix chem11 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
329 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_12.oeb.gz -prefix chem12 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
330 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemb_13.oeb.gz -prefix chem13 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
331 cat *.oeb > chemby.oeb
332 babel2 -in chemby.oeb -out chemby.sdf
333 babel2 -in chemby.sdf -mc true -chunk true -chunk_molcount 1 -chunk_prefix chemby -ofmt oeb.gz
334 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_01.oeb.gz -prefix chemby1 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
335 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_02.oeb.gz -prefix chemby2 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
336 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_03.oeb.gz -prefix chemby3 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
337 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_04.oeb.gz -prefix chemby4 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
338 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_05.oeb.gz -prefix chemby5 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
339 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_06.oeb.gz -prefix chemby6 -mpi_np 32 -hitlist_size 0

```
340 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_07.oeb.gz -prefix chemby7 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
341 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_08.oeb.gz -prefix chemby8 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
342 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_09.oeb.gz -prefix chemby9 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
343 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/3MAX.oedu -dbase chemby_10.oeb.gz -prefix chemby10 -mpi_np 32 -hitlist_size 0
344 babel2 -in chemby_01.oeb -out chemby_01.smi
345 babel2 -in chemby_03.oeb -out chemby_03.smi
346 babel2 -in chemby_06.oeb -out chemby_06.smi
347 babel2 -in chemby_07.oeb -out chemby_07.smi
348 babel2 -in chemby_10.oeb -out chemby_10.smi
349 cat *.smi > errori.smi
350 sh ZINCmw200.wget
351 sh ZINCmw250.wget
352 sh ZINCmw300.wget
353 sh ZINCmw325.wget
354 sh ZINCmw350.wget
355 filter -in 250bb.smi -out 250BB.smi -unique true -filter file -dots true
356 tautomers -in 250BB.smi -out 250BB.oeb.gz -prefix 250BB
357 omega2 -in 250BB.oeb.gz -out omega250BB.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BB -mpi_np 32 -strict false
358 oeomega macrocycle -in omega250BBfail.smi -out oeo250BB.oeb.gz -prefix oeo250BB -progress percent -mpi_np 32
359 babel2 -in omega250BB.oeb.gz -out omega250BB.sdf -mc true
```

```
360  babel2 -in oeo250BB.oeb.gz -out oeo250BB.sdf -mc true
361  cat *.sdf > file.sdf
362  babel2 -in ZINC250bb.sdf -out ZINC250bb.oeb.gz -mc true
363  fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase ZINC250bb.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250bb -mpi_np 32
364  tautomers -in 250BB.smi -out 250BB.oeb.gz -prefix 250bb
365  tautomers -in 250BC.smi -out 250BC.oeb.gz -prefix 250bc
366  tautomers -in 250BD.smi -out 250BD.oeb.gz -prefix 250bd
367  tautomers -in 250BE.smi -out 250BE.oeb.gz -prefix 250be
368  tautomers -in 250BF.smi -out 250BF.oeb.gz -prefix 250bf
369  tautomers -in 250BG.smi -out 250BG.oeb.gz -prefix 250bg
370  tautomers -in 250BH.smi -out 250BH.oeb.gz -prefix 250bh
371  tautomers -in 250BI.smi -out 250BI.oeb.gz -prefix 250bi
372  tautomers -in 250BJ.smi -out 250BJ.oeb.gz -prefix 250bj
373  tautomers -in 300CB.smi -out 300CB.oeb.gz -prefix 300cb
374  tautomers -in 300CC.smi -out 300CC.oeb.gz -prefix 300cc
375  tautomers -in 300CD.smi -out 300CD.oeb.gz -prefix 300cd
376  tautomers -in 300CE.smi -out 300CE.oeb.gz -prefix 300ce
377  tautomers -in 300CF.smi -out 300CF.oeb.gz -prefix 300cf
378  tautomers -in 300CG.smi -out 300CG.oeb.gz -prefix 300cg
379  tautomers -in 300CH.smi -out 300CH.oeb.gz -prefix 300ch
```

380 tautomers -in 300CI.smi -out 300CI.oeb.gz -prefix 300ci
381 tautomers -in 300CJ.smi -out 300CJ.oeb.gz -prefix 300cj
382 tautomers -in 325DB.smi -out 325DB.oeb.gz -prefix 325db
383 tautomers -in 325DC.smi -out 325DC.oeb.gz -prefix 325dc
384 tautomers -in 325DD.smi -out 325DD.oeb.gz -prefix 325dd
385 tautomers -in 325DE.smi -out 325DE.oeb.gz -prefix 325de
386 tautomers -in 325DF.smi -out 325DF.oeb.gz -prefix 325df
387 tautomers -in 325DG.smi -out 325DG.oeb.gz -prefix 325dg
388 tautomers -in 325DH.smi -out 325DH.oeb.gz -prefix 325dh
389 tautomers -in 325DI.smi -out 325DI.oeb.gz -prefix 325di
390 tautomers -in 325DJ.smi -out 325DJ.oeb.gz -prefix 325dj
391 tautomers -in 350EB.smi -out 350EB.oeb.gz -prefix 350eb
392 tautomers -in 350EC.smi -out 350EC.oeb.gz -prefix 350ec
393 tautomers -in 350ED.smi -out 350ED.oeb.gz -prefix 350ed
394 tautomers -in 350EE.smi -out 350EE.oeb.gz -prefix 350ee
395 tautomers -in 350EF.smi -out 350EF.oeb.gz -prefix 350ef
396 tautomers -in 350EG.smi -out 350EG.oeb.gz -prefix 350eg
397 tautomers -in 350EH.smi -out 350EH.oeb.gz -prefix 350eh
398 tautomers -in 350EI.smi -out 350EI.oeb.gz -prefix 350ei
399 tautomers -in 350EJ.smi -out 350EJ.oeb.gz -prefix 350ej

```
400 sh filetau
401 omega2 -in 250BB.oeb.gz -out omega250BB.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BB -mpi_np 32 -strict false
402 omega2 -in 250BC.oeb.gz -out omega250BC.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BC -mpi_np 32 -strict false
403 omega2 -in 250BD.oeb.gz -out omega250BD.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BD -mpi_np 32 -strict false
404 omega2 -in 250BE.oeb.gz -out omega250BE.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BE -mpi_np 32 -strict false
405 omega2 -in 250BF.oeb.gz -out omega250BF.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BF -mpi_np 32 -strict false
406 omega2 -in 250BG.oeb.gz -out omega250BG.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BG -mpi_np 32 -strict false
407 omega2 -in 250BH.oeb.gz -out omega250BH.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BH -mpi_np 32 -strict false
408 omega2 -in 250BI.oeb.gz -out omega250BI.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BI -mpi_np 32 -strict false
409 omega2 -in 250BJ.oeb.gz -out omega250BJ.oeb.gz -progress percent -prefix omega250BJ -mpi_np 32 -strict false
410 omega2 -in 300CB.oeb.gz -out omega300CB.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CB -mpi_np 32 -strict false
411 omega2 -in 300CC.oeb.gz -out omega300CC.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CC -mpi_np 32 -strict false
412 omega2 -in 300CD.oeb.gz -out omega300CD.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CD -mpi_np 32 -strict false
413 omega2 -in 300CE.oeb.gz -out omega300CE.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CE -mpi_np 32 -strict false
414 omega2 -in 300CF.oeb.gz -out omega300CF.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CF -mpi_np 32 -strict false
415 omega2 -in 300CG.oeb.gz -out omega300CG.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CG -mpi_np 32 -strict false
416 omega2 -in 300CH.oeb.gz -out omega300CH.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CH -mpi_np 32 -strict false
417 omega2 -in 300CI.oeb.gz -out omega300CI.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CI -mpi_np 32 -strict false
418 omega2 -in 300CJ.oeb.gz -out omega300CJ.oeb.gz -progress percent -prefix omega300CJ -mpi_np 32 -strict false
419 omega2 -in 325DB.oeb.gz -out omega325DB.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DB -mpi_np 32 -strict false
```

420 omega2 -in 325DC.oeb.gz -out omega325DC.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DC -mpi_np 32 -strict false
421 omega2 -in 325DD.oeb.gz -out omega325DD.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DD -mpi_np 32 -strict false
422 omega2 -in 325DE.oeb.gz -out omega325DE.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DE -mpi_np 32 -strict false
423 omega2 -in 325DF.oeb.gz -out omega325DF.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DF -mpi_np 32 -strict false
424 omega2 -in 325DG.oeb.gz -out omega325DG.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DG -mpi_np 32 -strict false
425 omega2 -in 325DH.oeb.gz -out omega325DH.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DH -mpi_np 32 -strict false
426 omega2 -in 325DI.oeb.gz -out omega325DI.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DI -mpi_np 32 -strict false
427 omega2 -in 325DJ.oeb.gz -out omega325DJ.oeb.gz -progress percent -prefix omega325DJ -mpi_np 32 -strict false
428 omega2 -in 350EB.oeb.gz -out omega350EB.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EB -mpi_np 32 -strict false
429 omega2 -in 350EC.oeb.gz -out omega350EC.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EC -mpi_np 32 -strict false
430 omega2 -in 350ED.oeb.gz -out omega350ED.oeb.gz -progress percent -prefix omega350ED -mpi_np 32 -strict false
431 omega2 -in 350EE.oeb.gz -out omega350EE.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EE -mpi_np 32 -strict false
432 omega2 -in 350EF.oeb.gz -out omega350EF.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EF -mpi_np 32 -strict false
433 omega2 -in 350EG.oeb.gz -out omega350EG.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EG -mpi_np 32 -strict false
434 omega2 -in 350EH.oeb.gz -out omega350EH.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EH -mpi_np 32 -strict false
435 omega2 -in 350EI.oeb.gz -out omega350EI.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EI -mpi_np 32 -strict false
436 omega2 -in 350EJ.oeb.gz -out omega350EJ.oeb.gz -progress percent -prefix omega350EJ -mpi_np 32 -strict false
437 sh fileomega
438 oeomega macrocycle -in omega250BBfail.smi -out oeo250BB.oeb.gz -prefix oeo250BB -progress percent -mpi_np 32
439 oeomega macrocycle -in omega250BCfail.smi -out oeo250BC.oeb.gz -prefix oeo250BC -progress percent -mpi_np 32

440 oeomega macrocycle -in omega250BDfail.smi -out oeo250BD.oeb.gz -prefix oeo250BD -progress percent -mpi_np 32
441 oeomega macrocycle -in omega250BEfail.smi -out oeo250BE.oeb.gz -prefix oeo250BE -progress percent -mpi_np 32
442 oeomega macrocycle -in omega250BFfail.smi -out oeo250BF.oeb.gz -prefix oeo250BF -progress percent -mpi_np 32
443 oeomega macrocycle -in omega250BGfail.smi -out oeo250BG.oeb.gz -prefix oeo250BG -progress percent -mpi_np 32
444 oeomega macrocycle -in omega250BHfail.smi -out oeo250BH.oeb.gz -prefix oeo250BH -progress percent -mpi_np 32
445 oeomega macrocycle -in omega250BIfail.smi -out oeo250BI.oeb.gz -prefix oeo250BI -progress percent -mpi_np 32
446 oeomega macrocycle -in omega250BJfail.smi -out oeo250BJ.oeb.gz -prefix oeo250BJ -progress percent -mpi_np 32
447 oeomega macrocycle -in omega300CBfail.smi -out oeo300CB.oeb.gz -prefix oeo300CB -progress percent -mpi_np 32
448 oeomega macrocycle -in omega300CCfail.smi -out oeo300CC.oeb.gz -prefix oeo300CC -progress percent -mpi_np 32
449 oeomega macrocycle -in omega300CDfail.smi -out oeo300CD.oeb.gz -prefix oeo300CD -progress percent -mpi_np 32
450 oeomega macrocycle -in omega300CEfail.smi -out oeo300CE.oeb.gz -prefix oeo300CE -progress percent -mpi_np 32
451 oeomega macrocycle -in omega300CFfail.smi -out oeo300CF.oeb.gz -prefix oeo300CF -progress percent -mpi_np 32
452 oeomega macrocycle -in omega300CGfail.smi -out oeo300CG.oeb.gz -prefix oeo300CG -progress percent -mpi_np 32
453 oeomega macrocycle -in omega300CHfail.smi -out oeo300CH.oeb.gz -prefix oeo300CH -progress percent -mpi_np 32
454 oeomega macrocycle -in omega300CIfail.smi -out oeo300CI.oeb.gz -prefix oeo300CI -progress percent -mpi_np 32
455 oeomega macrocycle -in omega300CJfail.smi -out oeo300CJ.oeb.gz -prefix oeo300CJ -progress percent -mpi_np 32
456 oeomega macrocycle -in omega325DBfail.smi -out oeo325DB.oeb.gz -prefix oeo325DB -progress percent -mpi_np 32
457 oeomega macrocycle -in omega325DCfail.smi -out oeo325DC.oeb.gz -prefix oeo325DC -progress percent -mpi_np 32
458 oeomega macrocycle -in omega325DDfail.smi -out oeo325DD.oeb.gz -prefix oeo325DD -progress percent -mpi_np 32
459 oeomega macrocycle -in omega325DEfail.smi -out oeo325DE.oeb.gz -prefix oeo325DE -progress percent -mpi_np 32

460 oeomega macrocycle -in omega325DFfail.smi -out oeo325DF.oeb.gz -prefix oeo325DF -progress percent -mpi_np 32
461 oeomega macrocycle -in omega325DGfail.smi -out oeo325DG.oeb.gz -prefix oeo325DG -progress percent -mpi_np 32
462 oeomega macrocycle -in omega325DHfail.smi -out oeo325DH.oeb.gz -prefix oeo325DH -progress percent -mpi_np 32
463 oeomega macrocycle -in omega325DIfail.smi -out oeo325DI.oeb.gz -prefix oeo325DI -progress percent -mpi_np 32
464 oeomega macrocycle -in omega325DJfail.smi -out oeo325DJ.oeb.gz -prefix oeo325DJ -progress percent -mpi_np 32
465 oeomega macrocycle -in omega350EBfail.smi -out oeo350EB.oeb.gz -prefix oeo350EB -progress percent -mpi_np 32
466 oeomega macrocycle -in omega350ECfail.smi -out oeo350EC.oeb.gz -prefix oeo350EC -progress percent -mpi_np 32
467 oeomega macrocycle -in omega350EDfail.smi -out oeo350ED.oeb.gz -prefix oeo350ED -progress percent -mpi_np 32
468 oeomega macrocycle -in omega350EEfail.smi -out oeo350EE.oeb.gz -prefix oeo350EE -progress percent -mpi_np 32
469 oeomega macrocycle -in omega350EFFail.smi -out oeo350EF.oeb.gz -prefix oeo350EF -progress percent -mpi_np 32
470 oeomega macrocycle -in omega350EGfail.smi -out oeo350EG.oeb.gz -prefix oeo350EG -progress percent -mpi_np 32
471 oeomega macrocycle -in omega350EHfail.smi -out oeo350EH.oeb.gz -prefix oeo350EH -progress percent -mpi_np 32
472 oeomega macrocycle -in omega350EIfail.smi -out oeo350EI.oeb.gz -prefix oeo350EI -progress percent -mpi_np 32
473 oeomega macrocycle -in omega350EJfail.smi -out oeo350EJ.oeb.gz -prefix oeo350EJ -progress percent -mpi_np 32
474 sh fileoeomega
475 babel2 -in omega250BB.oeb.gz -out omega250BB.sdf -mc true
476 babel2 -in omega250BC.oeb.gz -out omega250BC.sdf -mc true
477 babel2 -in omega250BD.oeb.gz -out omega250BD.sdf -mc true
478 babel2 -in omega250BE.oeb.gz -out omega250BE.sdf -mc true
479 babel2 -in omega250BF.oeb.gz -out omega250BF.sdf -mc true

480 babel2 -in omega250BG.oeb.gz -out omega250BG.sdf -mc true
481 babel2 -in omega250BH.oeb.gz -out omega250BH.sdf -mc true
482 babel2 -in omega250BI.oeb.gz -out omega250BI.sdf -mc true
483 babel2 -in omega250BJ.oeb.gz -out omega250BJ.sdf -mc true
484 babel2 -in omega300CB.oeb.gz -out omega300CB.sdf -mc true
485 babel2 -in omega300CC.oeb.gz -out omega300CC.sdf -mc true
486 babel2 -in omega300CD.oeb.gz -out omega300CD.sdf -mc true
487 babel2 -in omega300CE.oeb.gz -out omega300CE.sdf -mc true
488 babel2 -in omega300CF.oeb.gz -out omega300CF.sdf -mc true
489 babel2 -in omega300CG.oeb.gz -out omega300CG.sdf -mc true
490 babel2 -in omega300CH.oeb.gz -out omega300CH.sdf -mc true
491 babel2 -in omega300CI.oeb.gz -out omega300CI.sdf -mc true
492 babel2 -in omega300CJ.oeb.gz -out omega300CJ.sdf -mc true
493 babel2 -in omega325DB.oeb.gz -out omega325DB.sdf -mc true
494 babel2 -in omega325DC.oeb.gz -out omega325DC.sdf -mc true
495 babel2 -in omega325DD.oeb.gz -out omega325DD.sdf -mc true
496 babel2 -in omega325DE.oeb.gz -out omega325DE.sdf -mc true
497 babel2 -in omega325DF.oeb.gz -out omega325DF.sdf -mc true
498 babel2 -in omega325DG.oeb.gz -out omega325DG.sdf -mc true
499 babel2 -in omega325DH.oeb.gz -out omega325DH.sdf -mc true

500 babel2 -in omega325DI.oeb.gz -out omega325DI.sdf -mc true
501 babel2 -in omega325DJ.oeb.gz -out omega325DJ.sdf -mc true
502 babel2 -in omega350EB.oeb.gz -out omega350EB.sdf -mc true
503 babel2 -in omega350EC.oeb.gz -out omega350EC.sdf -mc true
504 babel2 -in omega350ED.oeb.gz -out omega350ED.sdf -mc true
505 babel2 -in omega350EE.oeb.gz -out omega350EE.sdf -mc true
506 babel2 -in omega350EF.oeb.gz -out omega350EF.sdf -mc true
507 babel2 -in omega350EG.oeb.gz -out omega350EG.sdf -mc true
508 babel2 -in omega350EH.oeb.gz -out omega350EH.sdf -mc true
509 babel2 -in omega350EI.oeb.gz -out omega350EI.sdf -mc true
510 babel2 -in omega350EJ.oeb.gz -out omega350EJ.sdf -mc true
511 babel2 -in oeo250BB.oeb.gz -out oeo250BB.sdf -mc true
512 babel2 -in oeo250BC.oeb.gz -out oeo250BC.sdf -mc true
513 babel2 -in oeo250BD.oeb.gz -out oeo250BD.sdf -mc true
514 babel2 -in oeo250BE.oeb.gz -out oeo250BE.sdf -mc true
515 babel2 -in oeo250BF.oeb.gz -out oeo250BF.sdf -mc true
516 babel2 -in oeo250BG.oeb.gz -out oeo250BG.sdf -mc true
517 babel2 -in oeo250BH.oeb.gz -out oeo250BH.sdf -mc true
518 babel2 -in oeo250BI.oeb.gz -out oeo250BI.sdf -mc true
519 babel2 -in oeo250BJ.oeb.gz -out oeo250BJ.sdf -mc true

520 babel2 -in oeo300CB.oeb.gz -out oeo300CB.sdf -mc true
521 babel2 -in oeo300CC.oeb.gz -out oeo300CC.sdf -mc true
522 babel2 -in oeo300CD.oeb.gz -out oeo300CD.sdf -mc true
523 babel2 -in oeo300CE.oeb.gz -out oeo300CE.sdf -mc true
524 babel2 -in oeo300CF.oeb.gz -out oeo300CF.sdf -mc true
525 babel2 -in oeo300CG.oeb.gz -out oeo300CG.sdf -mc true
526 babel2 -in oeo300CH.oeb.gz -out oeo300CH.sdf -mc true
527 babel2 -in oeo300CI.oeb.gz -out oeo300CI.sdf -mc true
528 babel2 -in oeo300CJ.oeb.gz -out oeo300CJ.sdf -mc true
529 babel2 -in oeo325DB.oeb.gz -out oeo325DB.sdf -mc true
530 babel2 -in oeo325DC.oeb.gz -out oeo325DC.sdf -mc true
531 babel2 -in oeo325DD.oeb.gz -out oeo325DD.sdf -mc true
532 babel2 -in oeo325DE.oeb.gz -out oeo325DE.sdf -mc true
533 babel2 -in oeo325DF.oeb.gz -out oeo325DF.sdf -mc true
534 babel2 -in oeo325DG.oeb.gz -out oeo325DG.sdf -mc true
535 babel2 -in oeo325DH.oeb.gz -out oeo325DH.sdf -mc true
536 babel2 -in oeo325DI.oeb.gz -out oeo325DI.sdf -mc true
537 babel2 -in oeo325DJ.oeb.gz -out oeo325DJ.sdf -mc true
538 babel2 -in oeo350EB.oeb.gz -out oeo350EB.sdf -mc true
539 babel2 -in oeo350EC.oeb.gz -out oeo350EC.sdf -mc true

540 babel2 -in oeo350ED.oeb.gz -out oeo350ED.sdf -mc true
541 babel2 -in oeo350EE.oeb.gz -out oeo350EE.sdf -mc true
542 babel2 -in oeo350EF.oeb.gz -out oeo350EF.sdf -mc true
543 babel2 -in oeo350EG.oeb.gz -out oeo350EG.sdf -mc true
544 babel2 -in oeo350EH.oeb.gz -out oeo350EH.sdf -mc true
545 babel2 -in oeo350EI.oeb.gz -out oeo350EI.sdf -mc true
546 babel2 -in oeo350EJ.oeb.gz -out oeo350EJ.sdf -mc true
547 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BB.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BB -mpi_np 32
548 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BC.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BC -mpi_np 32
549 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BD.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BD -mpi_np 32
550 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BE.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BE -mpi_np 32
551 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BF.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BF -mpi_np 32
552 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BG.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BG -mpi_np 32
553 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BH.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BH -mpi_np 32
554 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BI.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BI -mpi_np 32
555 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega250BJ.oeb.gz -prefix 7ltgZINC250BJ -mpi_np 32
556 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CB.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CB -mpi_np 32
557 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CC.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CC -mpi_np 32
558 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CD.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CD -mpi_np 32
559 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CE.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CE -mpi_np 32

560 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CF.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CF -mpi_np 32
561 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CG.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CG -mpi_np 32
562 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CH.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CH -mpi_np 32
563 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CI.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CI -mpi_np 32
564 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega300CJ.oeb.gz -prefix 7ltgZINC300CJ -mpi_np 32
565 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DB.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DB -mpi_np 32
566 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DC.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DC -mpi_np 32
567 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DD.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DD -mpi_np 32
568 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DE.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DE -mpi_np 32
569 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DF.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DF -mpi_np 32
570 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DG.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DG -mpi_np 32
571 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DH.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DH -mpi_np 32
572 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DI.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DI -mpi_np 32
573 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega325DJ.oeb.gz -prefix 7ltgZINC325DJ -mpi_np 32
574 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EB.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EB -mpi_np 32
575 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EC.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EC -mpi_np 32
576 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350ED.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350ED -mpi_np 32
577 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EE.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EE -mpi_np 32
578 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EF.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EF -mpi_np 32
579 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EG.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EG -mpi_np 32

580 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EH.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EH -mpi_np 32
581 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EI.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EI -mpi_np 32
582 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase omega350EJ.oeb.gz -prefix 7ltgZINC350EJ -mpi_np 32
583 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_01.oeb.gz -prefix fail1 -mpi_np 32
584 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_02.oeb.gz -prefix fail2 -mpi_np 32
585 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_03.oeb.gz -prefix fail3 -mpi_np 32
586 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_04.oeb.gz -prefix fail4 -mpi_np 32
587 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_05.oeb.gz -prefix fail5 -mpi_np 32
588 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_06.oeb.gz -prefix fail6 -mpi_np 32
589 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_07.oeb.gz -prefix fail7 -mpi_np 32
590 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_08.oeb.gz -prefix fail8 -mpi_np 32
591 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_09.oeb.gz -prefix fail9 -mpi_np 32
592 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_10.oeb.gz -prefix fail10 -mpi_np 32
593 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_11.oeb.gz -prefix fail11 -mpi_np 32
594 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_12.oeb.gz -prefix fail12 -mpi_np 32
595 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_13.oeb.gz -prefix fail13 -mpi_np 32
596 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_14.oeb.gz -prefix fail14 -mpi_np 32
597 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_15.oeb.gz -prefix fail15 -mpi_np 32
598 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_16.oeb.gz -prefix fail16 -mpi_np 32
599 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_17.oeb.gz -prefix fail17 -mpi_np 32

600 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_18.oeb.gz -prefix fail18 -mpi_np 32
601 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_19.oeb.gz -prefix fail19 -mpi_np 32
602 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_20.oeb.gz -prefix fail20 -mpi_np 32
603 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_21.oeb.gz -prefix fail21 -mpi_np 32
604 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_22.oeb.gz -prefix fail22 -mpi_np 32
605 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_23.oeb.gz -prefix fail23 -mpi_np 32
606 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_24.oeb.gz -prefix fail24 -mpi_np 32
607 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_25.oeb.gz -prefix fail25 -mpi_np 32
608 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_26.oeb.gz -prefix fail26 -mpi_np 32
609 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_27.oeb.gz -prefix fail27 -mpi_np 32
610 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_28.oeb.gz -prefix fail28 -mpi_np 32
611 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_29.oeb.gz -prefix fail29 -mpi_np 32
612 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_30.oeb.gz -prefix fail30 -mpi_np 32
613 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_31.oeb.gz -prefix fail31 -mpi_np 32
614 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_32.oeb.gz -prefix fail32 -mpi_np 32
615 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_33.oeb.gz -prefix fail33 -mpi_np 32
616 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_34.oeb.gz -prefix fail34 -mpi_np 32
617 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_35.oeb.gz -prefix fail35 -mpi_np 32
618 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_36.oeb.gz -prefix fail36 -mpi_np 32
619 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_37.oeb.gz -prefix fail37 -mpi_np 32

620 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_38.oeb.gz -prefix fail38 -mpi_np 32
621 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_39.oeb.gz -prefix fail39 -mpi_np 32
622 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase fails_40.oeb.gz -prefix fail40 -mpi_np 32
623 fred -receptor MAKE\ RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase oeoTOTALFAIL.oeb.gz -prefix 7ltgZINCoomega -mpi_np 32
624 sh filefred
625 babel2 -in 7ltgZINC250BD_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC250BD.sdf
626 babel2 -in 7ltgZINC250BE_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC250BD.sdf
627 babel2 -in 7ltgZINC250BF_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC250BD.sdf
628 babel2 -in 7ltgZINC250BG_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC250BD.sdf
629 babel2 -in 7ltgZINC250BH_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC250BD.sdf
630 babel2 -in 7ltgZINC250BI_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC250BD.sdf
631 babel2 -in 7ltgZINC250BJ_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC250BD.sdf
632 babel2 -in 7ltgZINC300CB_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CB.sdf
633 babel2 -in 7ltgZINC300CC_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CC.sdf
634 babel2 -in 7ltgZINC300CD_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CD.sdf
635 babel2 -in 7ltgZINC300CE_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CE.sdf
636 babel2 -in 7ltgZINC300CF_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CF.sdf
637 babel2 -in 7ltgZINC300CG_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CG.sdf
638 babel2 -in 7ltgZINC300CH_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CH.sdf
639 babel2 -in 7ltgZINC300CI_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CI.sdf

640 babel2 -in 7ltgZINC300CJ_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC300CJ.sdf
641 babel2 -in 7ltgZINC325DB_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DB.sdf
642 babel2 -in 7ltgZINC325DC_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DC.sdf
643 babel2 -in 7ltgZINC325DD_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DD.sdf
644 babel2 -in 7ltgZINC325DE_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DE.sdf
645 babel2 -in 7ltgZINC325DF_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DF.sdf
646 babel2 -in 7ltgZINC325DG_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DG.sdf
647 babel2 -in 7ltgZINC325DH_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DH.sdf
648 babel2 -in 7ltgZINC325DI_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DI.sdf
649 babel2 -in 7ltgZINC325DJ_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC325DJ.sdf
650 babel2 -in 7ltgZINC350EB_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EB.sdf
651 babel2 -in 7ltgZINC350EC_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EC.sdf
652 babel2 -in 7ltgZINC350ED_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350ED.sdf
653 babel2 -in 7ltgZINC350EE_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EE.sdf
654 babel2 -in 7ltgZINC350EF_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EF.sdf
655 babel2 -in 7ltgZINC350EG_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EG.sdf
656 babel2 -in 7ltgZINC350EH_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EH.sdf
657 babel2 -in 7ltgZINC350EI_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EI.sdf
658 babel2 -in 7ltgZINC350EJ_docked.oeb.gz -out 7ltgZINC350EJ.sdf
659 fred -receptor MAKE\RECEPTOR/7LTG.oedu -dbase zincdocking.oeb.gz -prefix zinc -mpi_np 32

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Roche, J.; Bertrand, P. Inside HDACs with More Selective HDAC Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *121*, 451–483. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.047>.
- (2) Kazantsev, A. G.; Thompson, L. M. Therapeutic Application of Histone Deacetylase Inhibitors for Central Nervous System Disorders. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (10), 854–868. <https://doi.org/10.1038/nrd2681>.
- (3) Milazzo, G.; Mercatelli, D.; Di Muzio, G.; Triboli, L.; De Rosa, P.; Perini, G.; Giorgi, F. M. Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. *Genes* **2020**, *11* (5), 556. <https://doi.org/10.3390/genes11050556>.
- (4) Deschamps, N.; Simões-Pires, C. A.; Carrupt, P.-A.; Nurisso, A. How the Flexibility of Human Histone Deacetylases Influences Ligand Binding: An Overview. *Drug Discovery Today* **2015**, *20* (6), 736–742. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.004>.
- (5) Chen, K.; Xu, L.; Wiest, O. Computational Exploration of Zinc Binding Groups for HDAC Inhibition. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (10), 5051–5055. <https://doi.org/10.1021/jo400406g>.
- (6) Neganova, M.; Yu.R., A.; Nebogatikov, V.; Klochkov, S.; Ustyugov, A. Promising Molecular Targets for Pharmacological Therapy of Neurodegenerative Pathologies. *Acta Naturae* **2020**, *12*, 60–80. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10925>.
- (7) Yang, S.; Zhang, R.; Wang, G.; Zhang, Y. The Development Prospection of HDAC Inhibitors as a Potential Therapeutic Direction in Alzheimer’s Disease. *Transl Neurodegener* **2017**, *6* (1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0089-1>.
- (8) De Simone, A.; Milelli, A. Histone Deacetylase Inhibitors as Multitarget Ligands: New Players in Alzheimer’s Disease Drug Discovery? *ChemMedChem* **2019**, *14* (11), 1067–1073. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900174>.
- (9) Xu, K.; Dai, X.-L.; Huang, H.-C.; Jiang, Z.-F. Targeting HDACs: A Promising Therapy for Alzheimer’s Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2011**, *2011*, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2011/143269>.
- (10) The UniProt Consortium; Bateman, A.; Martin, M.-J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E. H.; Britto, R.; Bye-A-Jee, H.; Cukura, A.; Denny, P.; Dogan, T.; Ebenezer, T.; Fan, J.; Garmiri, P.; da Costa Gonzales, L. J.; Hatton-Ellis, E.; Hussein, A.; Ignatchenko, A.; Insana, G.; Ishtiaq, R.; Joshi, V.; Jyothi, D.; Kandasaamy, S.; Lock, A.; Luciani, A.; Lugaric, M.; Luo, J.; Lussi, Y.; MacDougall, A.; Madeira, F.; Mahmoudy, M.;

- Mishra, A.; Moulang, K.; Nightingale, A.; Pundir, S.; Qi, G.; Raj, S.; Raposo, P.; Rice, D. L.; Saidi, R.; Santos, R.; Speretta, E.; Stephenson, J.; Tootoo, P.; Turner, E.; Tyagi, N.; Vasudev, P.; Warner, K.; Watkins, X.; Zaru, R.; Zellner, H.; Bridge, A. J.; Aimo, L.; Argoud-Puy, G.; Auchincloss, A. H.; Axelsen, K. B.; Bansal, P.; Baratin, D.; Batista Neto, T. M.; Blatter, M.-C.; Bolleman, J. T.; Boutet, E.; Breuza, L.; Gil, B. C.; Casals-Casas, C.; Echioukh, K. C.; Coudert, E.; Cuhe, B.; de Castro, E.; Estreicher, A.; Famiglietti, M. L.; Feuermann, M.; Gasteiger, E.; Gaudet, P.; Gehant, S.; Gerritsen, V.; Gos, A.; Gruaz, N.; Hulo, C.; Hyka-Nouspikel, N.; Jungo, F.; Kerhornou, A.; Le Mercier, P.; Lieberherr, D.; Masson, P.; Morgat, A.; Muthukrishnan, V.; Paesano, S.; Pedruzzi, I.; Pilbout, S.; Pourcel, L.; Poux, S.; Pozzato, M.; Pruess, M.; Redaschi, N.; Rivoire, C.; Sigrist, C. J. A.; Sonesson, K.; Sundaram, S.; Wu, C. H.; Arighi, C. N.; Arminski, L.; Chen, C.; Chen, Y.; Huang, H.; Laiho, K.; McGarvey, P.; Natale, D. A.; Ross, K.; Vinayaka, C. R.; Wang, Q.; Wang, Y.; Zhang, J. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51* (D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.
- (11) PyMOL The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
- (12) Hawkins, P.C.D.; Skillman, A.G.; Warren, G.L.; Ellingson, B.A.; Stahl, M.T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and the Cambridge Structural Database *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 572–584.
- (13) McGann, M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J. Chem. Inf. Model.*, **2011**, *51*, 578–596. DOI: 10.1021/Ci100436p
- (14) Mysinger, M. M.; Carchia, M.; Irwin, John. J.; Shoichet, B. K. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (14), 6582–6594. <https://doi.org/10.1021/jm300687e>.
- (15) Tom Fawcett, An Introduction to ROC Analysis, *Pattern Recognition Letters*, Volume 27, Issue 8, **2006**, Pages 861–874, ISSN 0167-8655, <https://doi.org/10.1016/j.Patrec.2005.10.010>.
- (16) Mishra, N.; Basu, A. Exploring Different Virtual Screening Strategies for Acetylcholinesterase Inhibitors. *BioMed Research International* **2013**, *2013*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/236850>.
- (17) Sterling, T.; Irwin, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (11), 2324–2337. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>.

7. RINGRAZIAMENTI

Giunto al termine di questo percorso desidero ringraziare le persone che hanno contribuito al raggiungimento di questo grande obiettivo.

Ringrazio il mio relatore, il professor Alberto Massarotti, da cui ho imparato molto nei mesi di tesi e che si è sempre dimostrato paziente e disponibile nel risolvere ogni mio dubbio.

Ringrazio i miei genitori, che mi sono sempre stati vicini e che nei momenti più complicati non mi hanno mai fatto mancare il loro appoggio.

Ringrazio la mia ragazza, una persona fondamentale che è stata sempre al mio fianco e mi ha stimolato e sostenuto in ogni momento.

Ringrazio i miei amici, con i quali ho condiviso esperienze meravigliose in questi anni e che si sono sempre interessati al mio percorso.

Ringrazio il mio compagno di corso, Marco, con cui ho condiviso le gioie e le incertezze dell'università, e che mi ha aiutato moltissimo nella preparazione di molti esami.