



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Diseño de derivados de quinazolina como potenciales
inhibidores duales en la vía de EGFR: Uso conjunto de adicción
oncogénica, letalidad sintética y polifarmacología**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Ulises Martínez Ortega

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Francisco Hernández Luis



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:

Francisco Hernández Luis

VOCAL:

José Luis Medina Franco

SECRETARIO:

María Eugenia Mendosa Jasso

1er. SUPLENTE:

Audifás Salvador Matus Meza

2° SUPLENTE:

Alejandro Enríquez Cabrera

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 121, CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE:

Ulises Martínez Ortega

Agradecimientos

Agradezco a la Dirección General de Profesiones (DGAPA) por la beca otorgada por medio del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por “Conclusión de estudios” proyecto número IN218117.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada “CONACYT-SEP” proyecto número CB-220664

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) por la licencia académica del programa de cómputo *Desmond* para la realización de este proyecto de tesis.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS GENERALES	3
ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. El largo camino de la quimioterapia: Inicios	6
2.2. Cura, evolución y terapias dirigidas	6
2.3. Dianas emergentes: Cinasas	7
2.5. Tierras desconocidas: Letalidad sintética	13
2.6. Otra tormenta a lo lejos: Polifarmacología	16
2.7. La nueva tormenta ¿amiga?: Las quinazolininas	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivos generales	20
5.2. Objetivos particulares	20
6. METODOLOGÍA	21
6.1. Acoplamiento molecular	21
6.2. Validación del acoplamiento molecular y modo de unión de moléculas diseñadas	22
6.3. Dinámica molecular	22
6.4. Predicción de propiedades fisicoquímicas	23
6.5. Diseño de moléculas	23
6.5.1. Inhibidor EGFR-PARP1 (serie CUMO)	23
6.5.2. Inhibidor EGFR-AKT2 (serie AUMO)	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7.1. Diseño EGFR-PARP1 (serie CUMO)	25
7.1.1. Búsqueda de candidato a fármaco	25
7.1.2. Validación de acoplamiento molecular y estudio consenso de modo de unión	31

7.1.3.	Dinámica molecular	33
7.1.3.1	CUMO-13 en PARP1	33
7.1.3.2	CUMO-13 en EGFR.....	38
7.1.4.	Propiedades fisicoquímicas de serie CUMO	46
7.2.	Diseño EGFR-AKT2 (serie AUMO)	51
7.2.1.	Base de datos	51
7.2.2.	Interacciones clave de AKT2	51
7.2.3.	Selección de <i>Hit</i>	52
7.2.4.	Construcción de candidato a fármaco.....	53
7.2.5.	Validación de acoplamiento molecular y estudio consenso de modo de unión.....	64
7.2.6.	Dinámica molecular	66
7.2.6.1.	AUMO-28 en EGFR.....	67
7.2.6.2.	AUMO-28 en AKT2.....	69
7.2.7.	Aproximación de energías de interacción	73
7.2.8.	Propiedades fisicoquímicas de la serie AUMO	74
8.	CONCLUSIONES.....	79
9.	PERSPECTIVAS	81
10.	REFERENCIAS.....	82
APÉNDICE I.	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	91
APÉNDICE II.	PROTEÍNAS UTILIZADAS	95
APÉNDICE III.	VALIDACIÓN DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	96
APÉNDICE IV.	DISEÑO DE CANDIDATOS	97
APÉNDICE V.	DINÁMICA MOLECULAR	179
APÉNDICE VI.	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y PUNTAJES	185

ABREVIATURAS GENERALES

ATP	Adenosín trifosfato
CI50	Concentración inhibitoria 50
CPCP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPH	Donadores de puente de hidrógeno
EGF	Del inglés Epidermal Growth Factor
EGFR	Del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	Enlaces rotables
EROS	Especies reactivas de oxígeno
IEL	Índice de eficiencia de ligando
IP3K	Del inglés <i>Inositol-3-phosphate kinase</i>
kcal/mol	kilo calorías por mol
LCM	Leucemia crónica mielogénica
LLAI	Leucemia linfocítica aguda infantil
logP	Logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua
MM	Masa molar
MTN	Cáncer de mama triple negativo
NAD+	Nicotín Adenín Dinucleótido oxidado
Nam	Nicotinamida
NCI	Del inglés <i>National Cancer Institute</i>
OPLS3	Del inglés <i>Optimized Potential for Liquid Simulations</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PLC γ	Proteín Lipasa C gamma
PLIFS	Del inglés <i>Protein-Ligand Interaction Fingerprints</i>
RMSD	Del inglés <i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	Del inglés <i>Root Mean Square Deviation Fluctuation</i>
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
TIP3P	Del inglés <i>Transferable Intermolecular Potential with 3 Points</i>
TPSA	Del inglés <i>Topological Polar Surface Area</i>

US ORSD Del inglés *United States Office of Research and Science Development*

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

1. INTRODUCCIÓN

La quimioterapia, a lo largo de los años, ha ido evolucionando a pasos entrecortados, entre caídas y carreras ha llegado a la actualidad como una de las opciones más socorridas en el tratamiento de enfermedades bacterianas y, por supuesto, cáncer. En este trabajo se abordará a la quimioterapia aplicada al cáncer. El cáncer se genera debido al crecimiento descontrolado de células al alterarse diversos mecanismos de división y muerte celular por lo que se generan masas anormales, dando lugar a más de 100 tipos de cáncer que se denominan de acuerdo con la zona de desarrollo: cáncer de mama, cáncer de colón, etc.¹. En México, el cáncer de mama es el que presenta las mayores tasas de morbilidad hospitalaria en los últimos años. Ha pasado de 7.43 mujeres por cada 100 mil a 218.24, confirmándose como el tumor maligno de mayor impacto en la salud en mujeres mayores de 20 años ².

La evolución de la quimioterapia y las investigaciones en nuevos tratamientos contra cáncer han llevado a conocer nuevos fenómenos celulares que regulan al mismo. Adicción oncogénica y letalidad sintética son términos que se han intentado utilizar en los nuevos tratamientos, siendo la adicción oncogénica la más socorrida. Esta estrategia depende de moléculas como Erlotinib y Gefitinib los cuales son ejemplos muy importantes en tratamientos antitumorales ya que inhiben a cinasas las cuales son responsables de diversas señales de proliferación celular. Esta estrategia puede verse complementada con el uso de la letalidad sintética al inhibir dos dianas biológicas que sean clave para la sobrevivencia celular. Lo anterior descrito puede ser alcanzado al aprovechar la estructura base de Erlotinib y Gefitinib que es la quinazolina. Este anillo heterocíclico se considera una estructura privilegiada³ por lo que su potencial farmacológico es de llamar la atención; como estructura privilegiada lleva a una ventaja: la polifarmacología. Con la intención de abordar esta combinación de estrategias, el trabajo de tesis se enfoca en el diseño racional de 2 moléculas con potencial acción polifarmacológica en distintas dianas biológicas relacionadas mediante el uso de metodologías computacionales.

2. ANTECEDENTES

2.1. El largo camino de la quimioterapia: Inicios

El uso de la quimioterapia comenzó en los inicios del siglo XX cuando Paul Erlich definió dicho término como “el uso de químicos para el tratamiento de enfermedades”. Erlich utilizaba modelos de conejos para estudiar sífilis y tratamientos con arsénico y por ello fue conocido como el “Padre de la quimioterapia” ¹. Años más adelante, Gilman y Louis Goodman encontraron que las mostazas nitrogenadas podían tener actividad antitumoral contra linfoma murino². En 1943 fue registrado el primer tratamiento para cancer humano con una mostaza nitrogenada a un paciente con linfoma no-Hodgkin ². Después de la Segunda Guerra Mundial, durante las décadas de los 50 y 60, la Actinomicina D fue utilizada en tumores pediátricos como resultado de una investigación de la Oficina Estadounidense de Investigación Científica y Desarrollo (US ORSD , por sus siglas en inglés) ². Así mismo, Farber mostró que el Metotrexato tenía actividad anti folato en leucemia infantil y en 1951 Hitchings y Elion desarrollaron dos fármacos que tendrían importancia: 6-tioguanina y 6-mercaptopurina ^{3,4}. En la mitad de los años 50, Heidelberger sintetizó el 5-fluorouracilo el cual tiene actividad sobre un gran rango de tumores que, hasta la fecha, sigue siendo una pieza fundamental en el tratamiento del cancer colorrectal ⁵. Fue así como un pequeño barco comenzó a surcar el mar y encontrarse con destinos inesperados.

2.2. Cura, evolución y terapias dirigidas

El concepto de la combinación quimioterapéutica llegó durante los años 60 debido al éxito que se generó en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda infantil (LLAI) mediante el uso de Vincristina, Metotrexato, 6-Mercaptopurina y Prednisona los cuales incrementaron el porcentaje de remisión de un 25% a un 60% por lo que se le consideró la primer “cura” ². El linfoma no-Hodgkin fue tratado con Melfalan, Metrotexato, Vincristina y Prednisona; estos protocolos modificaron el porcentaje de remisión de 0% hasta 80% ². En los años 70, la evolución de la práctica de la quimioterapia para cáncer aumentó su aceptación como una herramienta legítima para el tratamiento del cáncer. Nuevos antimicrobianos se encontraban disponibles, avances en el tratamiento con cirugía,

radiación e inmunoterapia contribuían a la vida de los pacientes con cáncer y en 1975 se reportó la cura para linfoma de células B la cual fue Ciclofosfamida².

La medicina en cáncer y la quimioterapia se aceleró durante los años 80 y 90 y durante esta década se presentaron triunfos y catástrofes. En 1984, el Instituto Nacional de Cancer (NCI, por sus siglas en inglés), comenzó a realizar investigaciones en biología molecular. Las vías de señalización que regulan la actividad normal de las células tales como proliferación y supervivencia fueron por primera vez caracterizadas. Los descubrimientos generados permitieron abrir un nuevo acercamiento a la quimioterapia pues parecía que habían encontrado el mapa del tesoro, aunque se trataba de un tesoro por partes.

2.3. Dianas emergentes: Cinasas

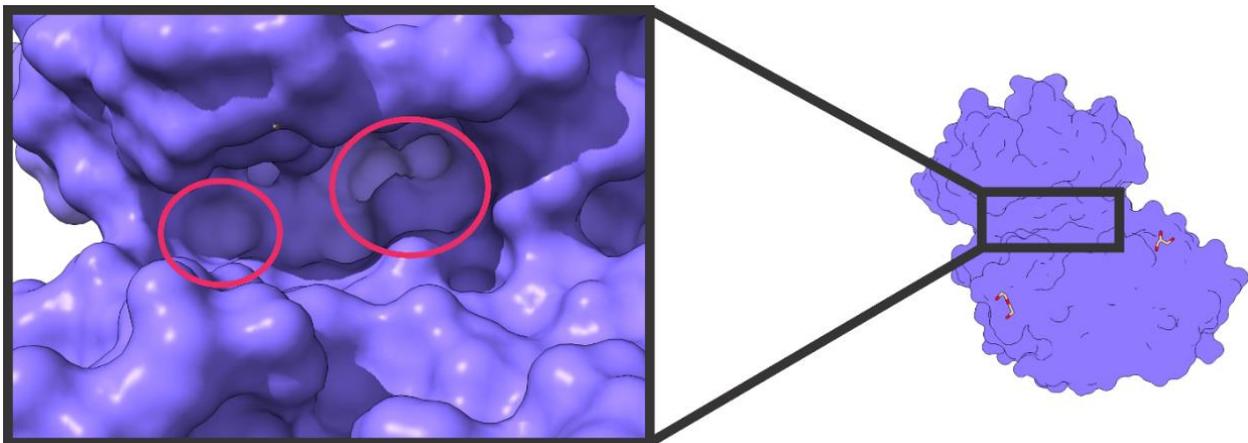


Figura 1. Sitio catalítico de cinasa ERK2 (PDB:4GT3). El acercamiento revela dos lóbulos distinguibles en el sitio de unión del ATP los cuales se resaltan en círculos rojos. Imagen generada en ChimeraX⁶

La investigación derivó al descubrimiento de proteínas conocidas como cinasas. La función de las cinasas es la transferencia de γ -fosfatos del adenosín trifosfato (ATP) a un sustrato (fosforilar) lo cual regula diversas señales celulares que incluyen a la proliferación, supervivencia, apoptosis, metabolismo, transcripción, entre muchas otras. Hasta 2015 se han caracterizado 518 cinasas humanas divididas en 10 grupos y al menos 900 genes que codifican para proteínas con actividad tipo cinasa⁷. De manera

muy conservada, las cinasas comparten un arreglo secundario que se encuentra repartido en 12 subdominios plegados alrededor de una estructura catalítica bilobulada que se caracteriza por ser profunda (**Figura 1**). Todas las cinasas tienen un asa de activación el cual es importante para la regulación de su actividad. Muchos de los inhibidores tipo cinasa descubiertos hasta la fecha han resultado ser competitivos y presentan de uno a tres puentes de hidrógeno en una zona denominada “bisagra” en donde normalmente el anillo de adenina del ATP se encuentra (**Figura 2**)^{8,9}.

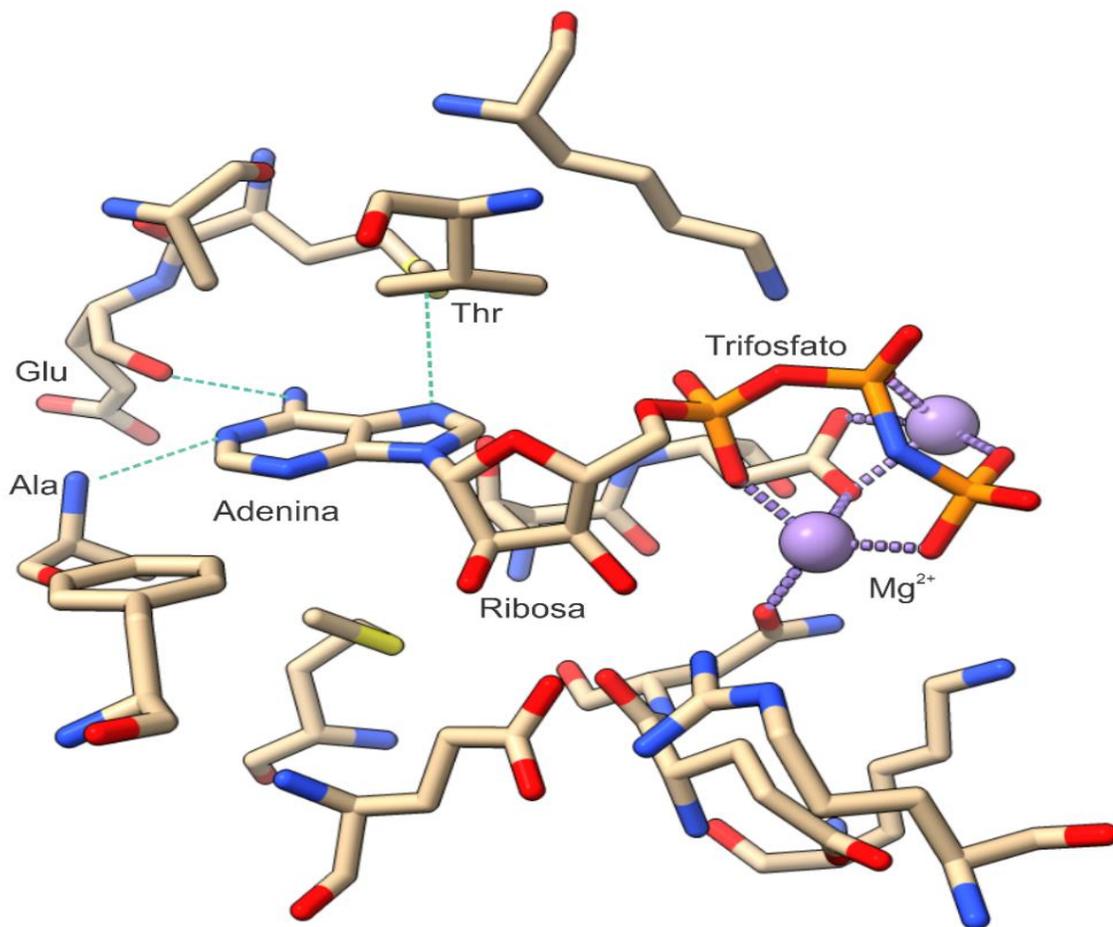


Figura 2. Modo de unión de AMP-ANP (PDB:1O6L). Se muestran las interacciones generadas en la bisagra de la adenina y las interacciones generadas con el trifosfato y magnesio generadas por un ATP mimético.

2.4. Rol de cinasas en cáncer

Desde que Mike Sporn y Anita Roberts elaboraron la teoría de la secreción autócrina, diversos estudios reconocieron que los factores de crecimiento tiene una correlación importante con los protooncogenes. De hecho, muchos protooncogenes son factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento o alguna proteína involucrada en estas señalizaciones. Dentro de las familias de factores, el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés) y la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) tienen un papel central en la patogénesis y progresión de diferentes tipos de carcinomas.¹⁰

En esta familia se encuentra el EGFR, HER2, ErbB3 y ErBB4 las cuales son protein cinasas. La sobreexpresión de EGFR en el cáncer de mama está asociada a tumores grandes, diferenciación pobre y pocas esperanzas clínicas. Si bien, la sobreexpresión de EGFR se observa en muchos subtipos de cáncer de mama, éste se encuentra más frecuentemente sobre expresado en los cáncer de mama triple negativo (MTN) y en cáncer de mama inflamatorio (CMI)¹¹. La vía de señalización más importante que es activada por EGFR son las que involucran a la inositol 3-fosfatocinasa (IP3K por sus siglas en inglés), Ras-Raf-MAPK, JNK y fosfolipasa C gamma (PLCγ por sus siglas en inglés) (**Figura 3**). Los ligandos naturales no solo inducen proliferación celular, sino también adhesión, movilidad, protección contra apoptosis y a nivel fisiológico se promueve angiogénesis^{12,13}. En el caso MTN, se ha mostrado que si se usa al EGFR como diana terapéutica la sensibilidad a agentes citotóxicos aumenta como es el uso de la combinación erlotinib-doxorubicina.

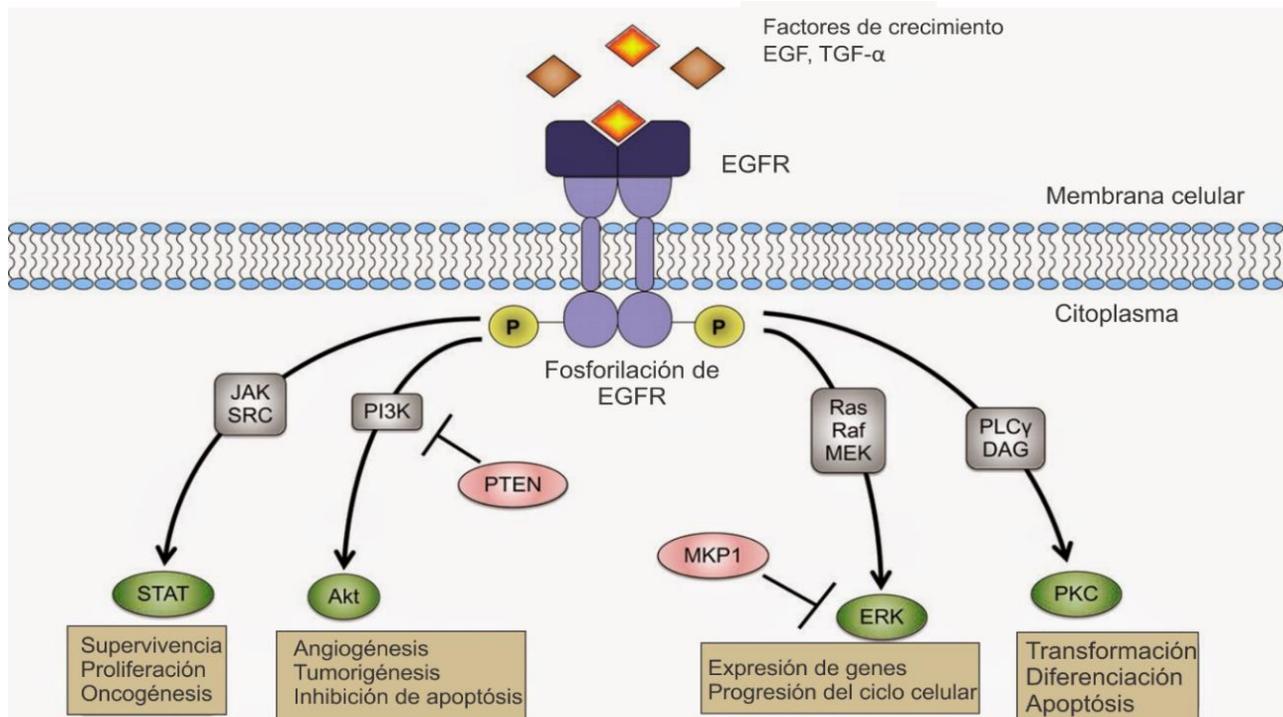


Figura 3. Vía principal de señalización de EGFR. De manera natural los factores de crecimiento estimulan a EGFR; si se encuentra sobre expresado pueden darse funciones anormales. EGF: Factor de crecimiento; DAG: Diacilglicerol; ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares; PI3K fosfoinositol 3-cinasa; PLC γ : Fosfolipasa C gamma; PKC: Proteín-cinasa C; PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; STAT: Proteína transductora y activadora de señales de transcripción; SRC: Proto-oncogen c-SRC; TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa. Traducido al español de: <http://www.mindsofmalady.com/2014/12/cell-signal-mechanism-to-provide-new.html>

Debido a la gran importancia que presentaron las cinasas como dianas moleculares y su papel en el cáncer se han desarrollado distintos tipos de inhibidores: covalentes, alostéricos, e inhibidores tipo I y tipo II, siendo los dos últimos los más comunes. Los inhibidores tipo I reconocen la conformación activa de la cinasa, la cual es la que realiza la transferencia del fosfato. Este tipo de inhibidores consisten en un anillo heterocíclico que ocupa el sitio de la purina y sirve como núcleo base para generar cadenas hidrofóbicas que se localicen en las zonas (bolsas) hidrofóbicas I o II, además de mimetizar el puente de hidrógeno que genera la adenina con un aminoácido que suelen ser metioninas o alaninas. **(Figura 4).**

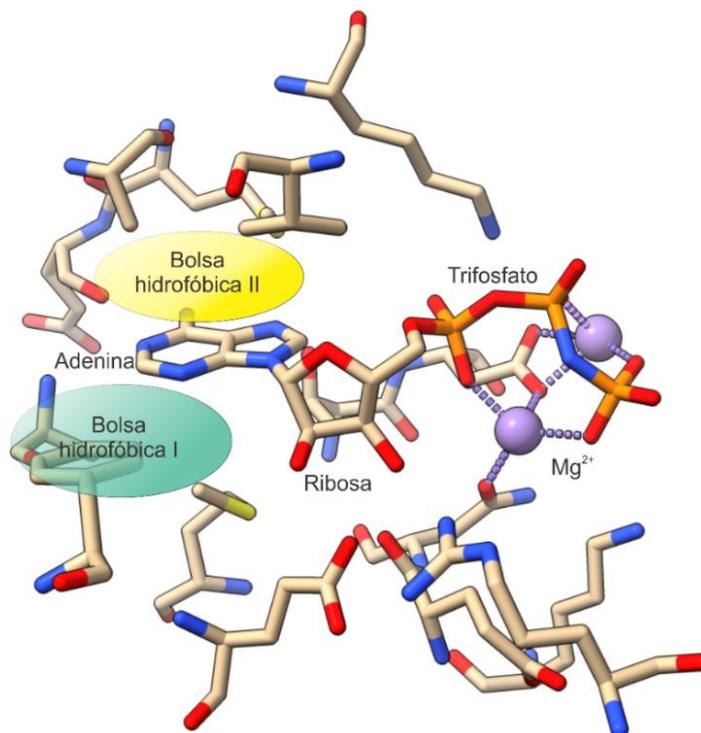


Figura 4. Zonas hidrofóbicas I y II en el sitio de unión de ATP de las cinasas. La bolsa hidrofóbica I se localiza debajo del anillo de adenina mientras que la bolsa hidrofóbica II se muestra en la parte superior.

Muchos de los inhibidores de tipo I han sido descubiertos mediante cribados de alta eficiencia (conocidos como *High throughput screening*, *HTS* por sus siglas en inglés). La síntesis de análogos y reemplazos isostéricos son las técnicas más utilizadas para encontrar un núcleo base líder, no sin antes realizar estudios de ligandos co-cristalizados con sus respectivas proteínas para poder estudiar los modos de unión. También se han utilizado metodologías como el diseño basado en fragmentos e inclusive generar híbridos de inhibidores tipo I y II.

Para los años 90, la era de la terapia dirigida había llegado. En 1996 el primer inhibidor de tirosin cinasas, Imatinib, llegó al mercado¹⁴. Imatinib es un fármaco diseñado para bloquear el sitio de unión del adenosín trifosfato (ATP) en Bcr-Abl de forma que se bloquea la función de esta cinasa aberrante. El control de la leucemia crónica mielogénica (LCM) había mejorado pues la ventaja de este fármaco sobre este cáncer es que, a diferencia de muchos otros, únicamente tiene una sola anomalía molecular.

A partir de estas anomalías puntuales se comenzaron a desarrollar investigaciones en las cuales se hacía notar que muchas las proteínas cinasas presentaban funciones anormales por lo que se dio aún más la confianza al desarrollo de inhibidores de cinasas². De igual forma, en 1990, los anticuerpos monoclonales (AM) fueron introducidos como combinación en las quimioterapias que aumentaban la eficacia de los tratamientos gracias a su especificidad¹⁵.

Sin embargo, no se contaba con que en la LCM generara resistencia de manera muy rápida por lo que llevó a pensar a la comunidad científica en las mutaciones intrínsecas del cáncer existían incluso antes de los tratamientos¹⁶. La FDA aprobó una nueva generación de moléculas pequeñas que inhibían al EGFR. Uno de ellos, Gefitinib, utilizado en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCP) falló como agente quimioterapéutico en tratamientos al azar^{17,18}. Además de la gran importancia que representa el EGFR, otras cinasas juegan roles importantes, como MAP2K4, si pierde su función, disminuye la señalización en la vía pro-apoptótica JNK por lo que se promueve la generación de tumores. Además, mutaciones en la familia PKC de igual forma pueden suprimir la señalización en la vía JNK como sucede en el cáncer de tiroides¹⁹. Muchas cinasas han sido estudiadas en los últimos años (**Tabla 1**) siguiendo sus mecanismos mediante mutaciones o translocaciones y eventualmente han sido consideradas oncogénicas^{20,21}.

Tabla 1. Cinasas reconocidas en algunos tipos de cáncer

Cinasa	Cáncer
PDGFR	Síndrome hipereosinofílico, mastocitosis sistémica
EGFR	Esofágico, glioma, mama
Raf	Células renales
ErB2	Mama, pulmón
ABL	Leucemia crónica mielóide
JAK2 (9p24)	Mielofibrosis idiopática
c-KIT	Leucemia aguda mieloide

2.5. Tierras desconocidas: Letalidad sintética

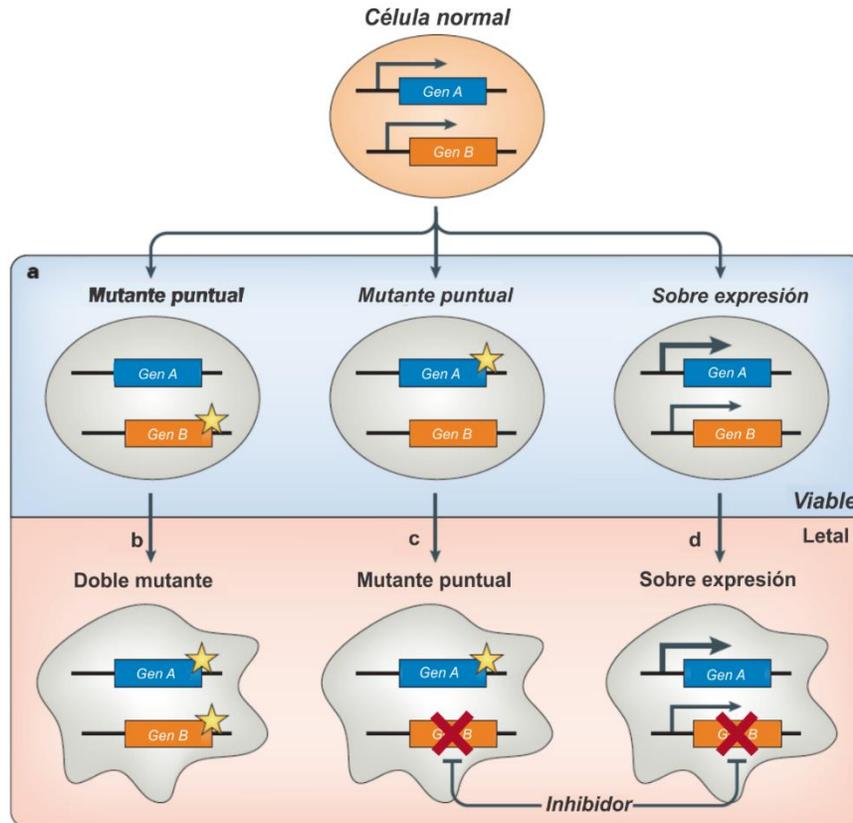


Figura 5. Concepto de letalidad sintética. La pérdida o inhibición de alguno de los productos de los genes A o B o la sobre expresión del gen A es viable (a). La mutación (b) o inhibición farmacológica (c) del producto del gen B en células con una mutación (b, c) o sobre expresión (d) del gen A resulta en letalidad sintética. Las flechas más gruesas indican aumento de la expresión. La estrella denota una mutación. Las cruces rojas denotan inhibición farmacológica. Las células viables se muestran con forma ovalada y las no viables se muestran amorfas. Imagen traducida al español de *Synthetic lethality and cancer. Nature Reviews Genetics* (2017). doi:10.1038/nrg.2017.47

En la actualidad, muchos de los tratamientos que se basan en los genotipos aprovechan el fenómeno de adicción oncogénica ²² en donde se inhibe alguna diana molecular clave para la supervivencia de la célula, este tipo de tratamientos generan resistencias y a largo plazo suelen ser poco efectivos. Hace 20 años, mientras se investigaban nuevas dianas biológicas y utilizaban ensayos de micro arreglos, ocurrió un fenómeno peculiar. Se observó que, entre dos genes (dígase gen “A” y “B”), una mutación en alguno de ellos permitía que la célula fuera viable, sin embargo, al mutarse ambos genes se causaba muerte; a este fenómeno se le denominó letalidad sintética (**Figura 5**).

La letalidad sintética se ha descrito de mejor manera como la pérdida o ganancia de función de alelos distintos. Por ejemplo, el gen B puede ser esencial para la supervivencia cuando un gen A particular se encuentra sobre expresado.

La pérdida de función de alelos que tienen una relación sintético-letal puede ser racionalizada si se basa en las funciones que realizan cada uno de sus productos (e.g. proteínas). Es decir, puede tratarse de dos subunidades distintas que forman parte de un complejo protéico, dos componentes esenciales en una vía de señalización lineal o vías de señalización paralelas que son esenciales para la supervivencia ²³. Se ha sugerido que el concepto de letalidad sintética puede ser utilizado al momento de escoger fármacos antitumorales^{24,25}. Los productos de genes que se sabe son letales sintéticos, si éstos permiten la posibilidad de ser atacados farmacológicamente, teóricamente representarían excelentes dianas para realizar quimioterapia. Es posible discutir si ciertos fármacos que se usan en la actualidad, al menos a primera vista, explotan la letalidad sintética. Por ejemplo, la relación sintético-letal entre genes de replicación de DNA y genes de reparación de DNA es un modelo muy documentado. Es decir, la eficacia de muchos fármacos que interfieren con la síntesis de DNA puede deberse, al menos en algunos casos, a la presencia de mutaciones que afectan la reparación o respuesta al daño de DNA.

Tabla 2. Pares sintéticos conocidos en cáncer

Cáncer	Par sintético	
	Diana 1	Diana 2
Mama triple negativo	EGFR	PARP/c-MET
Mama Basal	EGFR	Notch1/AKT2
Pulmón de células no pequeñas	EGFR	KRAS

Gracias a los micro arreglos, se han detectado muchas relaciones sintético-letales. Un ejemplo claro en diversos tipos de cancer es el EGFR. De acuerdo con la *SynLethDB* ²⁶ se han encontrado más de 30 dianas biológicas que pueden ser consideradas como pares letales (**Figura 6**). Sin embargo, solo algunas han sido identificadas en diversos tipos de cáncer.

Además, PARP1, se encarga de sintetizar un polímero de adenosín difosfato (PolyADP) el cual posteriormente sirve como señal para reclutar a otras enzimas que continúan la reparación. Por ello EGFR y PARP1 se han logrado identificar como pares sintético-letales en distintos tipos de cáncer de mama, pulmón y ovario pues al inhibir sus funciones es posible detener el crecimiento celular y eventualmente revertir la inhibición de la apoptosis ³⁰.

Otro par muy interesante es el EGFR-AKT. AKT, también conocida como PKB es una familia de serín/treonín cinasas que presentan tres isoformas: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) y AKT3 (PKB γ). Forma parte de la vía PI3K-mTOR/AKT y se encarga de regular procesos de supervivencia celular, puede regular invasión y metástasis ³¹.

La isoforma AKT2 es muy importante en cáncer de tiroides, pulmón, mama, ovario, glioma, colorrectal y próstata ^{32,33}. Cuando EGFR se encuentra fosforilada, AKT es activada generando los procesos ya mencionados. Los iEGFR de manera presuntiva disminuyen la fosforilación de AKT, sin embargo, esta cinasa también es activada por otras macromoléculas como PI3K y NOTCH1 amortiguando la inhibición de EGFR ³⁴⁻³⁶. Es evidente que la inhibición dual de EGFR y AKT los convierte en un potencial par sintético-letal el cual ha sido confirmado ya en diversos estudios ^{28,37,38}.

2.6. Otra tormenta a lo lejos: Polifarmacología

El diseño contra una sola diana biológica ha sido una de las rutas más abordadas desde que el concepto de receptor se introdujo a la medicina. Desde luego, un fármaco puede presentar múltiples interacciones con dianas terapéuticas que están asociadas con efectos adversos. Así, uno de los principales retos del diseño de fármacos actual es la identificación de “llaves maestras”: fármacos que interaccionen con dianas biológicas deseadas pero que no interaccionen con blancos moleculares asociados con efectos adversos (*Off-targets*)³⁹. Un ejemplo muy claro de este fenómeno son los iEGFR Erlotinib, Gefitinib y otros inhibidores como Lapatinib e Imatinib que, se sabe, tienen efectos adversos importantes a largo plazo debido al dominio catalítico conservado entre cinasas ⁴⁰.

Pareciera que el nombre que se le adjudicó a los fármacos en los inicios, “la bala mágica”, no resulta funcional en sistemas más complejos por lo que la idea de generar moléculas únicas que puedan actuar en diferentes dianas biológicas no es tan descabellada y ha sido el origen del uso de la Polifarmacología⁴¹ como una herramienta a favor .

Si se utiliza la palabra “Polifarmacología” en el buscador Google académico, se generan 7322 resultados hasta el 30 de Octubre del 2018 mientras que hace 2 años se generaban únicamente 3840⁴². En el 2014 Knapp y colaboradores reportaron diversos compuestos que mostraban acción dual en cinasas y bromodominios⁴³. En el mismo año, el profesor Bajorath discutió sobre los pros y contras de los fármacos multidianas y las terapias combinatorias. Todo lo anterior indica el aumento en el interés e investigaciones sobre esta área. Hoy en día, los acercamientos que propone la polifarmacología para el desarrollo de nuevos fármacos son: 1) que un fármaco actúe sobre múltiples dianas de una sola enfermedad, o 2) que un solo fármaco actúe sobre múltiples dianas pertenecientes a múltiples enfermedades⁴⁴. Sin embargo, gracias a la introducción del concepto de letalidad sintética resulta factible generar moléculas que actúen sobre los pares sintéticos-letales para así aprovechar la polivalencia de un fármaco.

2.7. La nueva tormenta ¿amiga?: Las quinazolininas

En 1988 Evans en su equipo de Merck encontraron un compuesto terapéutico derivado de asperlicina y reconocieron que esa estructura tenía afinidad a receptores de benzodiazepinas, opioides, α -adrenérgicos, serotonina, muscarínicos y angiotensina I. Para llamar de alguna forma a esta estructura Evans tuvo que llamarla “Privilegiada”⁴⁵. Algunos iEGFR como erlotinib, gefitinib, dacomitinib y afatinib tienen un núcleo base de quinazolina (**Figura 7**) el cual es una estructura privilegiada pues puede tener actividades antifúngicas, antibacterianas, antimaláricas, antivirales, antituberculosas, inhibidoras de la timidilato sintasa y por supuesto de las tirosin cinasas⁴⁶⁻⁵⁰. Lo anterior muestra entonces que la polifarmacología existe en las quinazolininas y explica los diversos efectos adversos que, eventualmente pueden ser utilizados a favor del diseño de fármacos.

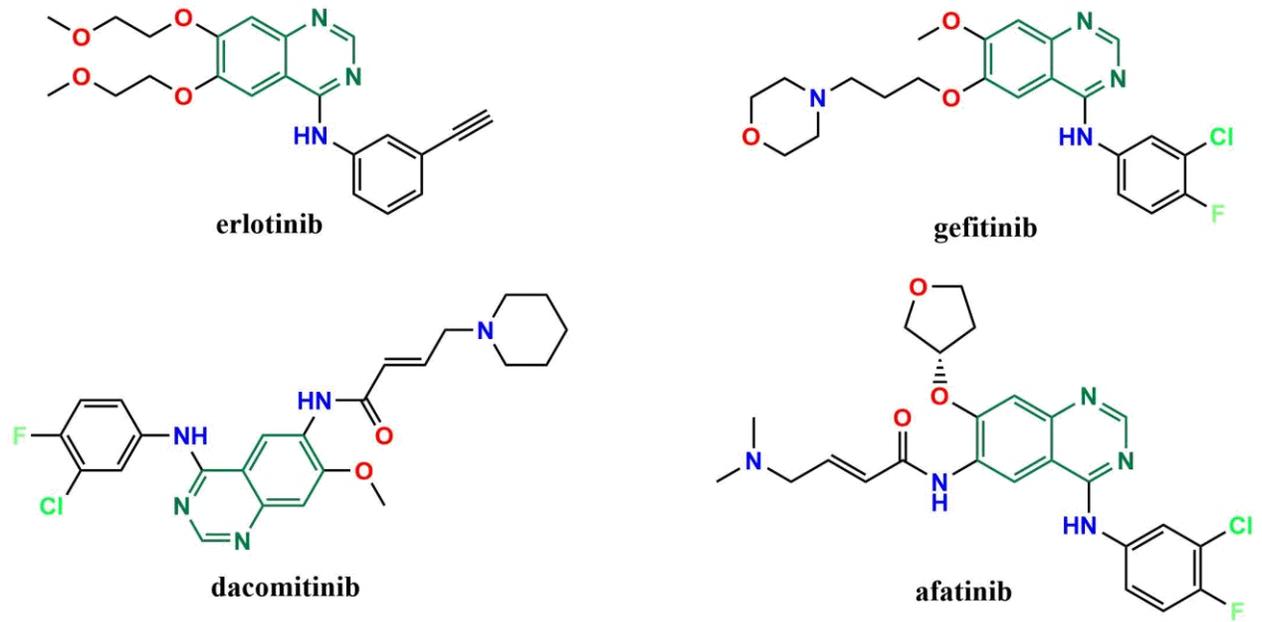


Figura 7. Inhibidores de EGFR que presentan el núcleo de quinazolina en su estructura.

La quinazolina se resalta en color verde oscuro

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mamá es una enfermedad de presencia importante en México. La quimioterapia antitumoral se ha desarrollado en los últimos años con moléculas pequeñas y biotecnológicas. De manera puntual, las moléculas pequeñas han tenido una historia escabrosa con destellos luminosos que, a largo plazo, se ven opacadas. Estos momentos opacos resultan ser la resistencia y la polifarmacología que presentan las moléculas y, en específico, los iEGFR. Se conocen diversos mecanismos de resistencia entre los cuales se encuentran las mutaciones del receptor y la activación constitutiva de otras vías que favorecen la proliferación celular como lo es la vía Notch/AKT/mTOR ⁵¹.

Estos problemas pueden ser sorteados de manera inicial utilizando nuevos fármacos que combatan la resistencia, sin embargo, a largo plazo, el bombardeo de los pacientes con más fármacos puede potenciar los efectos adversos y disminuir el cumplimiento del régimen de dosificación.

Si bien, existen estrategias notables como la adicción oncogénica y letalidad sintética, éstas no han sido utilizadas de manera amplia y mucho menos conjuntadas con la posibilidad de usar la polifarmacología a favor de la quimioterapia. Así pues, es necesario dar vuelta a estos problemas y encontrar nuevas soluciones por lo que la pregunta aquí es: ¿Será posible fusionar la adicción oncogénica, letalidad sintética y polifarmacología en una sola molécula y disminuir la administración de múltiples fármacos a fin de encontrar nuevos tratamientos antitumorales y nuevas estrategias terapéuticas?

4. HIPÓTESIS

Mediante el diseño asistido por computadora se podrán diseñar derivados de quinazolina como posibles inhibidores duales de las vías EGFR-Notch/AKT/mTOR y EGFR-PARP1 que funcionen como moléculas quimeras, fusionadas o híbridas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos generales

Diseñar dos nuevos derivados de quinazolina mediante métodos computacionales como posibles inhibidores duales de las vías EGFR-Notch/AKT/mTOR y EGFR-PARP1.

5.2. Objetivos particulares

- Obtener dos derivados de quinazolina que se unan con afinidad similar *in silico* a dos distintas dianas biológicas.
- Obtener *Hits* computacionales mediante distintas metodologías.
- Optimizar los *Hits* computacionales mediante acoplamiento molecular.
- Obtener moléculas candidatas a fármacos provenientes de la optimización computacional.
- Validar el modo de unión de los candidatos a fármacos obtenidos.
- Realizar dinámicas moleculares de los candidatos para evaluar la estabilidad de los complejos proteína-ligando.
- Predecir las propiedades fisicoquímicas consideradas *drug-like* y determinar si las moléculas diseñadas pueden considerarse candidatos a convertirse en fármacos.

6. METODOLOGÍA

Para el diseño de las moléculas, se utilizaron diversas técnicas computacionales cuyo fundamento se encuentra descrito en el **apéndice I**. Esta sección se divide en 6 distintos puntos:

- Protocolo general de acoplamiento molecular.
- Protocolo general para validación del acoplamiento molecular y el modo de unión de moléculas diseñadas.
- Protocolo general de dinámica molecular.
- Protocolo general de predicción de propiedades fisicoquímicas.
- Diseño de inhibidor EGFR-AKT2.
- Diseño de inhibidor EGFR-PARP1.

6.1. Acoplamiento molecular

Los acoplamientos moleculares para el diseño de los inhibidores se realizaron en *Glide XP*⁵²; para cribado virtual se utilizó el modo *HTVS*. La dianas moleculares se descargaron del *Protein Data Bank*⁵³ (PDB), se prepararon con *Protein Preparation Wizard*⁵⁴, se minimizó la energía bajo el campo de fuerza *OPLS3*⁵⁵ y se generaron los estados de protonación a pH 7.4 (± 0.1). Los parámetros considerados para la elección del PDB fueron: organismo, resolución, *R-Free* y *R-Work*.

Con la dianas moleculares preparadas, se procedió a generar la rejilla mediante la herramienta *Receptor Grid Generation*⁵⁴ utilizando las coordenadas centrales del ligando co-cristalizado, las cajas generadas tuvieron dimensiones de 20x20x20 Å para cada una de las proteínas.

La preparación de los ligandos se realizó mediante la interfaz gráfica de *Maestro*⁵⁴, se utilizó la herramienta *Ligprep*⁵⁶ en donde se minimizó la energía de las estructuras utilizando el campo de fuerza *OPLS3* y se generaron los estados de protonación a pH 7.4 (± 0.1) correspondientes.

6.2. Validación del acoplamiento molecular y modo de unión de moléculas las moléculas diseñadas

La validación se llevó a cabo realizando el acoplamiento del ligando co-cristalizado y se calculó la desviación estándar cuadrada media (RMSD por sus siglas en inglés) de dicho acoplamiento con respecto al ligando co-cristalizado para AKT2. El procedimiento de cribado virtual se consideró válido si dicho valor de RMSD era menor a 2.0 Å ^{58,59}.

Además, para evaluar los acoplamientos moleculares de las moléculas obtenidas se realizó un con consenso de poses con distintos programas. Se utilizó el servidor *SwissDock* ⁶⁰, *Autodock Vina* ⁶¹ y *LeDock* ⁶². Los ligandos se guardaron en los respectivos formatos requeridos por los programas. Para *LeDock*, se utilizó la función *LePro* para preparar la proteína. En *Autodock Vina* se utilizaron los parámetros que establece inicialmente el programa. Las poses con mejor puntaje se alinearon y se calculó el RMSD con el acoplamiento en *Glide XP* como referencia.

6.3. Dinámica molecular

Las dinámicas moleculares se llevaron a cabo utilizando *Desmond* ⁶³. Se utilizaron los complejos generados en *Glide XP* y se cargaron en la herramienta *System Builder* que ofrece *Maestro*; se asignó una caja periódica con geometría ortorrómbica 1 nm de distancia de la estructura, se solató con el modelo de agua *transferable intermolecular potential with 3 points* (TIP3P) y el campo de fuerza *OPLS3*. Los sistemas fueron neutralizados y se adicionó NaCl 0.15 M.

Las dinámicas moleculares se establecieron en 3 ns previas a una minimización de energía mediante un protocolo NPT. Las trayectorias fueron analizadas mediante la herramienta *Simulation Interaction Diagram*, los datos de RMSD y fluctuación de la desviación estándar cuadrada media (RMSF, por sus siglas en inglés) se extrajeron para ser graficados en *Tableau 2018.2* ⁶⁴. Mediante la herramienta *Simulation Event Analysis* del paquete de *Desmond* se calcularon distintas energías de interacción. Las trayectorias fueron visualizadas en la interfaz gráfica de *Maestro* y se exportaron como videos para una posterior edición en *Adobe Premiere Pro CC 2018* ⁶⁵ y posteriormente se subieron a la plataforma de videos *YouTube* ⁶⁶.

6.4. Predicción de propiedades fisicoquímicas

Distintas propiedades fisicoquímicas se monitorearon durante el diseño de las moléculas con el fin de cumplir los criterios establecidos por *Lipinski y Veber*⁶⁷ que se relacionan con las propiedades *drug-like*. Se utilizó *OSIRIS Datawarrior* 4.7.2⁶⁸ para dicho monitoreo.

Se construyeron distintos espacios químicos: fármacos orales, inhibidores de cinasas e inhibidores de PARP1. Dichos fármacos fueron descargados de la base de datos *DrugBank 5.0*⁶⁹ y o bien de *ChEMBL*⁷⁰. La construcción de los espacios químicos se realizó mediante el análisis de componentes principales utilizando las propiedades *Lipinski y Veber* y *OSIRIS Datawarrior*.

6.5. Diseño de moléculas

6.5.1. Inhibidor EGFR-PARP1 (serie CUMO)

El diseño se basó en el ligando natural de PARP1 y posteriores modificaciones considerando una quinazolina.

6.5.1.1. Búsqueda de candidato a fármaco

A partir del *Hit* encontrado se comenzaron a construir y optimizar las moléculas utilizando estrategias típicas de Química Farmacéutica tales como reemplazos bioisostéricos, homologación de cadena, adición y eliminación de sustituyentes.

6.5.2. Inhibidor EGFR-AKT2 (serie AUMO)

El diseño de la serie AUMO se realizó mediante un cribado virtual y optimización de la estructura mediante acoplamiento molecular.

6.5.2.1. Cribado virtual sobre AKT2

Se descargó de la base de datos ChEMBL 21⁷⁰ una lista de moléculas con concentración inhibitoria 50 (CI50) sobre AKT2. Se realizó el respectivo curado de la base de datos en *MOE 2015.1*⁷¹ eliminando sales, compuestos repetidos y se conservaron aquellos que cumplieran con las reglas *drug-like*.

Las base de datos se cargó en la interfaz gráfica de *Maestro*⁵⁴, se prepararon las estructuras mediante la metodología previamente descrita y se realizó el cribado virtual sobre AKT2.

6.5.2.2. Determinación de interacciones clave

Del resultado del cribado virtual, se procedió a determinar las interacciones clave mediante los *Protein-Ligand Interaction Fingerprints* (PLIFS)⁷²⁻⁷⁵ utilizando la herramienta que ofrece *MOE 2015.1*. Los ligandos y proteínas se guardaron en formato .sdf y .pdb respectivamente; los PLIFS se visualizaron de dos distintas maneras: histograma y por molécula.

6.5.2.3. Elección de molécula *Hit*

En el caso de AKT2 se volvió a realizar un cribado virtual con *GlideXP* y eligió una molécula proveniente del cribado virtual de *ChEMBL* que presentará un puntaje de acoplamiento alto y que cumpliera con al menos tres de las interacciones clave más importantes, a esta molécula se le llamó **AUMO-1**.

6.5.2.4. Búsqueda de candidato a fármaco

Mediante el uso de PLIFS de **AUMO-1** se determinaron las interacciones que no podían modificarse por considerarse clave. Por parte de la quinazolina, se utilizaron quinazolininas 4-anilino sustituidas, con opción a modificar la posición 6. Posteriormente se realizaron el mismo tipo de modificaciones que se realizaron en la serie CUMO.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Diseño EGFR-PARP1 (serie CUMO)

7.1.1. Búsqueda de candidato a fármaco

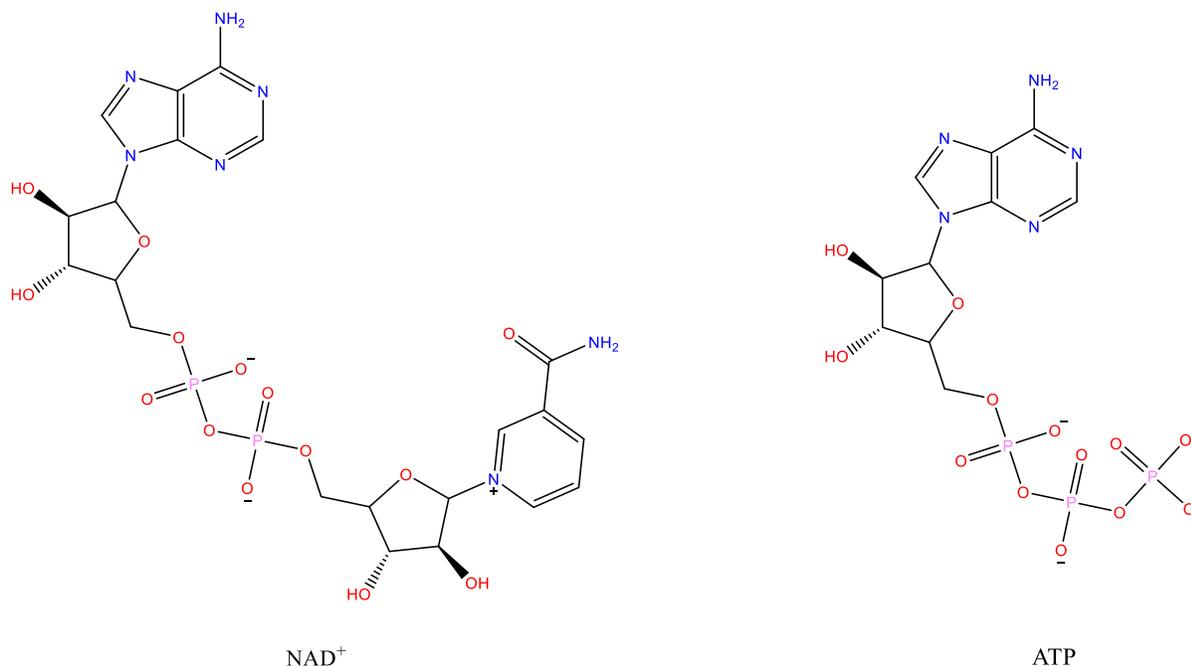


Figura 8. Estructuras de ATP y NAD⁺. El ADP se encuentra presente en ambas estructuras.

Para el diseño de esta molécula se consideraron los ligandos naturales de las dianas biológicas, para EGFR se consideró el ATP y para PARP1 el nicotín adenín dinucleótido en su forma oxidada (NAD⁺). Como se muestra en la **Figura 8**, ambos ligandos comparten la estructura tipo ADP. Por parte de la adenina del ATP se consideró a la quinazolina como análogo estructural. El mecanismo enzimático de PARP1 implica interacciones de puentes de hidrógeno por parte de la amida de la nicotinamida de NAD⁺ (NAm) y Ser904 y Gly 863 de tal forma que el NAD⁺ es anclado para posteriormente ser atacado en el carbono anomérico de la ribosa unida a la NAm por parte de un hidroxilo de PARP o el hidroxilo 3' del ADP si la polimerización ya está iniciada (**Figura 9**)⁷⁶.

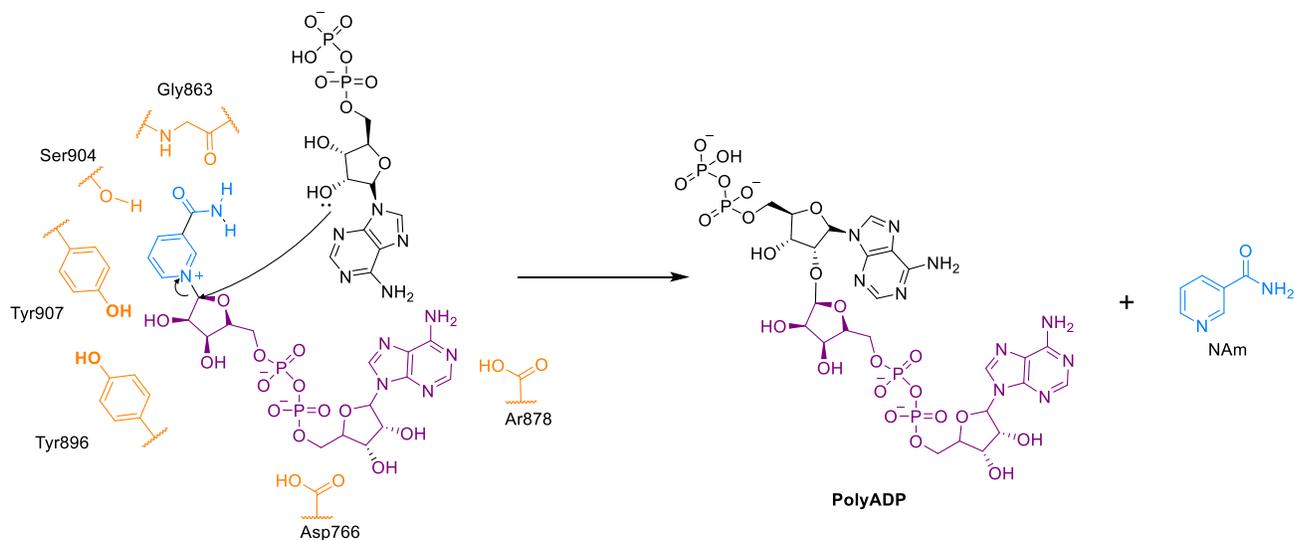


Figura 9. Mecanismo de acción de PARP1. El NAM se ancla mediante puentes de hidrógeno con Ser904 y Gly863. La proteína o un residuo de ADP ya previamente ataca al carbono anomérico unido a la NAM.

Lo anterior permitió, *a priori*, proponer un diseño tipo quimera es decir, que dos núcleos farmacofóricos fueran distinguibles y se unieran de manera independiente a las dianas moleculares ^{42,44}. De esta manera fue necesario proponer un análogo estructural que permitiese interactuar con la Ser904 y Gly863 y a su vez aprovechara los núcleos de iEGFR los cuales son miméticos de ATP. Se comenzó considerando la benzamida y, a partir de ella, se construyeron distintas moléculas análogas las cuales fueron evaluadas mediante acoplamiento molecular. Todos los derivados mostraron las interacciones clave con los aminoácidos, sin embargo, uno de ellos presentó interacciones de tipo apilamiento π - π desplazado lo que generó una mayor estabilización de la estructura (**Figura 10**) pues se trataba de una isoquinolinona (**CUMO-5**).

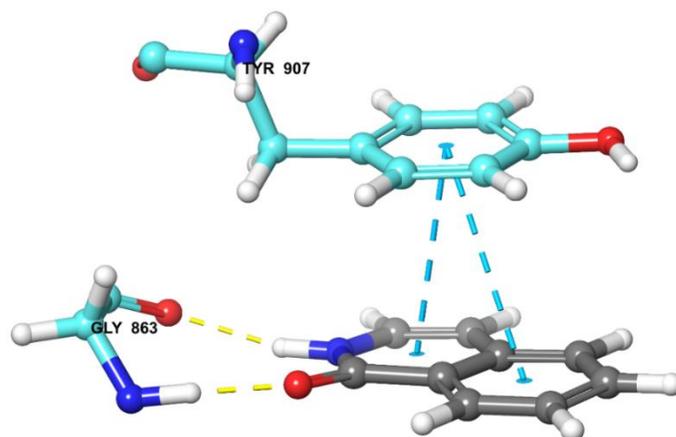


Figura 10. Modo de unión de CUMO-5. Se generan interacciones con Gly863 que son estabilizadas mediante apilamiento π - π desplazado con Tyr907

El modo de unión de **CUMO-5 (Figura 11e)** permitió proponer la construcción y unión de la quinazolina eligiéndose la posición 4 de la isoquinolinona como punto conector. Una propuesta sencilla fue colocar una 6-aminoquinazolina unida directamente en la posición 4 de **CUMO-5** lo que no modificó el modo de unión en PARP1, sin embargo, en EGFR la molécula no se unió de manera adecuada y se colocó en la bolsa hidrofóbica II por lo que se continuó la construcción (**CUMO-6, Figura 11f**).

Se colocó una amina primaria en la posición 4 de la quinazolina pensando en emular a la adenina, sin embargo, el modo de unión de esta nueva molécula (**CUMO-7, Figura 11g**) no generó resultados distintos en EGFR por lo que se decidió sustituir dicha amina por una anilina (**CUMO-8, Figura 11h**).

Esta nueva molécula mejoró el modo de unión para EGFR pues se generó la interacción con Met769 la cual es importante en el reconocimiento de ATP ¹⁰ y en PARP1 se mantuvieron las interacciones requeridas, sin embargo, el puntaje no fue favorable. Se decidió elongar el conector a dos nitrógenos, es decir, colocar una hidrazina como cadena conectora, sin embargo, ambos nitrógenos intervinieron con las interacciones clave en PARP1 (**CUMO-9, Figura 11i**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

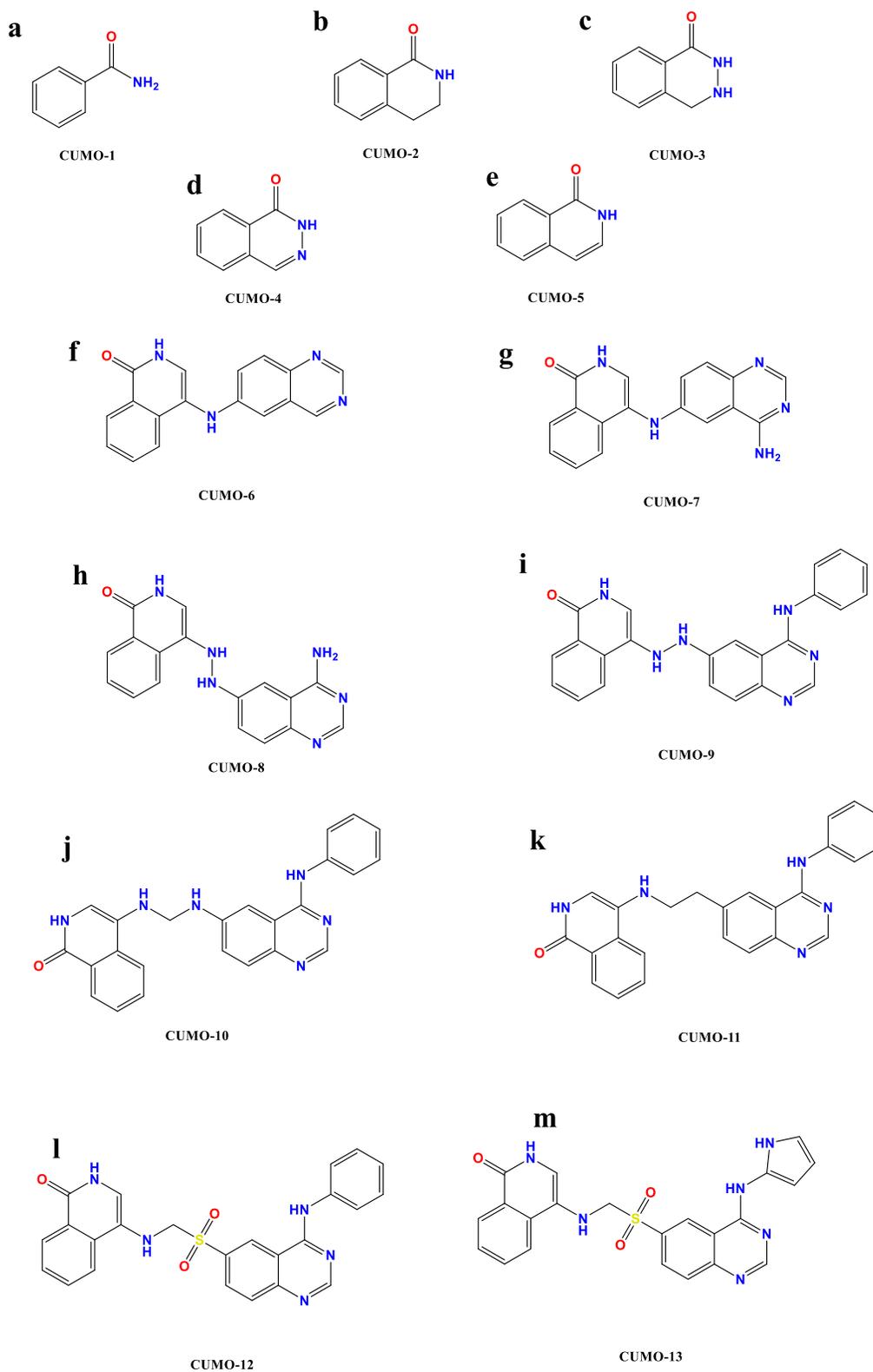


Figura 11. Evolución de la serie CUMO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colocó un carbono intermedio entre ambos nitrógenos conectores (**CUMO-10, Figura 11j**) pero el nitrógeno unido a la quinazolina y la quinazolina misma se colocó en el sitio de unión de NAm. Se intercambió el nitrógeno unido a la quinazolina por un carbono (**CUMO-11, Figura 11k**) y el modo de unión generado fue totalmente distinto a lo esperado lo cual se debió a la geometría que presentó dicho carbono intercambiado.

Pensando en modificar la geometría de ese átomo, se decidió introducir una sulfona (**CUMO-12, Figura 11l**) sin embargo, la anilina en la quinazolina generó impedimento estérico. Debido a esto se propuso una modificación en la cual se disminuyera el tamaño de la anilina a un anillo de cinco miembros considerando utilizar un pirrol (**CUMO-13, Figura 11m**) y se observó una mejoría excelente en el modo de unión.

CUMO-13 mostró las interacciones necesarias en EGFR (**Figura 12A**). La quinazolina generó puentes de hidrógeno con Met769 y Thr768. El pirrol se internalizó en la zona hidrofóbica II (**Figura 12C**) y formó un puente de hidrógeno con el carboxilato de Asp831. La isoquinolinona, gracias a la geometría de la sulfonamida se ubicó en el sitio de unión de la ribosa de ATP y formó un puente de hidrógeno con el carboxilato de Asp831.

En cuanto a PARP1, **CUMO-13** generó las interacciones adecuadas para mimetizar al NAD⁺ pues, como se mencionó, dichas interacciones son puentes de hidrógeno con Gly863 y Ser904. La estructura se estabilizó al interactuar con Tyr907 mediante la generación del apilamiento π - π desplazado que fueron descritos en **CUMO-5 (Figura 12B)**. La quinazolina se encuentra expuesta al solvente, mientras el pirrol se internalizó en el sitio activo en donde se generó una interacción mediante un puente de hidrógeno entre el pirrol y el carbonilo de la cadena lateral de Gln759 (**Figura 12B**). Los puntajes de acoplamiento molecular se encuentran en el **apéndice IV**. Esta molécula se consideró un candidato a fármaco computacional, dicho término se discutirá más adelante

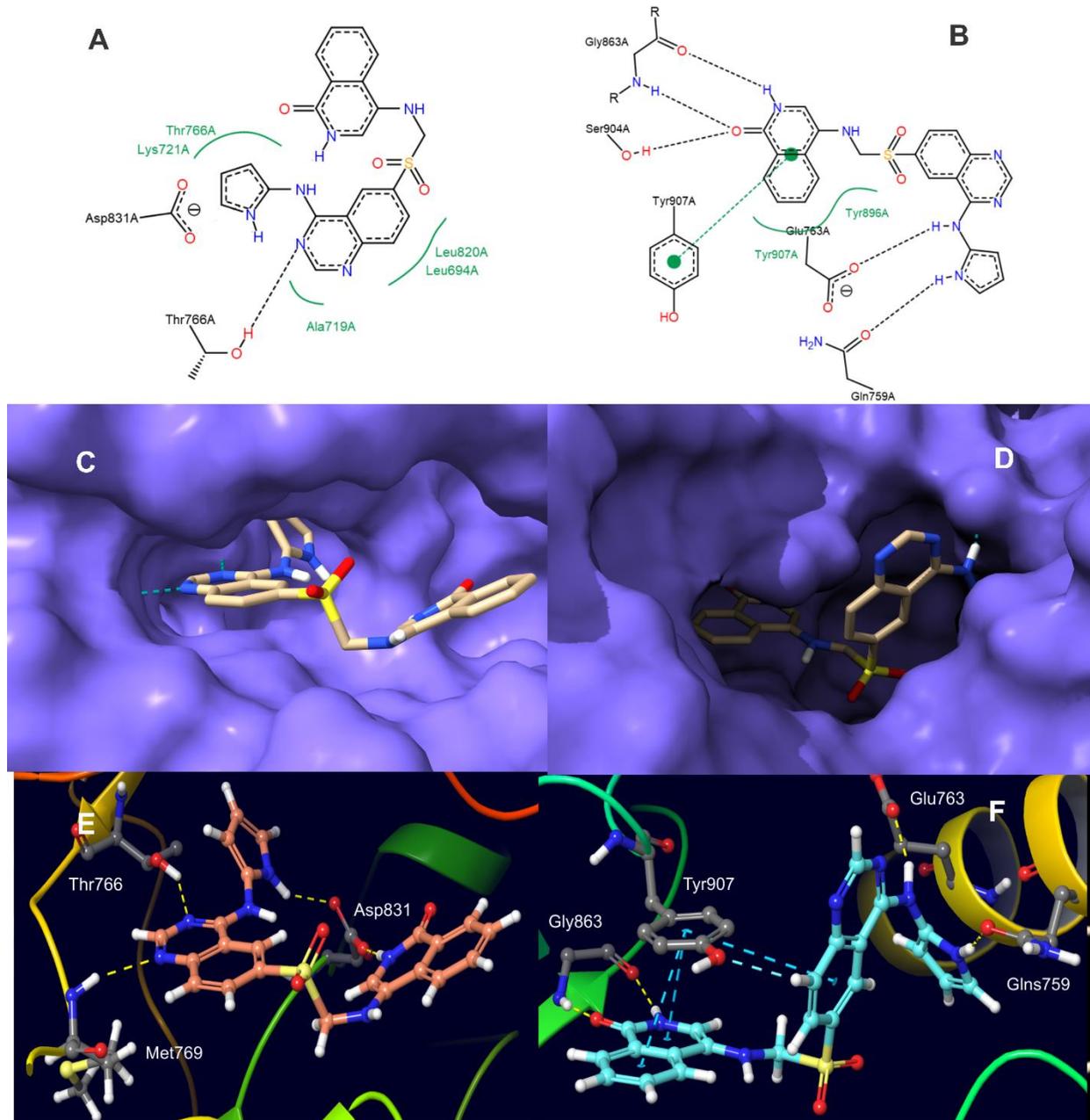


Figura 12 Modos de unión de CUMO-13 en EGFR y PARP1. **A** y **B**: Diagrama en dos dimensiones de interacciones; **C** y **D**: Internalización en los sitios catalíticos; **E** y **F**: Poses en tres dimensiones. Las interacciones 2D se generaron con *PoseViewer*⁷⁷.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.2. Validación de acoplamiento molecular y estudio consenso de modo de unión

El re-acoplamiento del ligando co cristalizado en PARP1 mostró que el protocolo de acoplamiento molecular fue válido pues el RMSD fue menor a 2 Å (0.3599) ^{62,78} (**Apéndice III**) . Es importante mencionar que dicha validación no se llevó a cabo con EGFR pues el programa *Glide* no considera metales como el magnesio. Para el candidato a fármaco, el consenso realizado mostró que el modo de unión generado en GlideXP fue similar en el resto de programas de acoplamiento molecular utilizados. Los resultados de RMSD y puntajes de acoplamiento se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. RMSD y puntajes con distintos programas de acoplamiento molecular de CUMO-13

Programa	RMSD*	RMSD*	Puntaje	Puntaje
	EGFR (Å)	PARP1 (Å)	(Kcal/mol) EGFR	(Kcal/mol) AKT2
Glide XP	-----	-----	-9.214	-9.330
SwissDock	0.7456	1.4038	-9.652	-9.383
LeDock	0.8744	1.0370	-9.630	-9.770
Autodock Vina	0.7776	0.6432	-9.178	-9.254

*El RMSD calculado es con respecto a las posiciones generadas en Glide XP

En cuanto al modo de unión en PARP1, los acoplamientos generados coincidieron en su totalidad en el modo de unión de la isoquinolinona. Las variaciones más considerables se observaron en la quinazolina pues el metileno que une a la isoquinolinona con la quinazolina es flexible lo que permitió distintos acomodados que, a pesar de ello, se encuentran muy cercanos entre sí (**Figura 13**). Ligeras variaciones se encontraron en el anillo pirrólico, ya que el acoplamiento en *Autodock Vina*, colocó al pirrol 180° rotado con respecto al resto de acoplamientos. Estas variaciones se reflejaron en los RMSD altos por parte de SwissDock y LeDock.

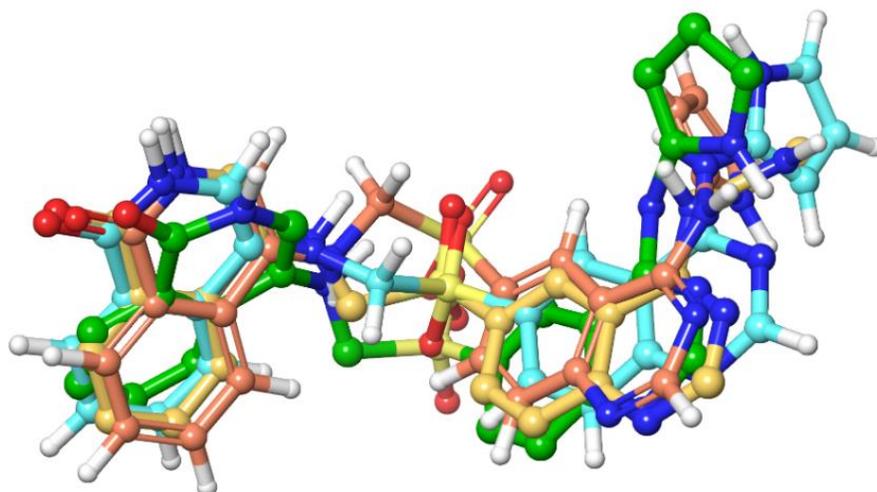


Figura 13. Alineamiento de acoplamiento molecular de CUMO-13 en PARP1. Naranja: GlideXP; Verde: SwissDock; Azul Autodock Vina; Amarillo: LeDock.

Así mismo, en lo que respecta a EGFR, se observó que los acoplamientos eran muy similares entre sí salvo una variación en el modo de unión de LeDock en donde el pirrol se orientó casi 180° hacia el lado contrario (**Figura 14**, verde) similar a lo observado en PARP1, sin embargo, el resto de la molécula se comportó prácticamente idéntica.

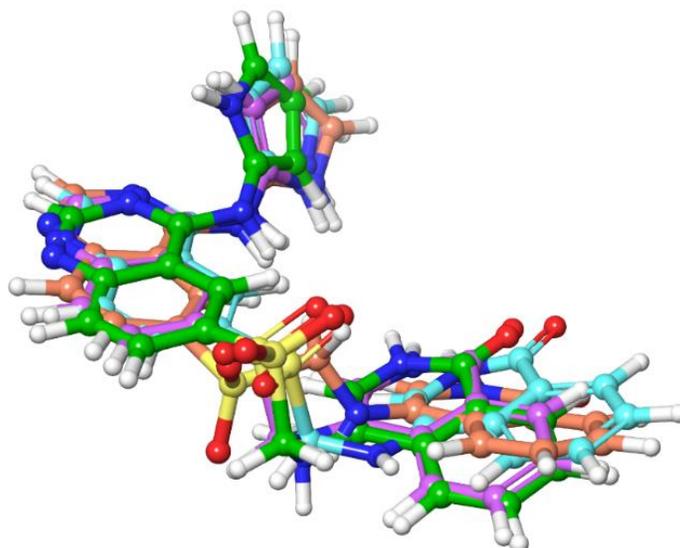


Figura 14. Alineamiento de acoplamiento molecular de CUMO-13 en EGFR. Azul: GlideXP; Morado: SwissDock; Naranja: Autodock Vina; Verde: LeDock.

7.1.3. Dinámica molecular

El complejo proteína-ligando generado a partir de *GlideXP* se estudió durante un periodo de 3 ns. La dinámica realizada permitió contrastar los resultados de acoplamiento molecular y obtener mayor información acerca del modo de unión de **CUMO-13**.

7.1.3.1. CUMO-13 en PARP1

El **Gráfico 1** muestra los cambios de RMSD de la proteína y el ligando. Se observó que la proteína se estabilizó finalmente después de los 1.7 ns a valores promedio de 1.2 Å. De igual forma, el ligando fue estable durante toda la simulación a excepción del periodo de 0.7 ns a 1.1 ns pues ocurrió un cambio sustancial en el RMSD que sugirió un posible reacomodo en el modo de unión.

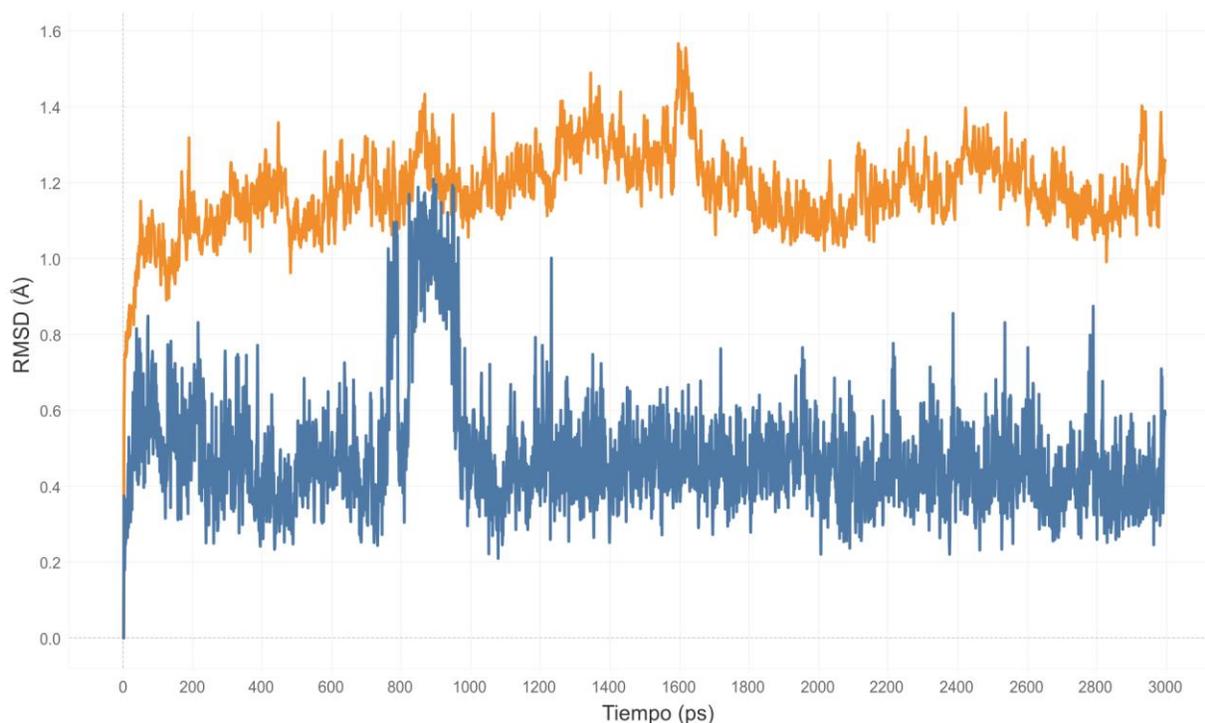


Gráfico 1. RMSD de EGFR y CUMO-13 en la dinámica molecular sobre PARP1. Se muestra en amarillo el RMSD de la cadena principal de EGFR y en azul el RMSD de AUMO-28 con respecto a su posición inicial.

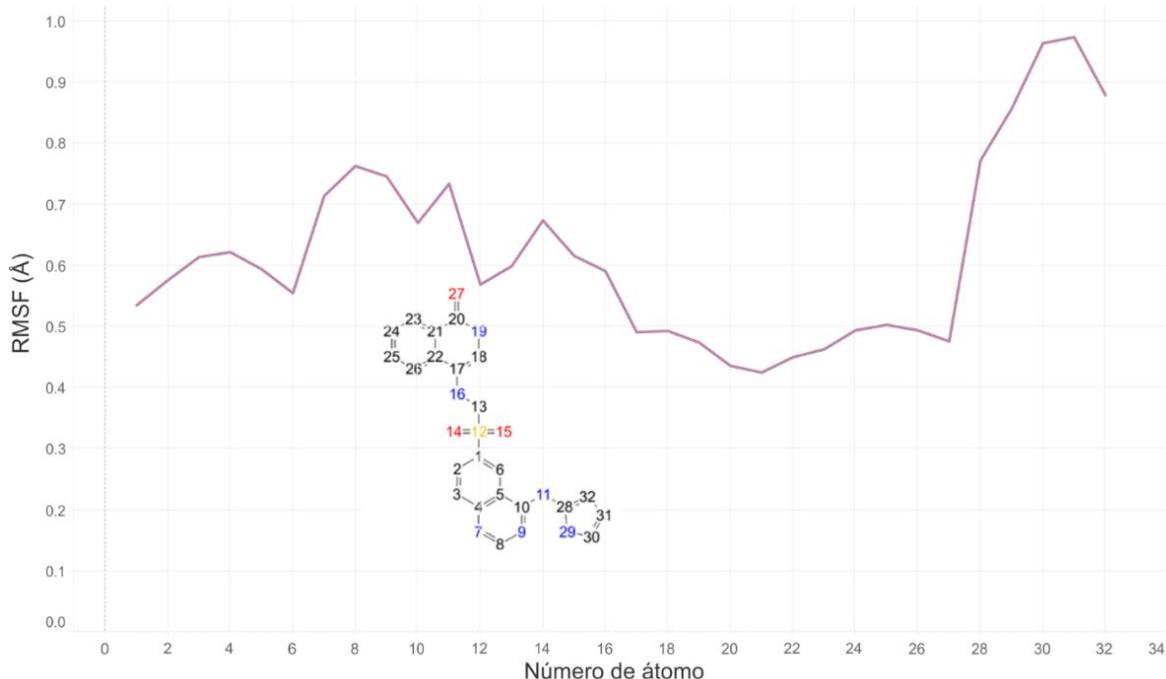


Gráfico 2. RMSF de CUMO-13 en PARP1. Las modificaciones más notables ocurrieron en el anillo de pirrol.

Para estudiar qué átomos generaron la variación de RMSD tan notable, se procedió a analizar el RMSF del ligando (**Gráfico 2**). Se pudo observar que las estructuras que más modificaron su posición fueron los átomos 7-11 y 28-31 que corresponden a la parte “delantera” de la quinazolina y al pirrol en posición 4. Una vez que se determinó qué átomos modificaron su posición de manera mayoritaria se procedió a analizar la torsión del enlace involucrado para confirmar algún tipo de torsión o giro que justificara los cambios de RMSD.

El enlace con mayor variación fue el que se encuentra en la posición 2 del pirrol. Contrario a lo esperado, dicho enlace no sufrió torsiones súbitas que explicasen el cambio de RMSD. El **Gráfico 3**, el cual representa los ángulos de torsión a lo largo de la simulación, siendo el centro del gráfico el tiempo 0 y, cada circunferencia, equivaliendo aproximadamente 0.6 ns, mostró que la torsión del enlace abarcó rangos de 180° a 270° a lo largo de la simulación a manera de oscilación, además, ninguno del resto de enlaces presentó modificación en las torsiones considerables.

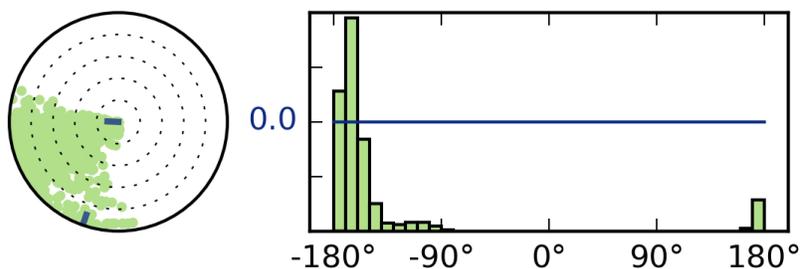


Gráfico 3. Torsión del enlace N-C. a: representación radial de la torsión de enlace a lo largo de la simulación. b: Representación de histograma del gráfico radial. El eje Y representa la energía potencial (en Kcal/mol) del enlace rotatable.

Debido a lo anterior, se procedió a analizar la trayectoria en el intervalo de 600 a 1100 ps que fue en donde se localizó la mayor variación de RMSD. Se observó que el único cambio sustancial en la posición fue el pirrol y, como se observa en la **Figura 15**, el cambio más dramático se encontró en la estructura morada en donde el pirrol se desplazó ligeramente.

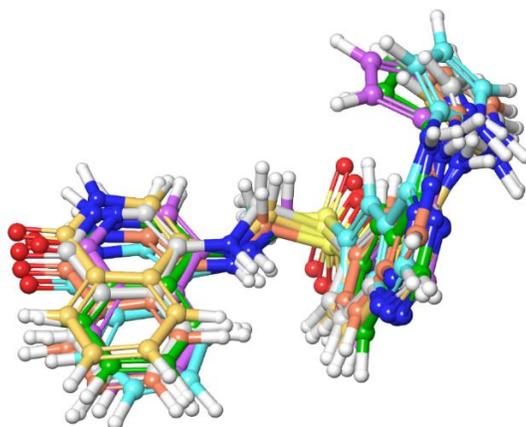


Figura 15. Trayectoria de CUMO-13 en el intervalo de 0.6 a 1 ns de la dinámica molecular en PARP1. Azul: 0.6 ns; naranja: 0.7 ns; verde: 0.78 ns; amarillo: 0.8 ns; morado: 0.85 ns; blanco: 1 ns.

El cambio generado pudo deberse a una molécula de agua que se interpuso entre el pirrol y la proteína que, posteriormente fue desplazada. Es importante mencionar que la estabilidad del complejo se debió a la gran afinidad de la isoquinolinona por su sitio de unión pues prácticamente en toda la simulación se encontraron las interacciones con

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gly863 y Ser904 además del apilamiento tipo π - π desplazado con Tyr904. Otras interacciones como con Tyr896 y Tyr889 que generaron apilamientos π - π en forma de T permitieron que la quinazolina y el pirrol se estabilizaran en el sitio de unión (**Figura 16**).

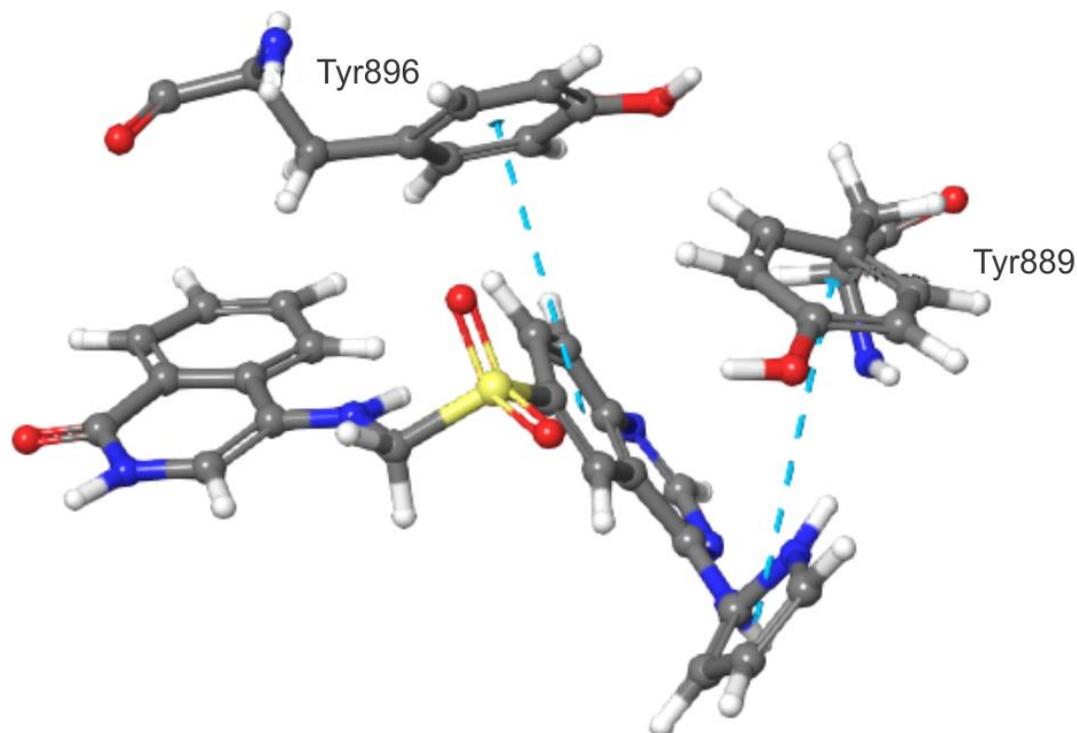


Figura 16. Interacciones de tipo apilamiento π - π de CUMO-13 presentes a lo largo de la simulación en PARP1.

Por otro lado, la estabilización del pirrol posterior a los 1.1 ns se debió principalmente a la formación de puente de hidrógeno entre Thr887 y el nitrógeno del pirrol. Como se puede observar en el **Gráfico 4**, la cantidad de interacciones con Thr889 aumentó conforme la simulación avanzaba manteniéndose constante después de los 1.5 ns aproximadamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

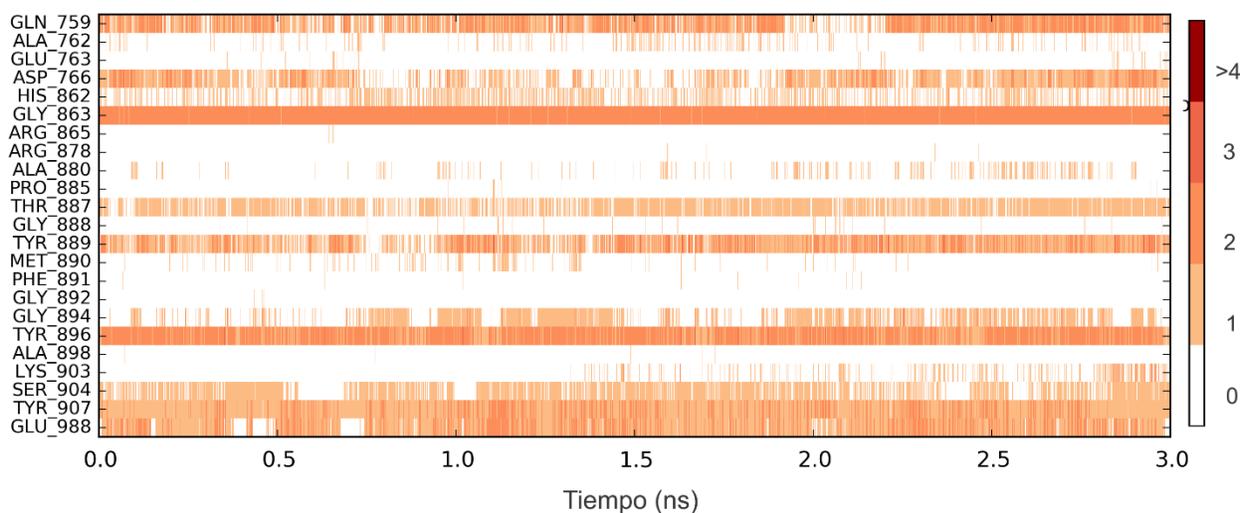


Gráfico 4. Contactos generados a lo largo de la simulación de CUMO-13 en PAPR1. Se muestran interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, contactos hidrofóbicos y puentes con agua.

Finalmente, distintas interacciones como Asp766, Gln759 y Glu988 se dieron mediante puentes de agua con un oxígeno de sulfona, el nitrógeno 3 de quinazolina y nitrógeno 1 de quinazolina respectivamente. Estas interacciones se encuentran relacionadas con el reconocimiento de NAD^+ por lo que **CUMO-13** podría competir por el sitio de unión y aumentar la posibilidad de presentar actividad biológica. El análisis realizado puede complementarse con el video de la dinámica molecular, el cual se puede consultar en el siguiente enlace:

<https://www.youtube.com/watch?v=8xDgU7AV-68>

7.1.3.2. CUMO-13 en EGFR

Esta dinámica molecular resultó muy interesante pues se observaron comportamientos no esperados. De acuerdo con el **Gráfico 5**, el RMSD de la proteína (amarillo) aumentó y se mantuvo estable después del primer nanosegundo. Sin embargo, el ligando sufrió cambios conformacionales muy dramáticos que, *a priori*, sugirieron una posible inestabilidad dinámica o desprendimiento del sitio original del acoplamiento molecular.

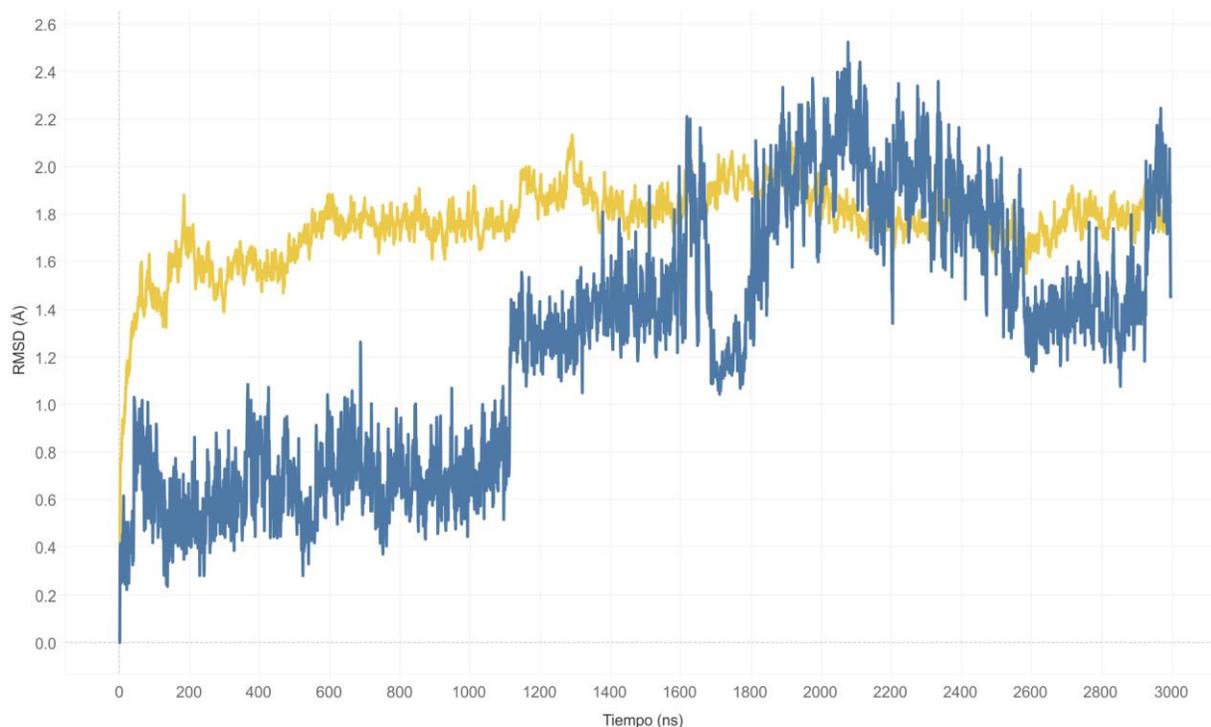


Gráfico 5. RMSD de EGFR y CUMO-13. Se muestra en amarillo el RMSD de la cadena principal de EGFR y en azul el RMSD de AUMO-28 con respecto a su posición inicial.

Sin embargo, se observó que después de los 1.8 ns el ligando se estabilizó en un presunto equilibrio dinámico pues el RMSD fluctuó durante el resto de la simulación y no continuó aumentando lo que indicó que la molécula se mantuvo en el sitio de unión.

Para visualizar qué zona del ligando modificó su posición, se utilizó el RMSF. Al realizar dicho análisis (**Gráfico 6**), se observó que la isoquinolinona (átomos 14-28) modificó su posición de manera notable pues alcanzó valores de RMSF de 2.5 Å mientras que la quinazolina (átomos 1-11, 28-32) prácticamente mantuvieron su posición original

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

indicando que el ligando no se separa del sitio de unión de la adenina en EGFR.

Además, mediante el análisis de los contactos (**Gráfico 7**) se pudo observar que las interacciones con Asp813 se perdieron prácticamente al inicio de la simulación y no existieron en el resto de la misma indicando que la isoquinolinona no genera las interacciones lo suficientemente fuertes y su desprendimiento se relacionó con el RMSF tan alto. El movimiento anterior se relacionó con la ruptura de la intracción la Lys721 y el carbonilo de la isoquinolinona pues la Lys721 comenzó a generar interacciones con el pirrol.

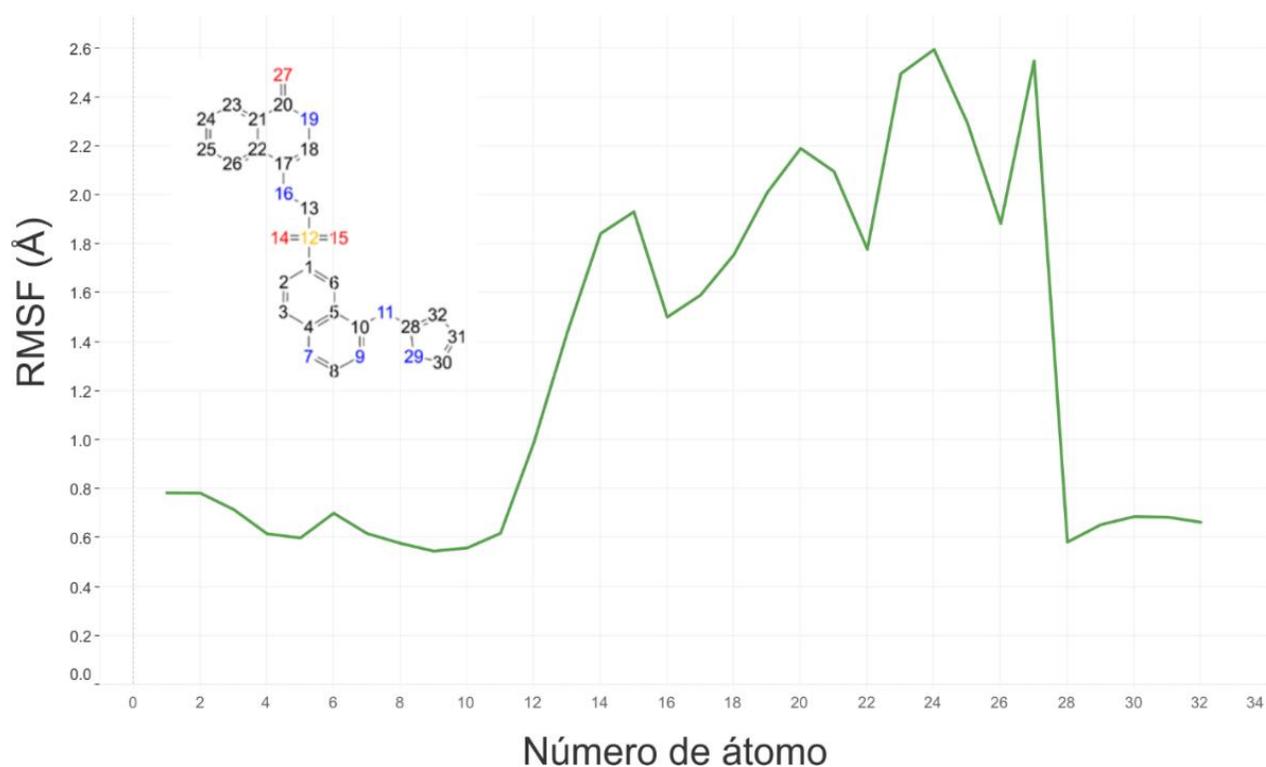


Gráfico 6. RMSF de CUMO-13 con respecto al sitio de unión de EGFR.

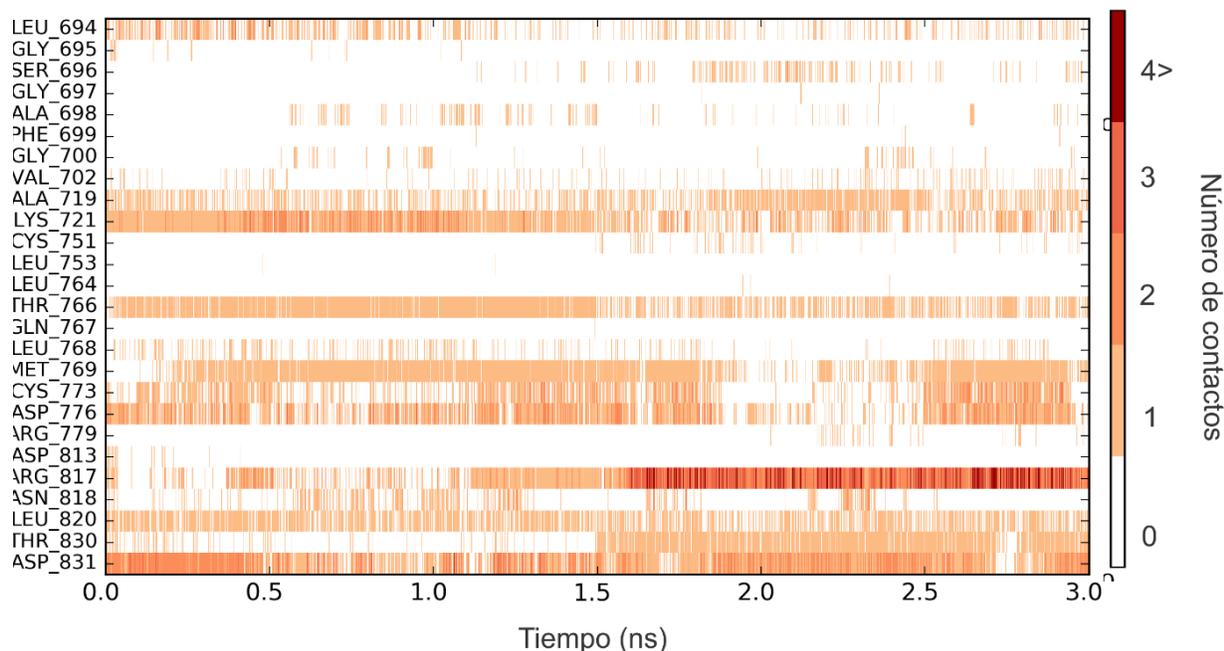


Gráfico 7. Contactos generados a lo largo de la simulación de CUMO-13 en EGFR. Se muestran interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, contactos hidrofóbicos y puentes con agua.

A continuación, se analizaron los ángulos de torsión de enlace (**Gráfico 8**) y se observaron dos eventos interesantes que revelaron qué sucedió con la isoquinolinona. El primero de ellos fue la rotación del enlace C-N que se encuentra junto a la sulfona (**Gráfico 8, A**, enlace verde). Se observó que, durante los primeros 1.2 ns de la simulación, este enlace se encontraba formando un ángulo de 270° y, posteriormente, generó un rango de ángulos de entre 190° a 170° que ocurrieron durante 0.6 ns de la simulación. Lo anterior se correlacionó con el primer cambio de RMSD del ligando (**Gráfico 8**) a los 1.2 ns y posterior estabilización durante 0.6 ns. Finalmente, este enlace volvió a girar formando un ángulo de 90° lo que se relacionó de igual manera con el cambio de RMSD a los 1.8 ns de la simulación; posterior a este giro, el enlace se mantuvo en un ángulo cercano a los 90° .

El segundo evento, fue la torsión del enlace S-C proveniente de la sulfona con la quinazolina (**Gráfico 8, B**, enlace amarillo). Al igual que el enlace C-N, en los primeros 1.2 ns el enlace generó un ángulo de 90° , posterior a dicho tiempo, durante 0.6 ns,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

generó un ángulo en un rango de 180° a 200° para finalmente generar un ángulo mayoritariamente de 270° .

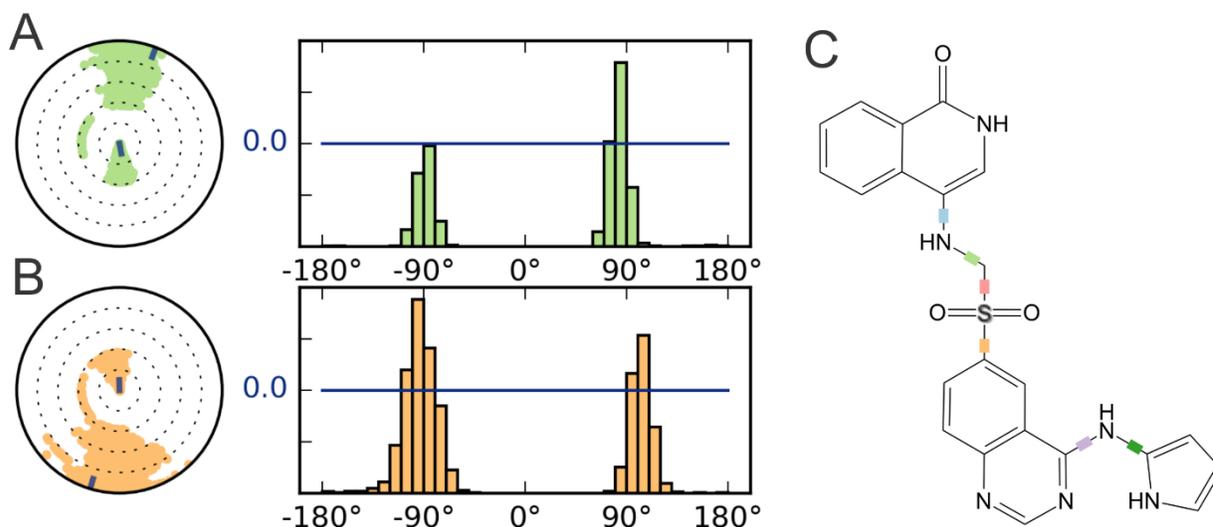


Gráfico 8. Ángulos de torsión de enlaces N-H y S-C. A y B: Representación radial y por histograma del ángulo de torsión del enlace N-H y S-C respectivamente; C: Enlaces rotables presentes en CUMO-13.

Debido a la gran cantidad de movimientos generados se procedió a analizar la trayectoria del ligando para verificar los cambios ocurridos. La **Figura 17** muestra tres distintos momentos del ligando durante la simulación; el modo de unión inicial (azul) presenta la isoquinolinona en un ángulo de 90° con respecto al núcleo de quinazolina y, mientras avanzó la simulación, la isoquinolinona formó un ángulo de 180° .

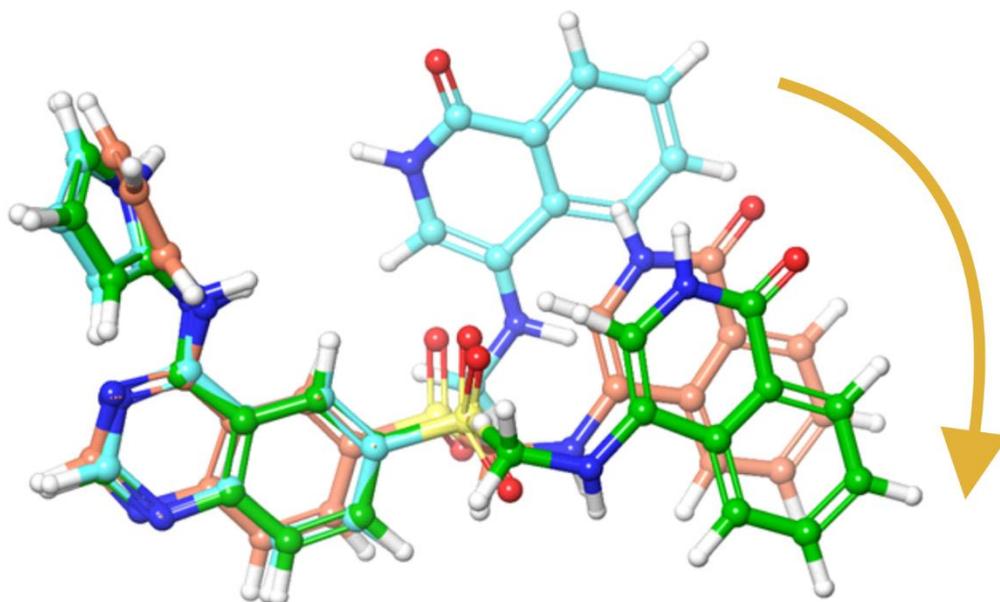


Figura 17. Trayectoria de CUMO-13 en EGFR a 1.1, 1.6 y 2.0 ns. Azul: 1.1 ns; naranja: 1.6 ns; verde: 2.0 ns.

Algo que llamó la atención fue que se observó que el número de contactos con Arg817 aumentaron de manera considerable alrededor de los 1.6 ns (**Figura 17**); estos contactos se generaron con la isoquinolinona que presuntivamente fue el motivo del movimiento tan drástico debido a un apilamiento π -catión

Ya que el tiempo de simulación no permitió analizar la nueva conformación y movimiento, del ligando, se continuó la simulación a partir de la última posición generada y se simularon 3 ns más. Esta nueva etapa de la dinámica molecular reveló que **CUMO-13** continuó moviéndose dentro de la proteína hasta encontrarse estable a los 3800 ps (**Gráfico 9**) en donde, de igual forma, la proteína finalmente se estabilizó.

Al realizar nuevamente el análisis de RMSF (**Gráfico 10**) se observó que la isoquinolinona continuó modificando su posición además de observar que la quinazolina se movió ligeramente (átomos 1-18). Posteriormente, se analizaron los contactos generados con la proteína en dos distintos grupos: Puentes de hidrógeno-Hidrofóbicos (**Gráfico 11A**) y puentes con agua.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

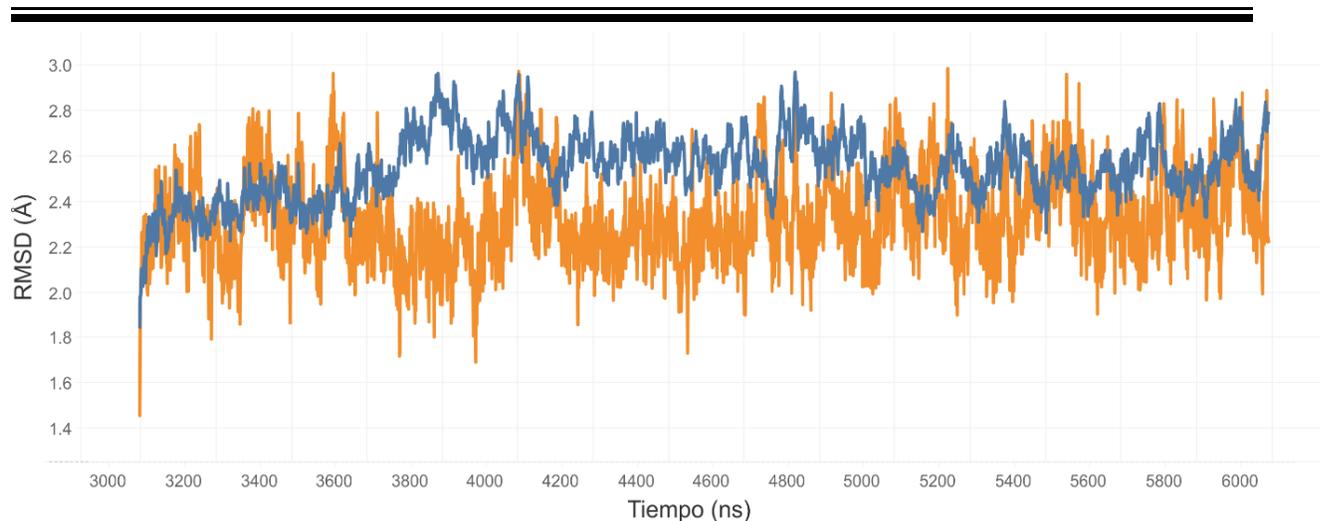


Gráfico 9. RMSD de la cadena principal de EGFR (azul) y ligando (naranja). El valor de RMSD es con respecto a la posición original en la primera etapa de dinámica molecular.



Gráfico 10. RMSF de CUMO-13 en la segunda etapa de dinámica molecular en EGFR.

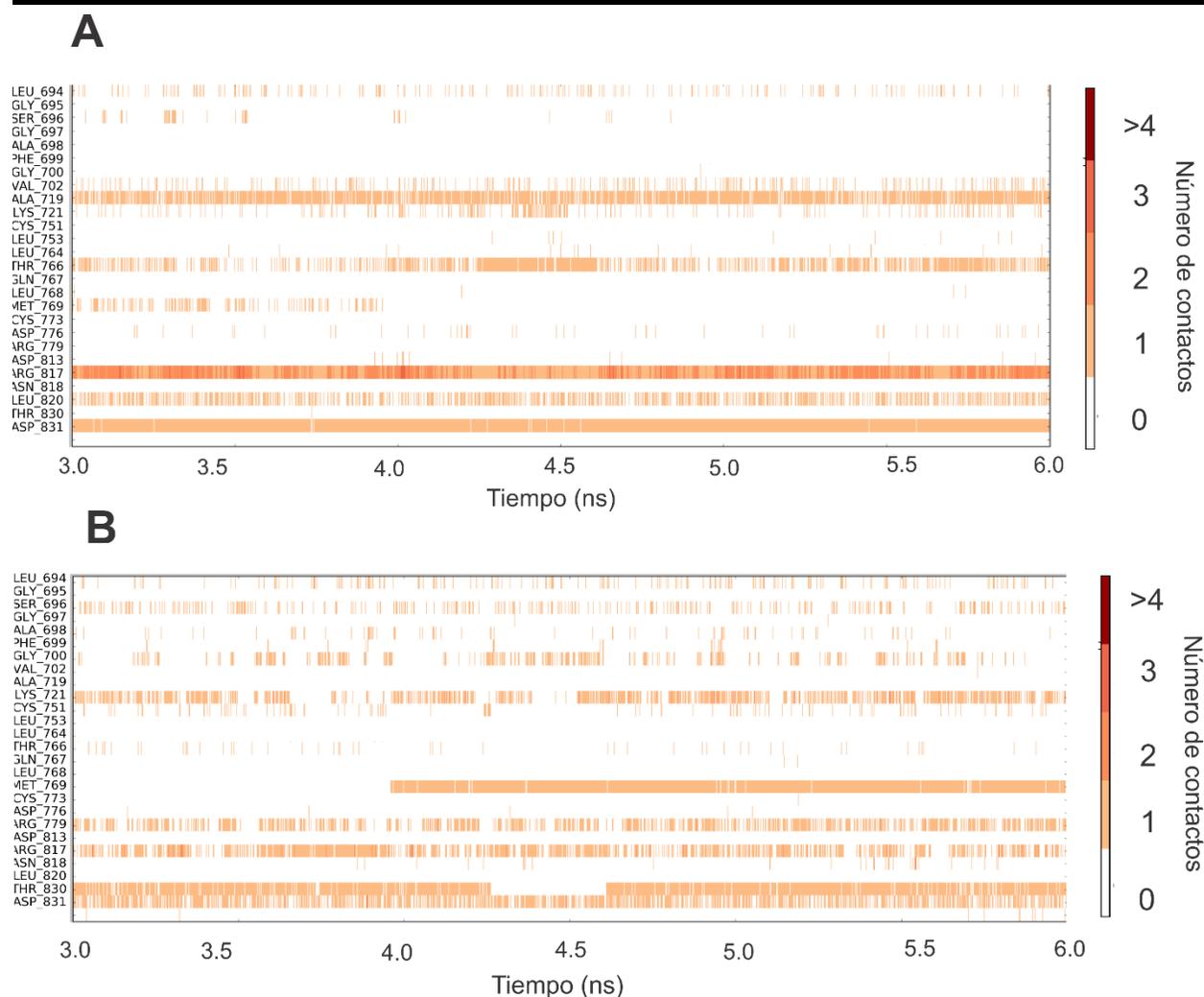


Gráfico 11. Contactos EGFR-CUMO-13 en la segunda etapa de dinámica molecular. A: Contactos de puente de hidrógeno-hidrofóbicos; **B:** Contactos de puentes de agua.

Se pudo observar en el **Gráfico 11A** que el puente de hidrógeno con la Met769 se perdió totalmente lo que sugirió que la quinazolina se alejó de dicho residuo y se correlacionó con lo observado en el RMSF. Debido a la gran presencia de puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos con la Arg817 la molécula fue atraída hacia afuera de sitio de unión permitiendo que una molécula de agua se localizara entre la Met769 y el nitrógeno 1 de la quinazolina como se puede observar en el **Gráfico 11B**. Lo anterior descrito se correlacionó con la estabilización de la proteína pues no ocurrieron más movimientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El movimiento tan notable de **CUMO-13** pudo verse favorecido al hecho de presentar un pirrol en la posición 4 de la quinazolina que, si se encuentra localizado unirse en la zona hidrofóbica II, su volumen le confiere mayor movilidad dentro de dicha zona hidrofóbica fungiendo como un pivote; esto no sucede con una quinazolina 4 anilino sustituida pues, en términos de ocupación, ocupa mayor volumen de la zona hidrofóbica. Debido a esto es posible proponer modificaciones posteriores como el hecho de colocar una amina en posición 2 de la quinazolina para emular el puente de agua generado o bien colocar el pirrol en posición 5 de la quinazolina; estas posibles modificaciones se podrán realizar una vez validado lo observado en las dinámicas moleculares realizadas de **CUMO-13** mediante cristalización y elucidación estructural de la proteína. El análisis anterior se puede complementar con el video de la dinámica molecular localizado en el siguiente enlace:

<https://www.youtube.com/watch?v=RAPxYAxkdnM&t=211s> .

Algo muy rescatable de esta simulación es que no solo basta con realizar acoplamiento de consenso pues como se demostró, a pesar de presentar un buen modo de unión y altos puntajes, dichos acoplamientos pueden no ser válidos al someterse a dinámicas moleculares que simulen lo mejor posible condiciones reales.

7.1.4. Propiedades fisicoquímicas de serie CUMO

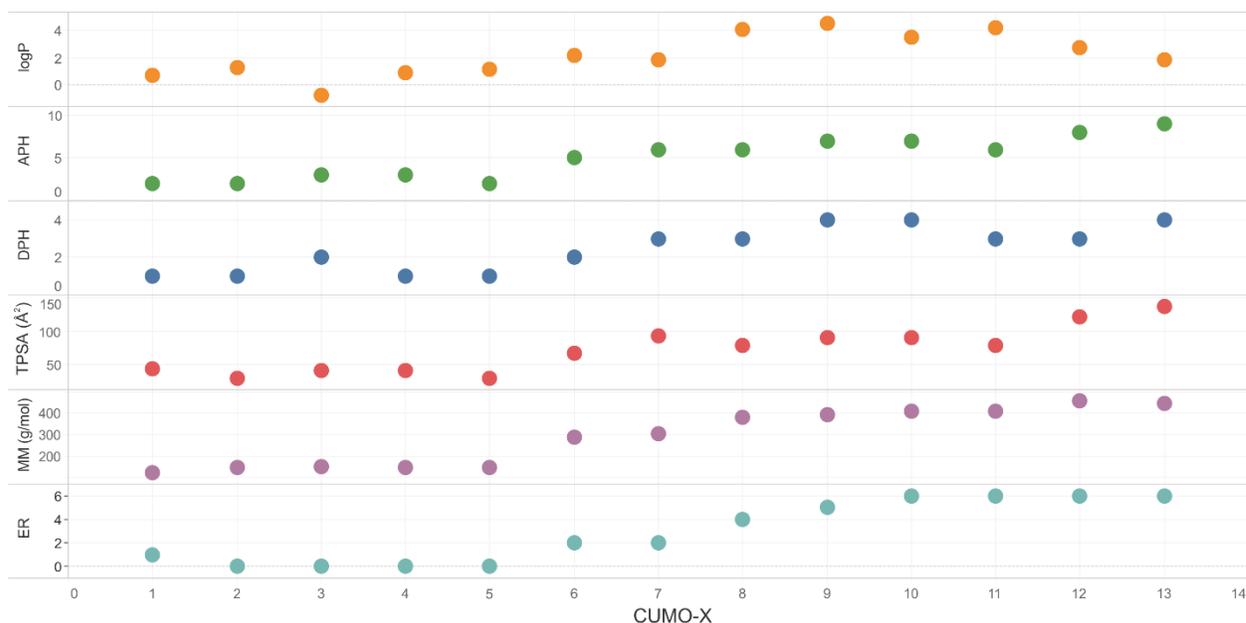


Gráfico 12. Propiedades fisicoquímicas de serie CUMO. APH: Aceptores de puente de hidrógeno; DPH: Donadores de puente de hidrógeno; ER: Enlaces rotables; MM: masa molar.

El diseño de **CUMO-13** buscó encontrar un candidato a fármaco computacional. La determinación de las propiedades fisicoquímicas que sugieren *Lipinski-Veber* para que una molécula sea candidata a fármaco son de suma importancia.

Las propiedades mencionadas son las siguientes:

- **Regla de los 5 (Lipinski):** una molécula para ser candidato a fármaco no debe de tener más de 5 donadores de puente de hidrógeno (DPH), no más de 10 aceptores de puente de hidrógeno (APH), masa molar menor a 500 Da y un logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua (logP) no mayor a 5.
- **Reglas de Veber:** una molécula candidato a fármaco debe tener menos de 10 enlaces rotables (ER) y un área polar topológica superficial (TPSA) menor a 140 Å² y una suma total de DPH y APH menor a 12.

Durante el diseño de **CUMO-13** se buscó cumplir con buenos puntajes de acoplamiento y que cumpliera con las propiedades ya mencionadas; de esta manera la obtención de esta molécula ser considerada directamente como un candidato a fármaco sin necesidad

de realizar mayores modificaciones.

El desarrollo de las propiedades de esta serie no presentó ningún problema gracias al tipo de diseño realizado (**Gráfico 12**). Al comenzar con fragmentos e ir construyendo poco a poco la molécula, el control sobre las propiedades fue mayor.

Por lo que respecta a las propiedades, la masa molar aumentó de manera considerable una vez que la isoquinolinona fue fusionada con la quinazolina, sin embargo, se mantuvo dentro de los límites todo el tiempo (menores a 500 g/mol).

El logP, de igual forma, aumento al combinarse con la quinazolina, pero disminuyo de manera notable al introducir la sulfona dentro de la estructura. Debido a lo anterior, el TPSA aumentó en gran medida rozando los límites recomendados. Los APH, DH y ER de igual forma se mantuvieron en valores adecuados.

Se estudió el posicionamiento de **CUMO-13** dentro de tres espacios químicos distintos: el espacio químico de los fármacos comerciales, de inhibidores de cinasas e inhibidores de PARP, este estudio se realizó considerando las propiedades *Lipinski-Veber* mediante una técnica de reducción de dimensiones conocida como componentes principales ⁷⁹.

En la **Tabla 4** se pueden observar las varianzas de cada componente principal correspondientes a los espacios químicos analizados. Para el caso del espacio químico de fármacos aprobados e inhibidores PARP1 se pudo observar que con los componentes utilizados fue posible explicar más del 80% de las propiedades fisicoquímicas si se visualiza de manera bidimensional. Para el caso de los inhibidores de cinasas, al utilizar únicamente dos componentes principales se puede explicar casi el 70% de las propiedades lo que es aceptable; un tercer componente principal es necesario ser añadido para explicar un 85% de las propiedades fisicoquímicas, sin embargo, no fue necesario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4. Valores de varianza del análisis de propiedades fisicoquímicas mediante componentes principales de espacios químicos

Componente principal	Varianza (%)		
	Fármacos aprobados	Inhibidores de cinasa	Inhibidores de PARP1
PC1	82.34	38.54	65.15
PC2	12.04	31.028	18.25

De acuerdo con el **Gráfico 13**, **CUMO-13** se localiza en la zona más poblada del espacio químico de los fármacos comerciales, lo que indica la gran similitud en cuanto a propiedades fisicoquímicas respecta aumentando la posibilidad de presentar buena distribución y, por consiguiente, actividad biológica.

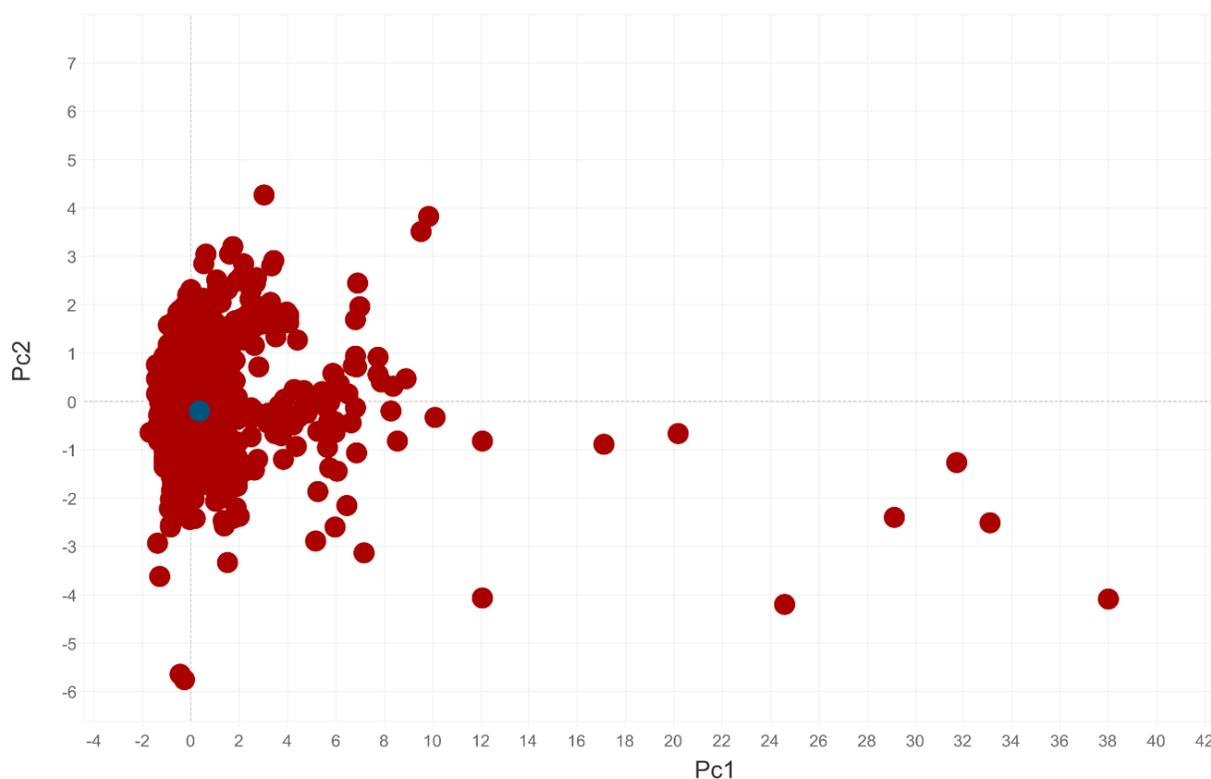


Gráfico 13. Representación bidimensional de propiedades fisicoquímicas de fármacos aprobados mediante componentes principales (pc1, pc2). El círculo azul indica la posición de CUMO-13.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En segundo lugar, **CUMO-13**, dentro del espacio químico de los inhibidores de cinasa (**Gráfico 14**), se encuentra relativamente alejado del grupo central que conforma al espacio químico. Lo anterior se debe al valor tan alto de TPSA que presentó la molécula pues el resto de los fármacos ronda en un rango de 50 Å² a 130 Å². Sin embargo, el resto de propiedades permite posicionarse de manera muy cercana con respecto al resto de fármacos aumentando de igual forma la posibilidad de fungir como un inhibidor de cinasas.

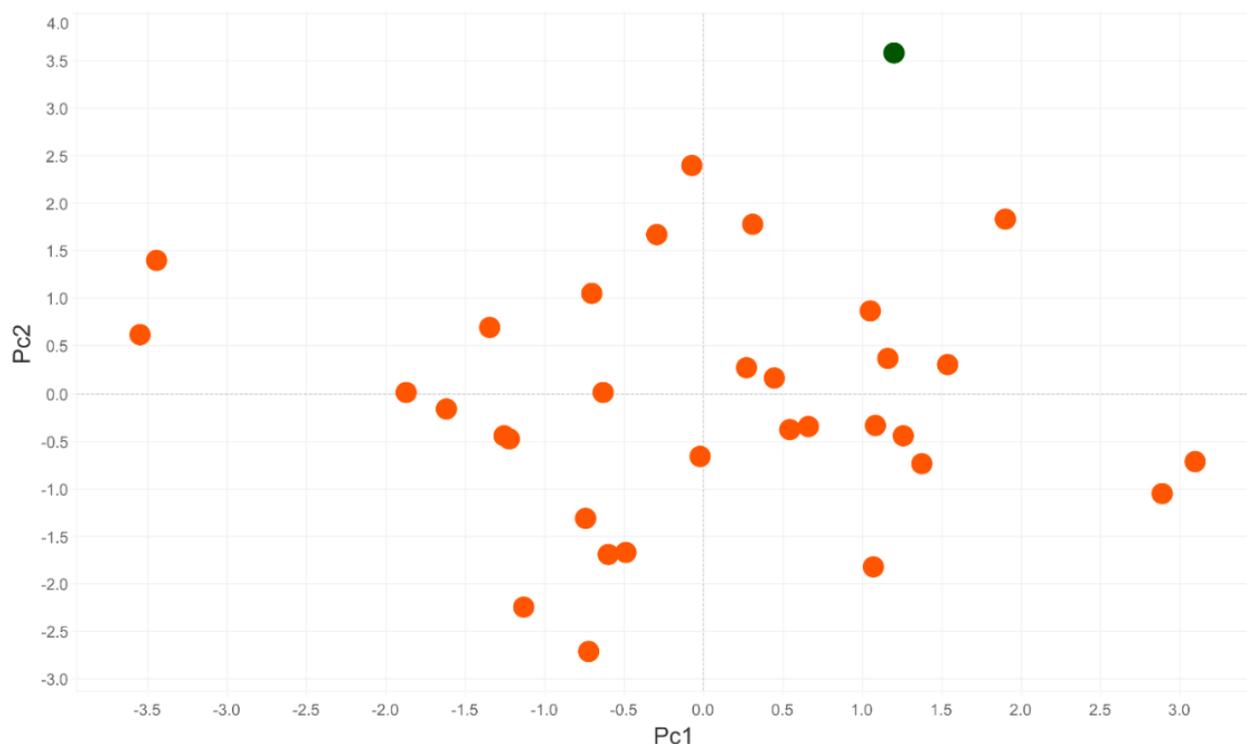


Gráfico 14. Representación bidimensional de propiedades fisicoquímicas de fármacos inhibidores de cinasas mediante componentes principales (pc1, pc2). El círculo verde indica la posición de CUMO-13.

Por último, el espacio químico de los inhibidores de PARP (**Gráfico 15**) es muy pequeño, pues son pocos los fármacos aprobados y otros pocos se utilizan como experimentales por lo que la comparación de **CUMO-13** no resulta tan significativa. Sin embargo, debido al valor de TPSA y la masa molar, la molécula se encuentra muy alejada de cualquier inhibidor ya que éstos son moléculas muy pequeñas que únicamente mimetizan a la NAM.

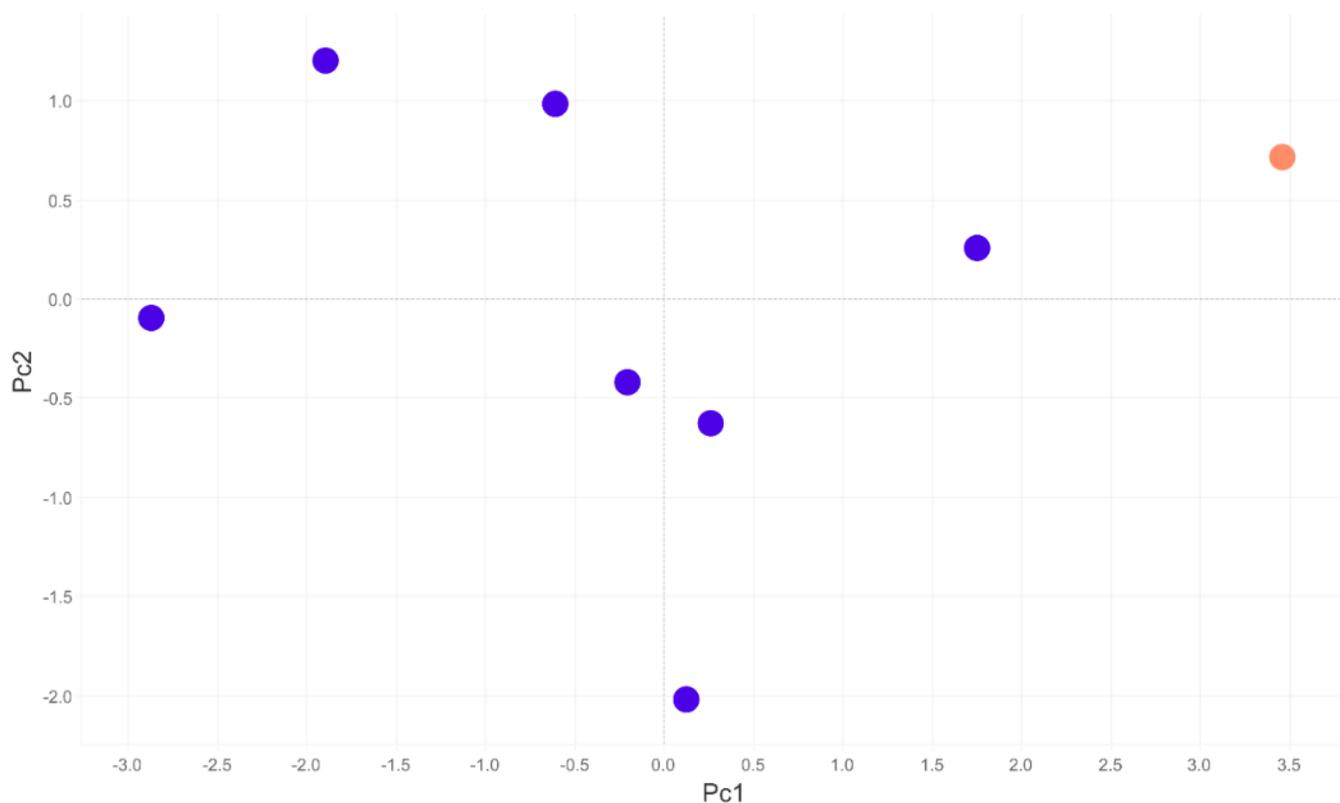


Gráfico 15. Representación bidimensional de propiedades fisicoquímicas de fármacos inhibidores de PARP mediante componentes principales (pc1, pc2). El círculo naranja indica la posición de CUMO-13 en dicho espacio químico.

En la **Tabla 5** se muestran las propiedades fisicoquímicas de **CUMO-13**. Se puede observar que únicamente se violó una regla de Veber, a pesar de ello dicha violación no es alarmante pues su diseño involucra acción dual y es factible considerar a **CUMO-13** como candidato a fármaco.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de CUMO-13

Molécula	MM (g/mol)	logP	DPH	APH	TPSA	ER
CUMO-13	446.49	1.84	9	4	137.25	6

7.2. Diseño EGFR-AKT2 (serie AUMO)

El diseño de esta molécula se basó principalmente en la similitud estructural que presentan las cinasas cuyo ligando endógeno es ATP. A pesar de ello, se propuso diseñar una molécula tipo quimera utilizando núcleos base de moléculas ya probadas biológicamente sobre AKT2 para una posterior fusión con una quinazolina. Debido a esto fue necesario investigar las características de las estructuras probadas en AKT2 y distinguir interacciones con aminoácidos clave que fuesen distintivos de AKT2. Para ello se utilizó una base de datos proveniente de *ChEMBL* a la cual se le realizó un cribado virtual para obtener las interacciones deseadas y posteriormente encontrar, una molécula *Hit* computacional, este concepto se discutirá más adelante.

7.2.1. Base de datos

Después de realizar el curado de la base de datos de ChEMBL, se obtuvieron un total de **2135** moléculas distintas las cuales, al ser preparadas en pH 7.4, generaron **4561** moléculas en total. Esto se debió a los tautómeros que se presentaron en muchas estructuras.

7.2.2. Interacciones clave de AKT2

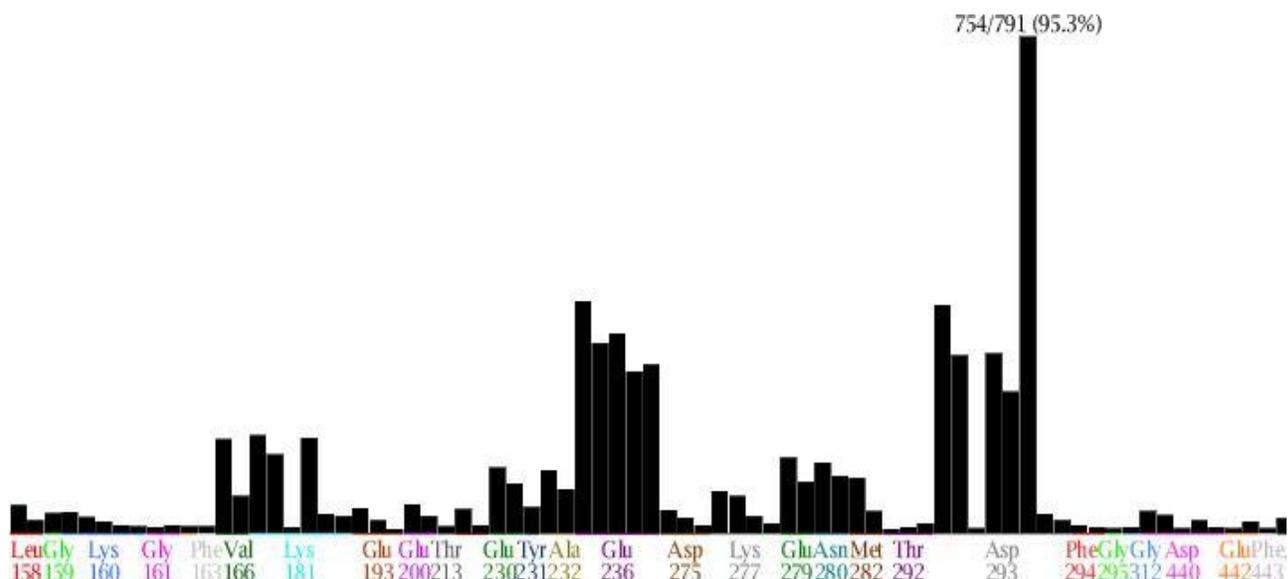


Gráfico 16. PLIFS generados a partir del cribado virtual. Cada interacción está representada por una o más barras. Cada barra indica interacciones con distintos puntos de los ligandos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las interacciones con más recurrencia y, consideradas clave, obtenidas mediante el cribado virtual se muestran en el **Gráfico 16**. Se pudieron distinguir al menos 3 interacciones con más presencia en las moléculas: Asp293, Glu236 y Val166. Las interacciones con Asp293 representaron casi 100% de las interacciones revelando así que es necesaria para generar alguna respuesta biológica.

Estas interacciones se tratan de siete distintos tipos siendo la más importante la interacción iónica de una amina protonada y el carboxilato del Asp293. Otras interacciones, como con Glu236, son de distintas naturalezas, pero sin resaltar alguna de ellas. Por último, otra interacción con presencia considerable fue Val166 que se caracterizó por ser exclusivamente contactos hidrofóbicos. Las interacciones descritas permitieron determinar qué características considerar en los pasos consecuentes dentro del diseño.

7.2.3. Selección de *Hit*

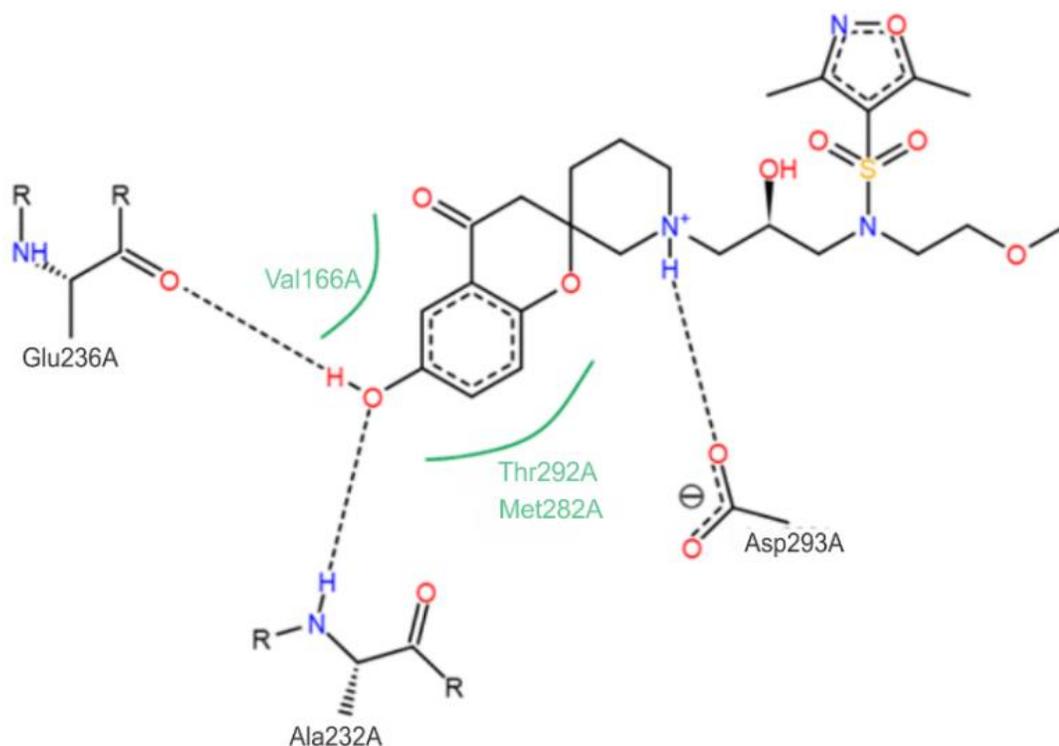


Figura 18. Mapa de interacciones 2D de AUMO-1. Se pueden observar las 2 interacciones más importantes. El mapa fue generado con *Poseviewer*.

Una vez realizado el re-acoplamiento de la base de datos con *Glide XP* se analizaron los mejores acoplamientos y se eligió a la molécula que presentara las tres interacciones consideradas clave. La molécula elegida se muestra en la **Figura 18** cuyo código es “CHEMBL1761070”.

De aquí en adelante a dicho *Hit* se le llamó **AUMO-1**. La estructura de esta molécula consta de un anillo tipo cromano que interacciona con la Glu236 y la Val166. Además, se observa un carbono tipo espiro de configuración absoluta S que tiene unida una piperidina la cual se encuentra protonada y es la encargada de interaccionar con el Asp293.

Es importante comentar la diferencia entre un *hit* computacional y un *hit* experimental. De manera típica, un *hit* computacional proviene de un cribado virtual el cual cumple con características deseadas, por ejemplo, en este trabajo **AUMO-1**, cumple con un puntaje adecuado y con las interacciones consideradas clave. Este *hit* computacional puede convertirse en *hit* experimental si se prueba contra la diana molecular que se estudia, sin embargo, en este caso, **AUMO-1** ya ha sido probado en AKT2 mostrando actividad biológica por lo que es posible realizar las modificaciones adecuadas para encontrar una molécula líder o, en este caso, un candidato a fármaco de acuerdo con lo discutido con anterioridad.

7.2.4. Construcción de compuesto candidato a fármaco

Al analizar el modo de unión tridimensional (**Figura 19**), se pudo notar que la estructura espirocromano se internalizó dentro del dominio catalítico de AKT2 mientras que el oxazol se encontró expuesto al disolvente por lo que se decidió modificar a la estructura en dicha zona. Debido al modo de unión inicial, se planteó construir una molécula tipo quimera.

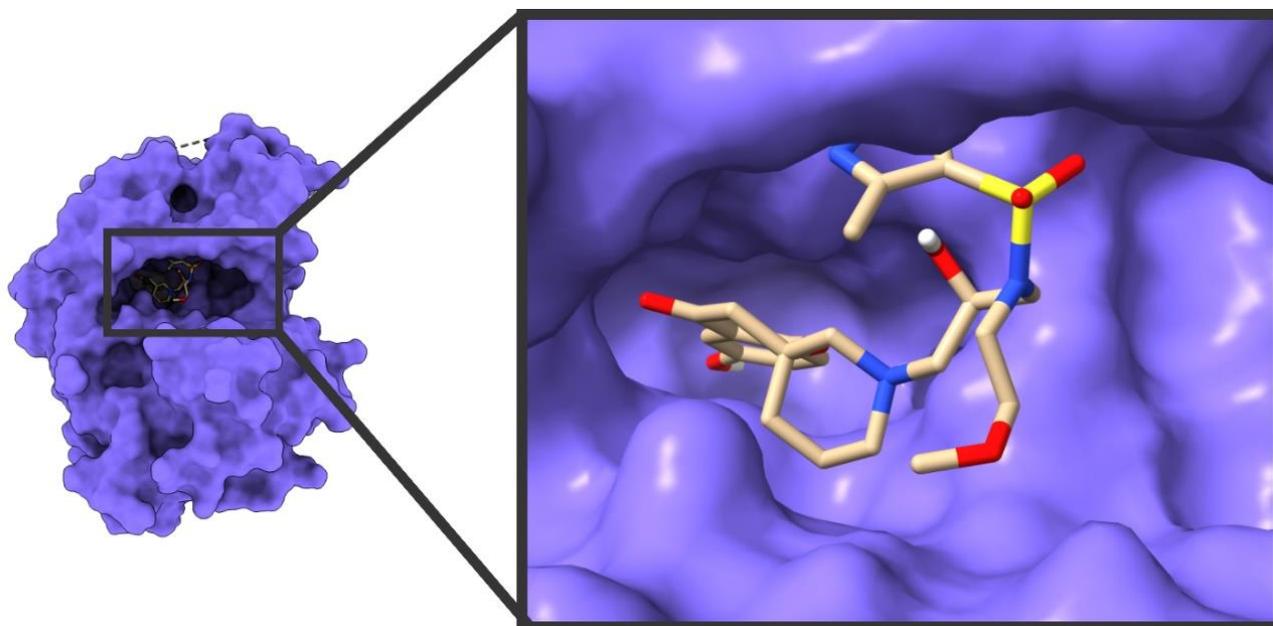


Figura 19. Modo de unión de UMOD-1. El anillo sulfoisoxazol y la cadena alquílica se encuentran en contacto con el solvente. La imagen fue generada con ChimeraX ⁶.

Por lo tanto, se construyó la serie **AUMO-2-5** para lo cual se consideró, en primera instancia, quinazolinas que tuviesen anilinas (**Tabla 6**) en la posición 4 para emular a los fármacos comerciales como Erlotinib o Gefitinib e impedir un fenómeno como el ocurrido en el diseño de la molécula **CUMO-13** además de considerar una conexión en la posición 6 de la misma quinazolina. El intercambio realizado sobre el isoxazol permitió observar que el núcleo de cromano no se posicionó como inicialmente lo hacía **AUMO-1**, en su lugar, la quinazolina se colocó en dicha zona únicamente generando interacciones hidrofóbicas (**Figura 20**). Esto descartó por completo que la molécula a diseñar fuese una molécula tipo quimera. De manera computacional, se observó que la quinazolina se une de manera favorable en el sitio de adenina. Ahora, las opciones a considerar del diseño se recortaron a fusionados o híbridos y, para este tipo de diseño, se necesitan interacciones clave y distinguibles en ambas dianas biológicas ^{41,44}.

Estas interacciones fueron distinguibles entre las dos dianas biológicas pues, para AKT2, Asp293 es la más importante de todas mientras que para EGFR la interacción clave es con Met769.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Estructuras de las 4-anilino quinazolininas consideradas dentro del diseño dual

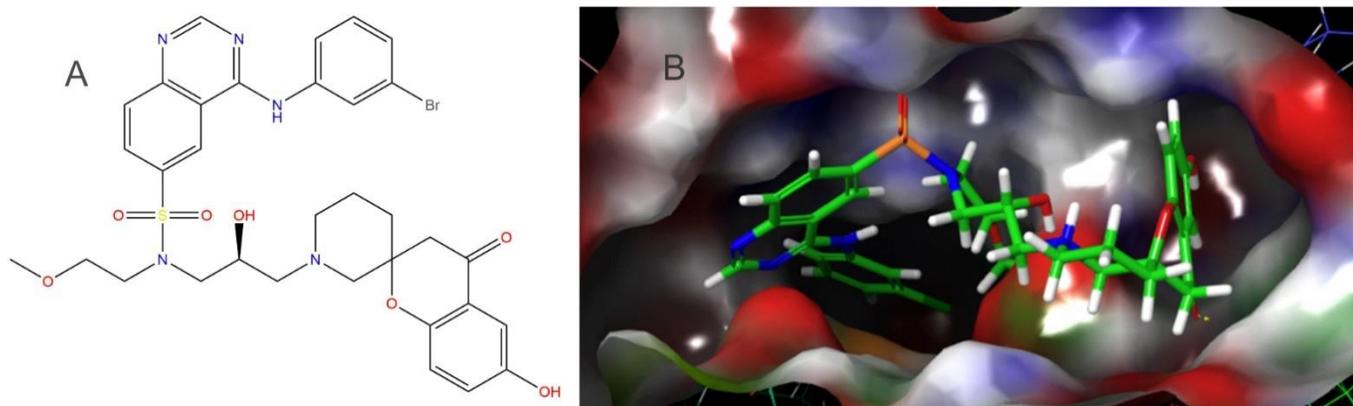
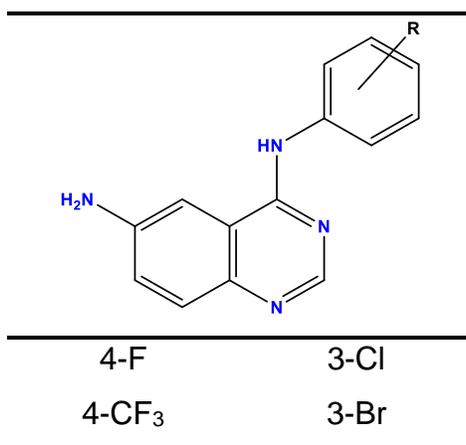


Figura 20. (A) Estructura de AUMO-5. (B) Modo de unión de AUMO-5. La internalización de la quinazolinina se generó en el sitio de unión original del cromano de AUMO-1. Imagen generada con la interfaz gráfica de Maestro.

A partir de la primera serie generada (**Figura 21a**), se decidió continuar con dichas estructuras para mejorar sus propiedades ADME y mejorar el puntaje de acoplamiento en EGFR y AKT2. La siguiente modificación realizada eliminó la cadena alquílica que se encuentra unida a la sulfonamida pues se generaba impedimento estérico al unirse en EGFR (**Figura 21b**). Estas nuevas moléculas mejoraron el modo de unión en AKT2, sin embargo, el hidroxilo presente en el enlazador entre quinazolinina y espirocromano impidió que se generaran las interacciones clave en EGFR por lo que se decidió eliminar dicho hidroxilo (**Figura 21c**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta nueva serie de moléculas se presentaron como un candidato adecuado que mejoraba los puntajes, sin embargo, las propiedades ADME eran sobrepasadas de manera considerable. Una de las propiedades que superaron de manera excesiva los límites que establece *Lipinski-Veber* fue el TPSA, ya que el anillo de cromano aumentó este valor debido al oxígeno del fenol, al oxígeno carbonílico y al oxígeno que formaba el carbono espiro. Estos dos últimos se conservaron ya que no generaron interacciones en ninguna de las dianas biológicas y no influyeron en el modo de unión al estar ausentes. Algo también que se consideró fue la quiralidad que tenía el carbono espiro, pues ello permitió que la amina protonada interaccionase adecuadamente con Asp293, por lo que se tuvo que mantener de alguna forma tal disposición espacial.

En primera instancia el anillo tipo cromano se abrió (**Figura 21d**). Tal apertura promovió la modificación de la piperidina y para compensar la quiralidad se adicionó una amina con configuración S la cual podría ser protonada (**Figura 21e**). Esta estructura tuvo similitud considerable al aminoácido tirosina por lo que se decidió reemplazar toda la estructura cromano y piperidina por dicho aminoácido (**Figura 21f**).

Esta nueva serie mejoró sus propiedades y permitió un mejor puntaje para ambas dianas. Por lo tanto, la incógnita a seguir fue que si era posible reemplazar la tirosina por algún otro aminoácido con hidroxilos (ácidos, treonina o serina). Finalmente, se encontró que el utilizar una serina, eliminar el carbonilo del aminoácido y eliminar la sulfonamida benefició a ambas dianas biológicas y los puntajes eran similares (**Figura 21g**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

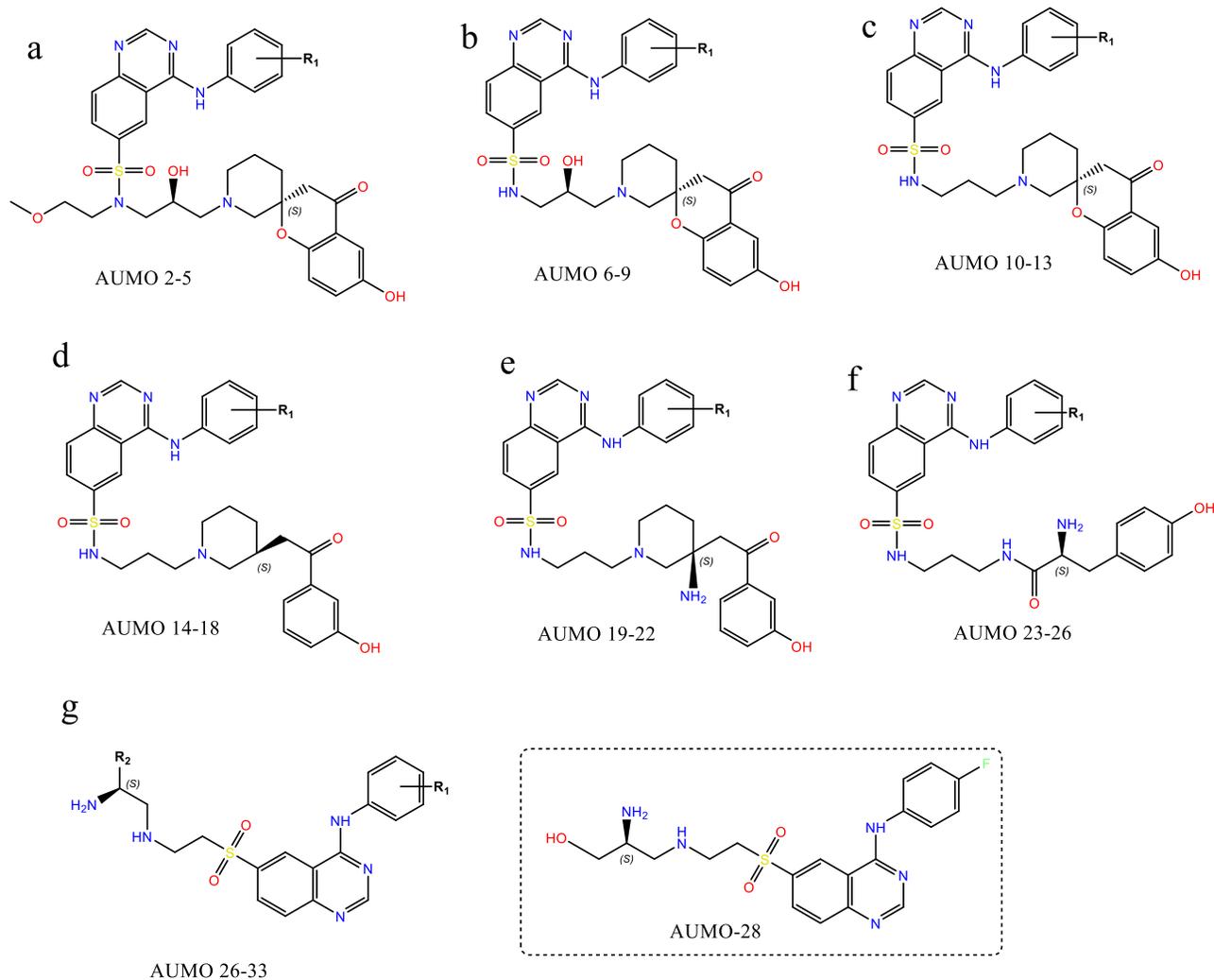


Figura 21. Evolución de la serie AUMO. R_1 = 4-F, 4- CF_3 , 3-Br, 3-Cl; R_2 cadena lateral de treonina y serina.

La molécula elegida como posible candidato a ser evaluada se muestra en la **Figura 21 (AUMO-28)**. El modo de unión (**Figura 22c, d**) tanto para AKT2 y EGFR fue muy similar pues la quinazolina se internalizó en la bolsa de adenina y la sulfona que se encuentra en la posición 6 de la quinazolina, debido a su geometría, permite que la cadena construida de aminoácido se coloque en la zona donde se une de manera natural a la ribosa del ATP³¹. Además, las interacciones clave para EGFR y AKT2 se encontraron presentes en ambos acoplamientos además de existir distintas interacciones que, *a priori*, permiten que la molécula se estabilice.

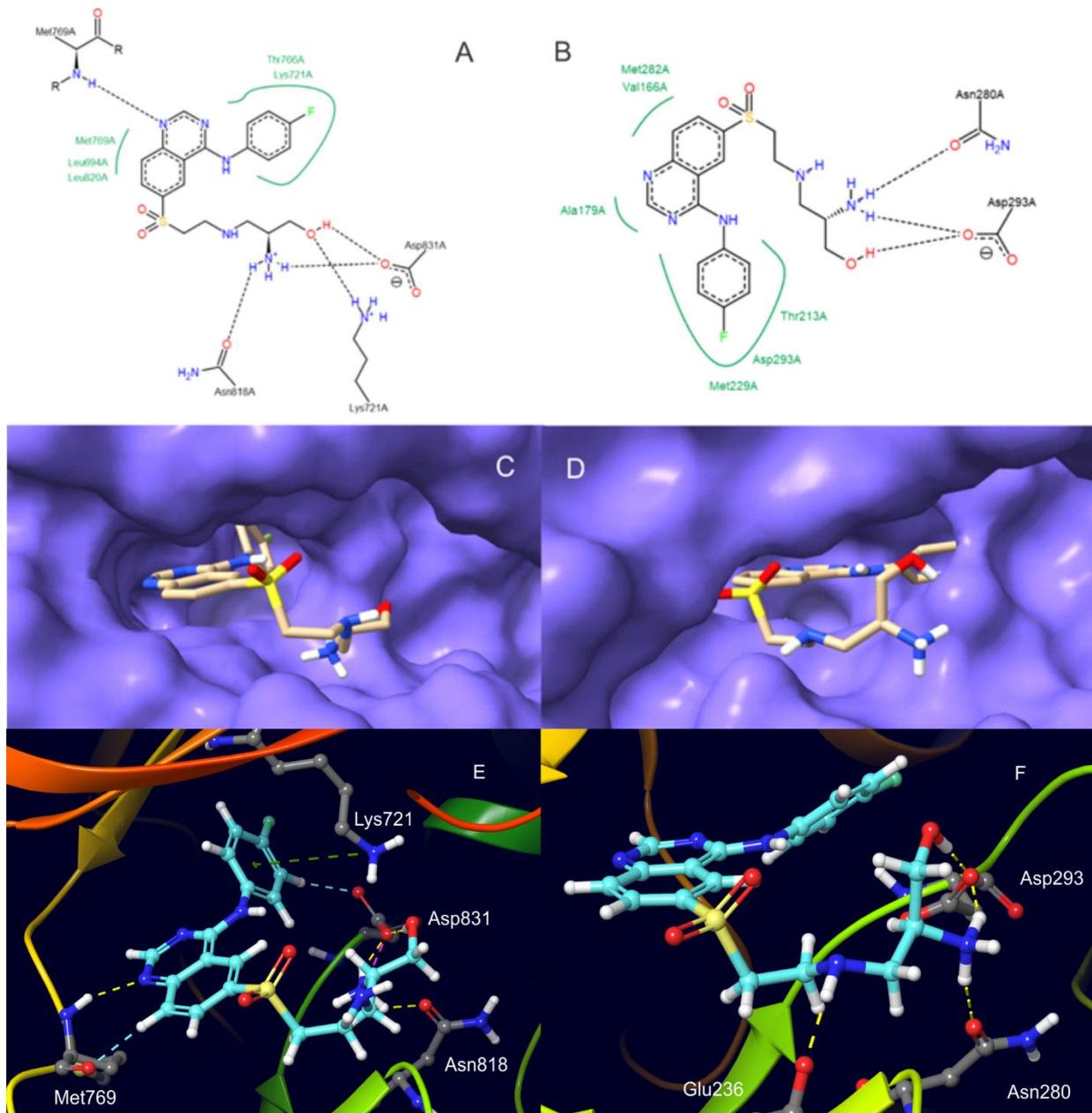


Figura 22. Modos de unión de AUMO-28 en EGFR y AKT2. A y B: Diagrama en dos dimensiones de interacciones; C y D: Internalización en los sitios catalíticos; E y F: Poses en tres dimensiones.

Para EGFR se observó la interacción tipo puente de hidrógeno entre el hidrógeno de la amida de Met769 y el nitrógeno en la posición 1 de la quinazolina; la amina protonada interactúa con el carboxilato de Asp831 formando puentes salinos y el oxígeno de la cadena lateral de Asn818 que forma interacciones ion-dipolo. Además, el hidroxilo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

terminal de **AUMO-28** interaccionó formando un puente de hidrógeno con el carboxilato de Asp831 y una interacción ion-dipolo con la cadena lateral de Lys721. Se observaron contactos hidrofóbicos entre la anilina de **AUMO-28** y Lys721 y Thr766 los cuales se encuentran en la zona hidrofóbica II de la cinasa. La anilina también formó una interacción tipo π -catión que se puede observar en la **Figura 22e**.

En cuanto a AKT2, se observó la interacción de tipo puente salino con Asp293 y la amina protonada así como con el hidrógeno del hidroxilo terminal. Se generó una interacción tipo ion-dipolo entre el oxígeno carbonílico de la cadena lateral de Asn289 y la amina protonada. Además, existen contactos hidrofóbicos con Met282, Val166, Ala179, Thr231, Asp293 y Met 229.

El modo de unión observado permitió realizar algunos comentarios muy interesantes. Como ya se mencionó anteriormente, de manera general, las proteínas cinasas realizan la transferencia del grupo fosfato y del ATP a grupos hidroxilos provenientes de tirosinas (para el caso de EGFR), serinas o treoninas (para el caso de AKT2).

Diversos estudios han demostrado que las cinasas utilizan el catión magnesio para realizar la catálisis; las interacciones iónicas generadas entre los residuos de aminoácidos y el grupo fosfato y pueden estabilizar al ATP^{80,81}. Esto se pudo observar en la proteína cristalizada con la cual se realizaron los acoplamientos moleculares en EGFR pues fue co-cristalizada con un mimético de ATP (ácido fosfoaminofosfónico-éster adenilato, AMP-ANP) y catión magnesio.

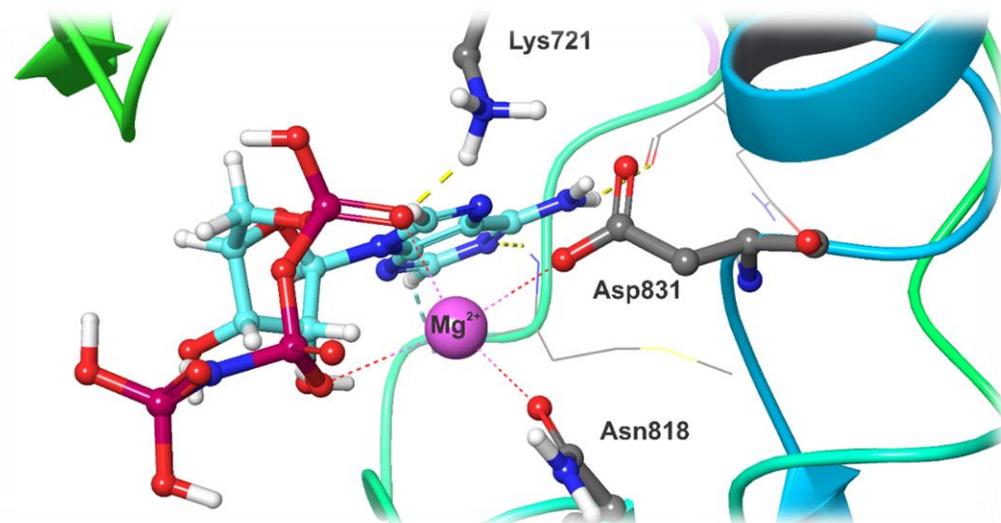


Figura 23. Modo de interacción de magnesio con ATP y EGFR. El magnesio forma un quelato con los oxígenos de los fosfatos y los oxígenos de Asp831 y Asn818.

En la **Figura 23** se puede observar que el magnesio interactúa con los fosfatos y genera un puente con algunos residuos de aminoácidos como lo son Asp831 y Asn 818, además, la Lys721 genera interacciones que estabilizan al fosfato . Debido a que AKT2 (hasta la fecha de escritura de este trabajo), no ha sido co-cristalizada con un mimético de ATP y magnesio, no es posible verificar de manera visual qué aminoácidos son los responsables de interactuar con el magnesio y la estabilización de ATP.

Sin embargo, recordando que las cinasas presentan dominios muy conservados, es probable que los aminoácidos involucrados sean de la misma naturaleza y encuentren a la misma distancia; en ese sentido, AKT2 podría generar las interacciones con Asp293 o Asn280 (**Figura 24**).

Es por ello que la interacción determinada con anterioridad mediante PLIFS, Asp293, cobra sentido pues este Asp presuntamente se involucra en el reconocimiento de ATP y catálisis de esta enzima.



Figura 24. Posible posicionamiento del magnesio en AKT2. Las interacciones generadas posibles ocurrirían con Asp293 y Asn280

Es importante notar que **AUMO-28**, además de interactuar con distintos aminoácidos o internalizarse en bolsas hidrofóbicas, la interacción generada a partir de la amina protonada puede ser determinante para su actividad biológica. La **Figura 25** muestra la superposición del acoplamiento molecular de **AUMO-28** en EGFR y el magnesio que se encuentra en el cristal de la proteína.

Se puede observar de manera clara que la amina primaria se encuentra prácticamente en el mismo sitio que el magnesio y, como ya se describió anteriormente, **AUMO-28** genera interacciones con Asp831 y Asn818 que, *a priori*, podrían competir por el lugar del magnesio. Para AKT2, las interacciones generadas con Asp293 y Asn280 generarían la misma competencia por el magnesio.

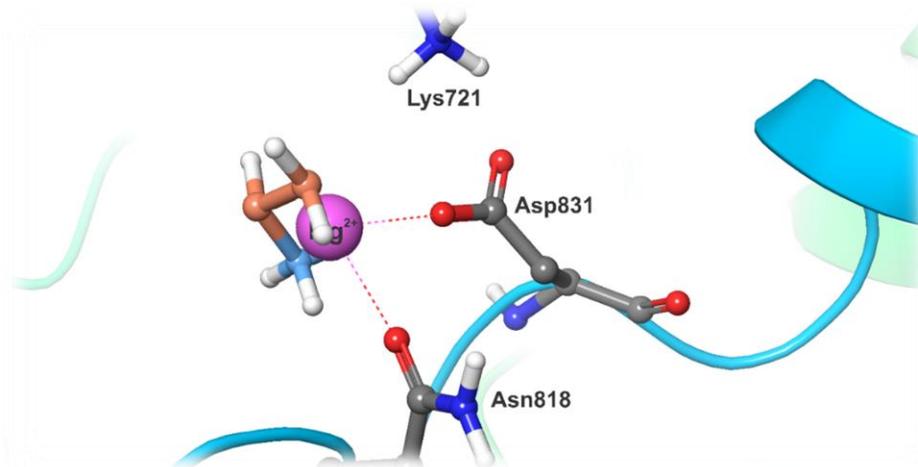


Figura 25. Posicionamiento de amina protonada de AUMO-28 y magnesio en EGFR. Se muestra un fragmento de AUMO-28, en azul claro se muestra el nitrógeno protonado el cual se localiza en el mismo sitio que el magnesio al estabilizar al ATP.

Debido a la gran importancia que involucra la amina primaria, fue necesario determinar qué porcentaje de **AUMO-28** se encontraría en el estado de protonación (HB^+) a pH 7.4. Para ello se realizó la predicción de las constantes de acidez (pK_a) en agua.

De acuerdo con la **Figura 26**, se pudo observar que, a pH fisiológico, el único equilibrio involucrado es la protonación de la amina primaria pues el resto de posibles protonaciones es prácticamente inexistente debido al bajo pK_a que presentan.

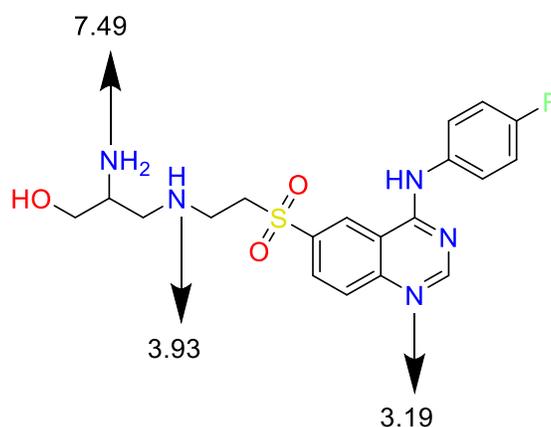


Figura 26. Constantes de acidez predichas. Lo valores mostrados se predijeron con el paquete Protonation que ofrece *ChemAxom*⁸².

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la **ecuación 1**, la cual se deriva de un sistema de ecuaciones entre la ecuación de Henderson-Hasselbach (**ecuación 2**) y un balance de materia (**ecuación 3**), es posible determinar el porcentaje de especie que se encontrará protonada. De esta manera se determinó que la especie protonada de **AUMO-28** se encontrará en un 54% presente.

$$\%[\text{HB}]^+ = \frac{100}{1+10^{\text{pH}-\text{pKa}}} \quad (\text{ecuación 1})$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{HB}]^+} \quad (\text{ecuación 2})$$

$$100 = [\text{HB}]^+ + [\text{B}] \quad (\text{ecuación 3})$$

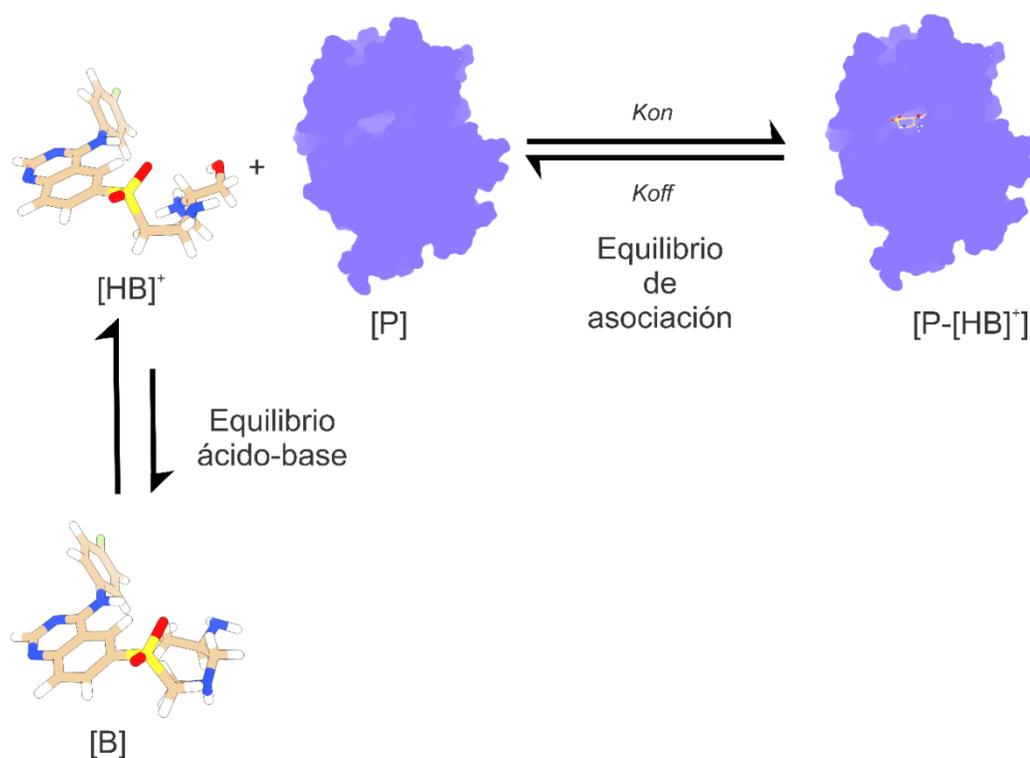


Figura 27. Equilibrios simultáneos planteados para AUMO-28. AUMO-28 protonado (HB^+) se une a las dianas biológicas $[\text{P}]$ mediante constantes de asociación. El equilibrio ácido-base de AUMO-28 se desplaza hacia la especie protonada.

El porcentaje restante que no se encuentra protonado podría unirse o no con las cinasas, sin embargo, si se plantea que la formación del complejo proteína-ligando de **AUMO-28** con las dianas biológicas es un proceso reversible con una constante de afinidad asociada, el modelo se convierte en un proceso de equilibrios parásitos. Ya que la especie protonada es más afin a las dianas biológicas (acuerdo con el puntaje de acoplamiento molecular), la concentración de especie protonada disminuirá lo que provocará que el equilibrio ácido-base de protonación se desplace hacia producción de HB^+ (**Figura 26**).

Lo anterior planteado es muy interesante pues si se determinan experimentalmente las constantes de afinidad por las dianas biológicas y los pKa de **AUMO-28** libre se podría determinar mediante un modelo condicional con base en polinomios reducidos la constante de acidez condicional con respecto a la formación del complejo proteína-ligando ⁸³.

7.2.5. Validación de acoplamiento molecular y estudio consenso de modo de unión

De igual forma que la serie **CUMO**, se validó el protocolo de acoplamiento mediante el re-acoplamiento molecular del ligando co-cristalizado en AKT2 y se observó un RMSD de 0.8059 considerado válido.

Además, para poder determinar que el modo de unión de **AUMO-28** encontrado en Glide XP tanto para EGFR como AKT2 eran los más favorables, se procedió a evaluar con distintos programas de acoplamiento molecular. Para ambos casos se observó que los mejores puntajes o poblaciones mayoritarias presentaron modos de unión similares de tal forma que el RMSD con respecto al acoplamiento en GlideXP fue menor a 2.0 Å (**Tabla 7**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7. RMSD y puntajes con distintos programas de acoplamiento molecular

Programa	RMSD*		Puntaje	
	EGFR (Å)	AKT2 (Å)	(Kcal/mol) EGFR	(Kcal/mol) AKT2
Glide XP	-----	-----	-9.730	-9.528
SwissDock	0.965	0.845	-9.350	-9.240
LeDock	0.441	0.819	-9.689	-10.124
Autodock Vina	0.506	0.523	-9.810	-9.410

*El RMSD calculado es con respecto a las posiciones generadas en Glide XP

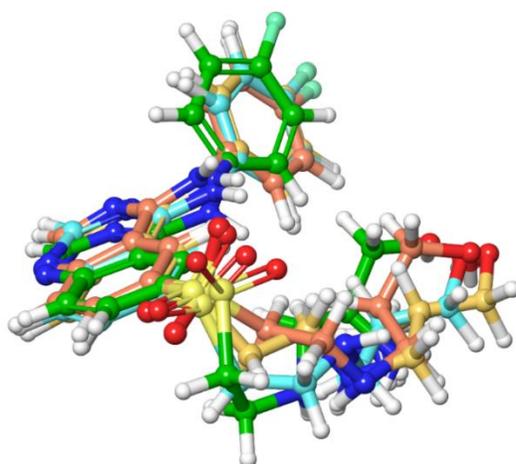


Figura 28. Alineamiento de acoplamientos moleculares de AUMO-28 en EGFR. Verde acoplamiento en GlideXP; azul acoplamiento en LeDock; amarillo acoplamiento en SwissDock; rosa acoplamiento en Autodock Vina.

El alineamiento de los modos de unión en EGFR se muestra en la **Figura 28**. Se observó que la quinazolina se colocó prácticamente igual en todos los acoplamientos así como la anilina en la posición 4 que muestra ligeras variaciones en la zona hidrofóbica II. En cuanto a la cadena terminal, las variaciones fueron mayores en lo que respecta metilenos entre la sulfona y la amina secundaria así como los dos metilenos provenientes de la serina, esto es determinante para los valores mayores de RMSD. Sin embargo, la sulfona, la amina protonada y el hidroxilo terminal se encontraron prácticamente en la misma posición en todos los acoplamientos.

En cuanto a los acoplamientos en AKT2 (**Figura 29**), ocurrió de manera similar que en EGFR pues la quinazolina y la anilina se encontraron prácticamente en la misma posición, así como la sulfona, los metilenos y la amina secundaria. Se observaron cambios sustanciales en la zona terminal del ligando pues el acoplamiento en GlideXP, SwissDock y LeDock mostraron el hidroxilo terminal orientado hacia arriba mientras que el acoplamiento en Autodock Vina se observó aproximadamente 180° rotado.

Esto pudo sugerir dos modos de unión distintos, ya sea al momento de formar el complejo proteína-ligando o bien que ocurriese un cambio conformacional una vez formado el complejo que, finalmente, de acuerdo con los puntajes de acoplamiento ambos modos de unión son favorables. Lo anterior se comprobó mediante una dinámica molecular.

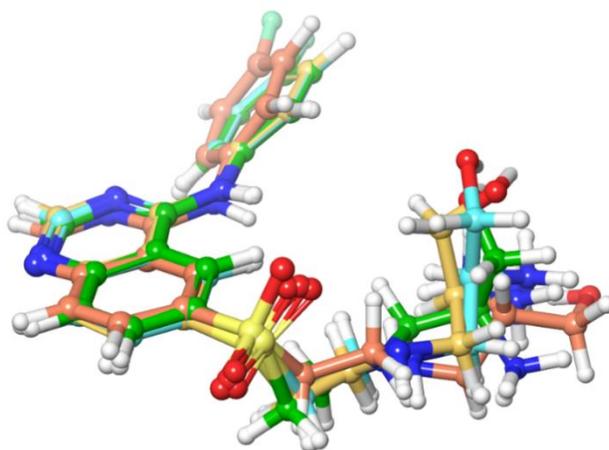


Figura 29. Alineamiento de acoplamientos moleculares de AUMO-28 en AKT2. Verde acoplamiento en GlideXP; azul acoplamiento en LeDock; amarillo acoplamiento en SwissDock; rosa acoplamiento en Autodock Vina.

7.2.6. Dinámica molecular

El complejo proteína-ligando generado a partir de GlideXP se estudió durante un periodo de 3 ns. La dinámica realizada permitió contrastar los resultados de acoplamiento molecular y obtener mayor información acerca del modo de unión de **AUMO-28**. Esta dinámica se consideró válida pues el RMSD de la cadena principal de la proteína fue menor a 5.0 Å⁸⁴.

7.2.6.1. AUMO-28 en EGFR

El valor de RMSD (**Gráfico 17**, azul) de la proteína con respecto a la cadena principal muestra que, alrededor de los 1.7 ns, comenzó a estabilizarse pues dicho valor de RMSD ya no aumentó y comenzó una tendencia de meseta. Lo anterior pudo apoyarse en el valor de RMSD del ligando con respecto a sí mismo. Se pudo observar, de manera inicial, que no existieron cambios bruscos además de encontrarse en valores muy bajos lo que indicó que **AUMO-28** se encontraba estable; además, de igual forma que con la proteína, cerca de los 1.7 ns, el valor de RMSD comenzó a disminuir de manera muy sutil lo que es indicativo de la formación de un complejo proteína aún más estable.

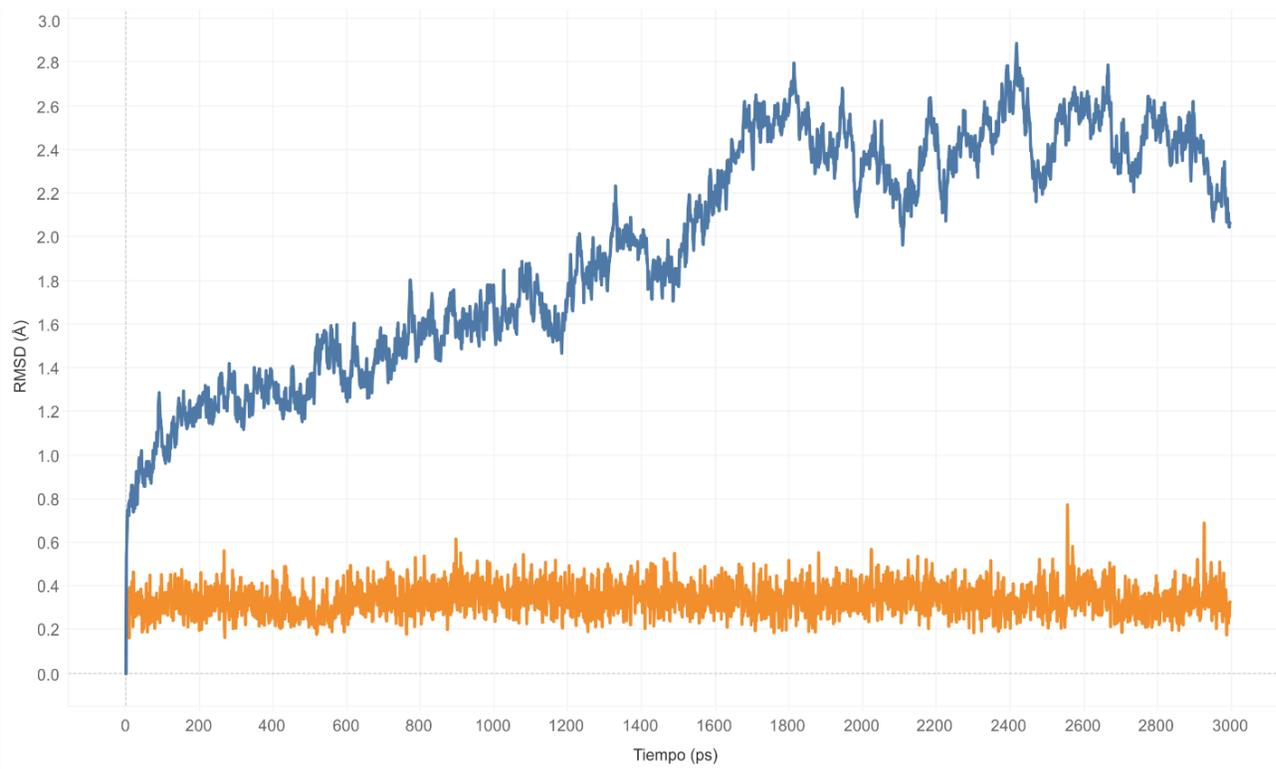


Gráfico 17. RMSD de EGFR y AUMO-28 en la dinámica molecular sobre EGFR. Se muestra en azul el RMSD de la cadena principal de EGFR y en naranja el RMSD de AUMO-28 con respecto a su posición inicial.

La estabilidad del complejo se pudo explicar mediante las interacciones generadas a lo largo de los 3 ns. En primera instancia, **AUMO-28** se mantuvo en el sitio de unión gracias a las interacciones iónicas y puentes de hidrógeno con Asp831 y Asn813 y a las

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

interacciones hidrofóbicas con Ala719 y Leu820 las cuales ocurrieron durante toda la simulación (**Gráfico 18A, B**). Es importante notar que la interacción clave con Met769 se perdió alrededor de los 0.6 ns, lo que se relacionó con el ligero aumento del RMSD (**Gráfico 17**, naranja) en el ligando. Si bien, la interacción con Met769 existió mediante un puente con agua (**Gráfico 18B**), la fuerza de interacción no es la misma.

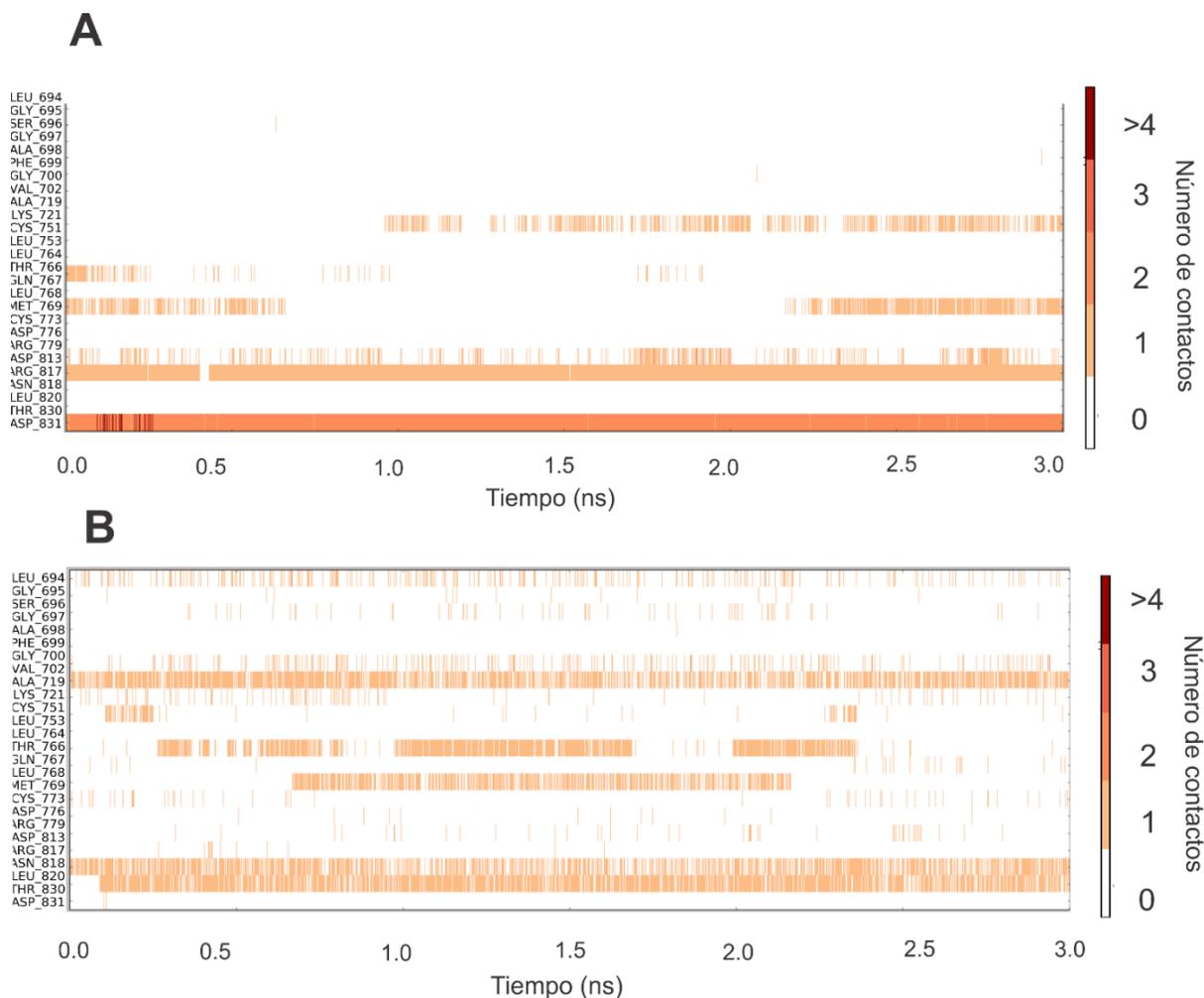


Gráfico 18. Contactos generados a lo largo de la simulación en EGFR. A): Interacciones iónicas y puentes de hidrógeno a lo largo de la simulación; **B):** interacciones hidrofóbicas y puentes de agua a lo largo de la simulación.

La estabilidad del complejo se comenzó a generar finalmente, como ya se mencionó, a los 1.7 segundos pues fue claramente influenciada gracias a dos interacciones generadas. La primera de ellas fue la interacción tipo π -catión con la Lys721 (**Gráfico 18**

a) que comienza a ocurrir al primer nanosegundo y se establece mayor número de veces después de 1.5 ns; esta Lys se encuentra a un lado de la zona hidrofóbica II de la cinasa lo que provocó que el anillo aromático 4-fluoro sustituido se estabilizara y no permitiese la salida de **AUMO-28** del sitio de unión.

La segunda interacción fue la Met769 que volvió a generarse en los últimos 1.5 ns lo que dio pie a la estabilización final del complejo al observarse la meseta en el RDMS de la proteína y la ligera disminución del RMSD del ligando. Esto indicó, de manera clara, que la interacción con Met769 mediante puente de hidrógeno es sumamente importante para generar un complejo estable. El video complementario al análisis realizado se puede consultar en el siguiente enlace:

<https://www.youtube.com/watch?v=4jg5Dpel6Bq>

7.2.6.2. AUMO-28 en AKT2

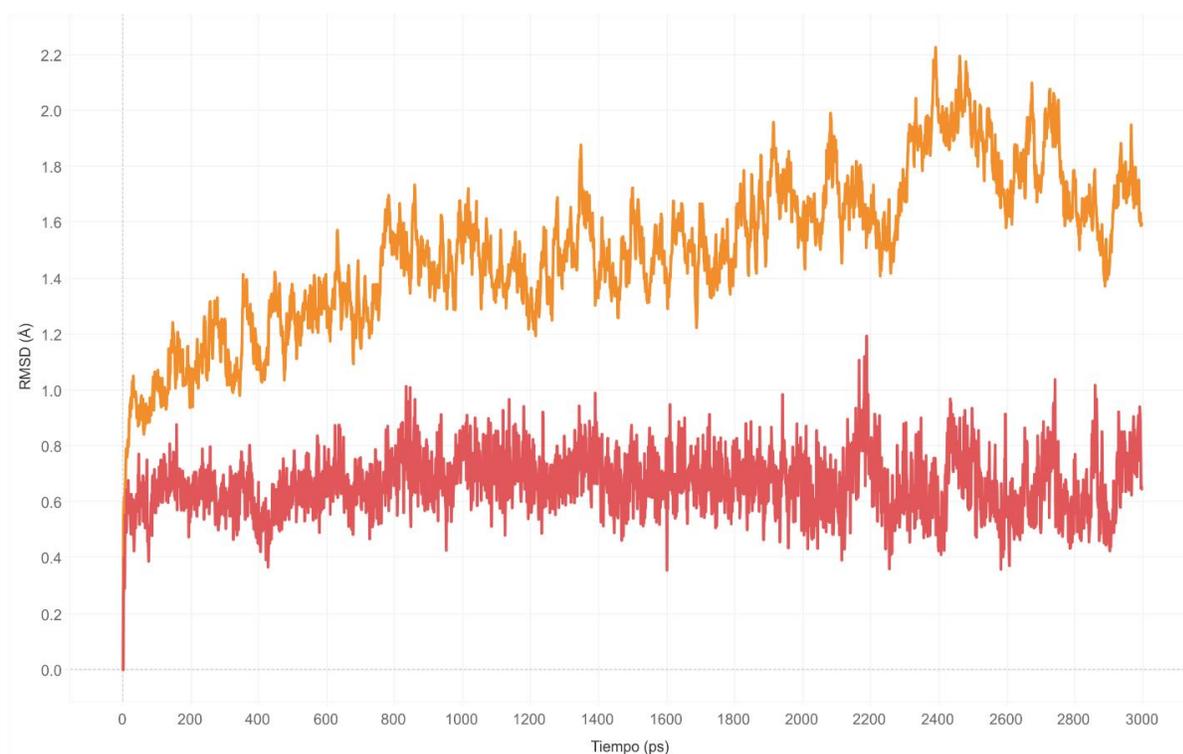


Gráfico 19. RMSD de AKT2 y AUMO-28 en la dinámica molecular sobre AKT2. Se muestra en naranja el RMSD de la cadena principal de EGFR y en rojo el RMSD de AUMO-28 con respecto a su posición inicial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el **Gráfico 19** se puede observar el RMSD de la cadena principal de AKT2, el cual presentó una meseta en el intervalo de 0.8 ns a 2.3 ns y un cambio sustancial con una meseta después de los 2.3 ns. Lo anterior se correlacionó con el RMSD del ligando, pues en 2.3 ns ocurrió un cambio considerable para regresar a un valor estable el resto de la simulación. Lo anterior pudo sugerir que **AUMO-28** muestra dos poses distintas dentro del sitio catalítico las cuales fueron estables.

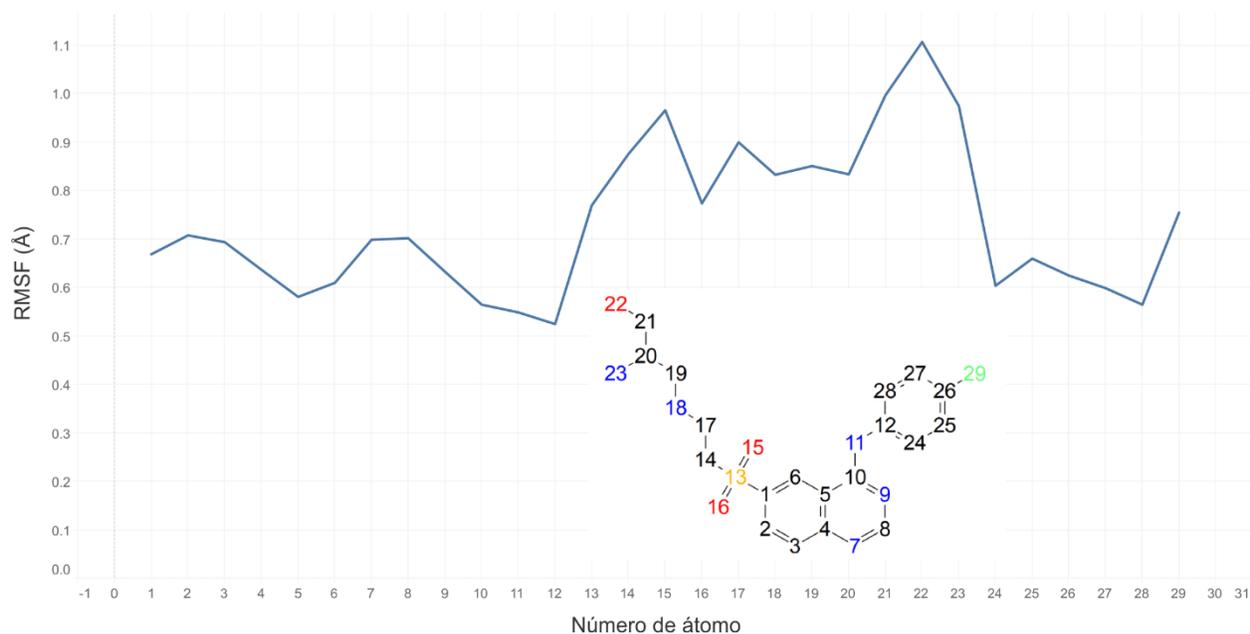


Gráfico 20. RMSF de AUMO-28 en AKT2. El átomo con mayor movilidad es el número 22 el cual corresponde al hidroxilo terminal

Lo anterior, se verificó mediante el análisis del RMSF. De acuerdo con el **Gráfico 20**, las variaciones más notables del RMSF se localizaron en los átomos 15 y 23 los cuales corresponden a un oxígeno de la sulfona y al hidroxilo terminal. Sin embargo, el átomo que más movilidad tuvo fue el hidroxilo.

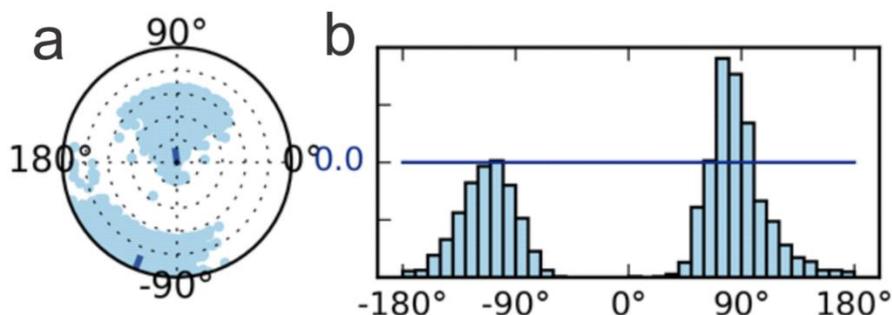


Gráfico 21. Torsión del enlace O-C. a: representación radial de la torsión de enlace a lo largo de la simulación. b: Representación de histograma del gráfico radial. El eje Y representa la energía potencial (en Kcal/mol) del enlace rotatable.

Para apoyar lo anterior mencionado, se procedió a analizar el ángulo de torsión del enlace O-C del hidroxilo terminal. Se pudo observar que, dentro de los primeros 2 ns, el ángulo del enlace O-C fue alrededor de 90° y, súbitamente, el enlace presentó un giro de 180° . De acuerdo con el **Gráfico 21b**, se observó que la distribución del ángulo en los primeros 2 ns fue principalmente 90° y después de ellos la tendencia indicó que el ángulo se encontrará alrededor de los 260° .

Los datos anteriores justificaron el cambio busco y posterior estabilización del RMSD de la proteína y del ligando en dos distintos modos de unión que, a priori son estables además de correlacionarse con el modo de unión predicho por Autodock Vina al momento de realizar el estudio consenso de modos de unión.

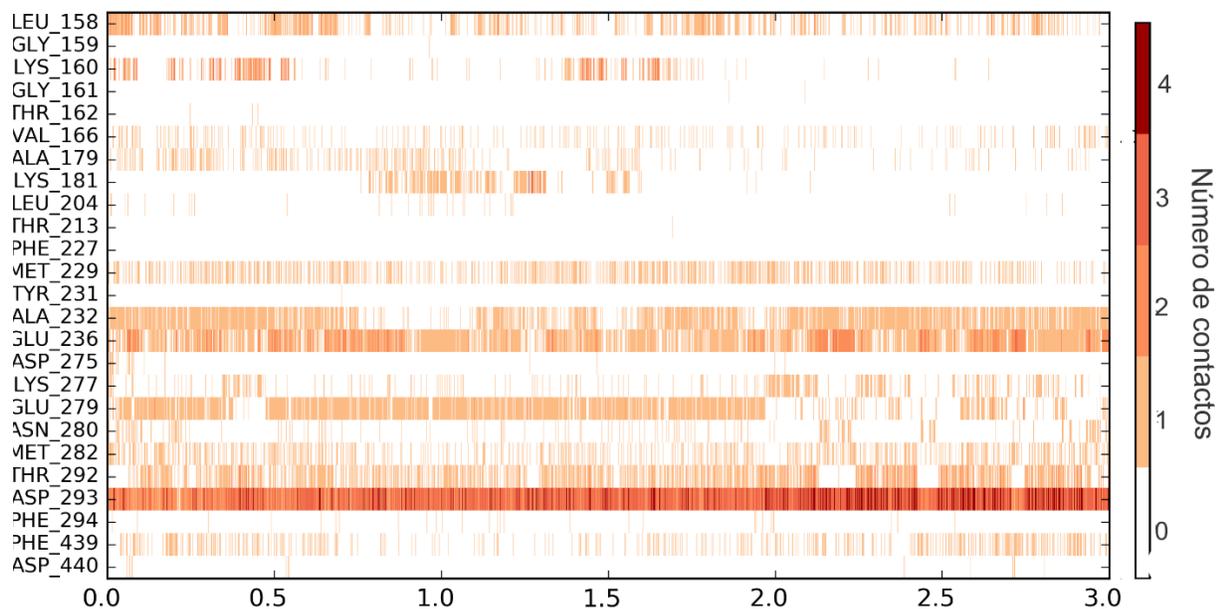


Gráfico 22. Contactos generados a lo largo de la simulación en AKT2. Se muestran interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, contactos hidrofóbicos y puentes con agua.

Es importante mencionar que la estabilización de ambos modos de unión se debe principalmente a los distintos puentes de hidrógeno generados, interacciones iónicas y contactos hidrofóbicos. El **Gráfico 22** muestra que la interacción con mayor número de contactos durante toda la simulación fue con Asp293 el cual es clave para presentar posible actividad biológica. Es importante notar que después de los 2 ns, el número de contactos aumentó con este aminoácido lo que sugiere que la segunda conformación del ligando puede ser aún más estable que la primera. Esto también se vio reflejado en dos interacciones más: Ala232 y Glu236.

Comenzando con Ala232, presentó 3 periodos distintos de interacciones. El primero de ellos fue al inicio de la simulación, en donde se pudo observar una gran cantidad de dichas interacciones que eventualmente se perdieron. El segundo se encontró entre 1.2 y 2 ns las cuales no fueron tan pobladas y continuas. El último se presentó después de los 2 ns (posterior al cambio conformacional del ligando), pues se observó un aumento en las interacciones con este aminoácido lo que se sumó a la estabilidad del complejo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por último, los contactos con el Glu236 aumentaron de manera considerable después del cambio conformacional lo que, de nuevo, aumentó la estabilidad del complejo. Algunas interacciones como Thr 292 aumentaron después de los 2 ns, pero no fueron tan evidentes como las interacciones anteriormente mencionadas. Un detalle por resaltar fue la pérdida de la interacción con la Glu279; esta interacción se trataba de un puente de agua con el hidroxilo terminal del ligando que, después del giro de 180° del hidroxilo, se perdió totalmente. El complemento del análisis realizado se puede encontrar en el video del siguiente enlace:

https://www.youtube.com/watch?v=k2BztX_VFqA

7.2.7. Aproximación de energías de interacción

Finalmente, una manera de estimar, de manera muy aproximada, la energía de interacción del sistema es mediante una suma de energías de interacción promedio de ligando y el resto del sistema tomando en cuenta las interacciones de corto alcance de Lennard-Jones, Coulomb y la forma libre del ligando (solvatada).

Para ello, se realizó el cálculo de las interacciones coulómbicas y Lennard-Jones entre la proteína, solvente, y solutos y el ligando. Como se puede observar en la **Tabla 8**, el comportamiento energético es muy similar para ambas dianas sin olvidar que la similitud no es estricta pues la dinámica no consideró la energía de solvatación⁸⁵⁻⁸⁸. A pesar de ello, las energías parecen relacionarse con los puntajes de acoplamiento molecular.

Tabla 8. Energía de interacción generadas a partir de las dinámicas moleculares

Energías (E_i)	Interacción Ligando-	EGFR (Kcal/mol)	AKT2 (Kcal/mol)
Coulómbicas	Proteína	-130.468	-132.892
	Solvente	-41.077	-36.177
	Soluto	-56.905	-43.463
Lennard-Jones	Proteína	28.550	30.508
	Solvente	-1.087	0.977

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	Soluto	-39.685	-47.001
interacción total	$EI = \sum E_i$	-240.673	-226.281
Acoplamiento molecular		-9.730	-9.528

Es importante notar que la energía en AKT2 fue menor debido a que gran parte de la dinámica la pose no fue la más favorable lo que podría aumentar la afinidad si la dinámica se continúa simulando más de 3ns.

7.2.8. Propiedades fisicoquímicas de la serie AUMO

En el **Gráfico 23** se puede observar cómo las propiedades fisicoquímicas de la serie **AUMO-28** fueron evolucionando para finalmente caer dentro de valores aceptables para una molécula *drug-like*. Una de las disminuciones más considerables fue la masa molar, pues de manera inicial las primeras series se encontraban por encima de los 600 g/mol y, conforme se fueron realizando las modificaciones, la masa molar disminuyó hasta los 400 g/mol. La tendencia de disminución del logP se observó aún más siendo las últimas series las que presentaron un logP cercano a 0; esto se debió principalmente a que las últimas moléculas tienen en su estructura una sulfona y cadenas laterales de aminoácidos que virtualmente podrían aumentar la solubilidad.

Uno de los problemas que más se observaron, como ya se mencionó, fue la disminución de la TPSA. Durante gran parte de la optimización se encontró por encima de 140.0 \AA^2 debido a la presencia de carbonilos y oxígenos; por ello, **AUMO-28** no presenta el carbonilo del aminoácido ya que, además de no influir en el modo de unión, permitió disminuir el TPSA apenas por debajo del límite de 140 \AA^2 . Cabe mencionar que la sulfona presente contribuye de manera notable sobre esta propiedad que, sin embargo, no es posible eliminar o cambiar pues, como ya fue explicado es indispensable para el modo de unión más favorable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a ER y DPH, dichas propiedades se mantuvieron estables. Es importante mencionar que para mantener un número adecuado de DPH la modificación de la sulfonamida que se encontraba presente en las moléculas **AUMO1-17** benefició la disminución de dicho parámetro. Finalmente, los APH, fueron disminuyendo gradualmente hasta encontrarse en los límites y, por ello, en **AUMO-28**, además de disminuir el TPSA, la eliminación del carbonilo del aminoácido permitió entrar en los límites de dicha propiedad.

El siguiente paso fue analizar el posicionamiento de **AUMO-28** en los espacios químicos de fármacos comerciales e inhibidores de cinasa. De acuerdo con la **Tabla 9**, se pudo observar, de igual manera que en la serie **CUMO**, que la representación bidimensional de componentes principales logró explicar más del 70% de las propiedades fisicoquímicas para el espacio químico de inhibidores de cinasa y más de 90% para el espacio químico de fármacos aprobados. Debido a esto el análisis pudo resultar útil para observar el comportamiento de **AUMO-28**.

Tabla 9. Valores de varianza del análisis de propiedades fisicoquímicas mediante componentes principales de espacios químicos

Componente principal	Varianza (%)	
	Fármacos aprobados	Inhibidores de cinasa
PC1	82.24	45.00
PC2	12.13	25.58

Al realizar la representación de los fármacos aprobados (**Gráfico 24**), se observó que **AUMO-28** forma parte de la zona donde más población de fármacos aprobados. Esto indicó que su comportamiento fisicoquímico es muy similar a los fármacos existentes, aumenta la probabilidad de presentar actividad biológica y ser candidato a convertirse en fármaco.

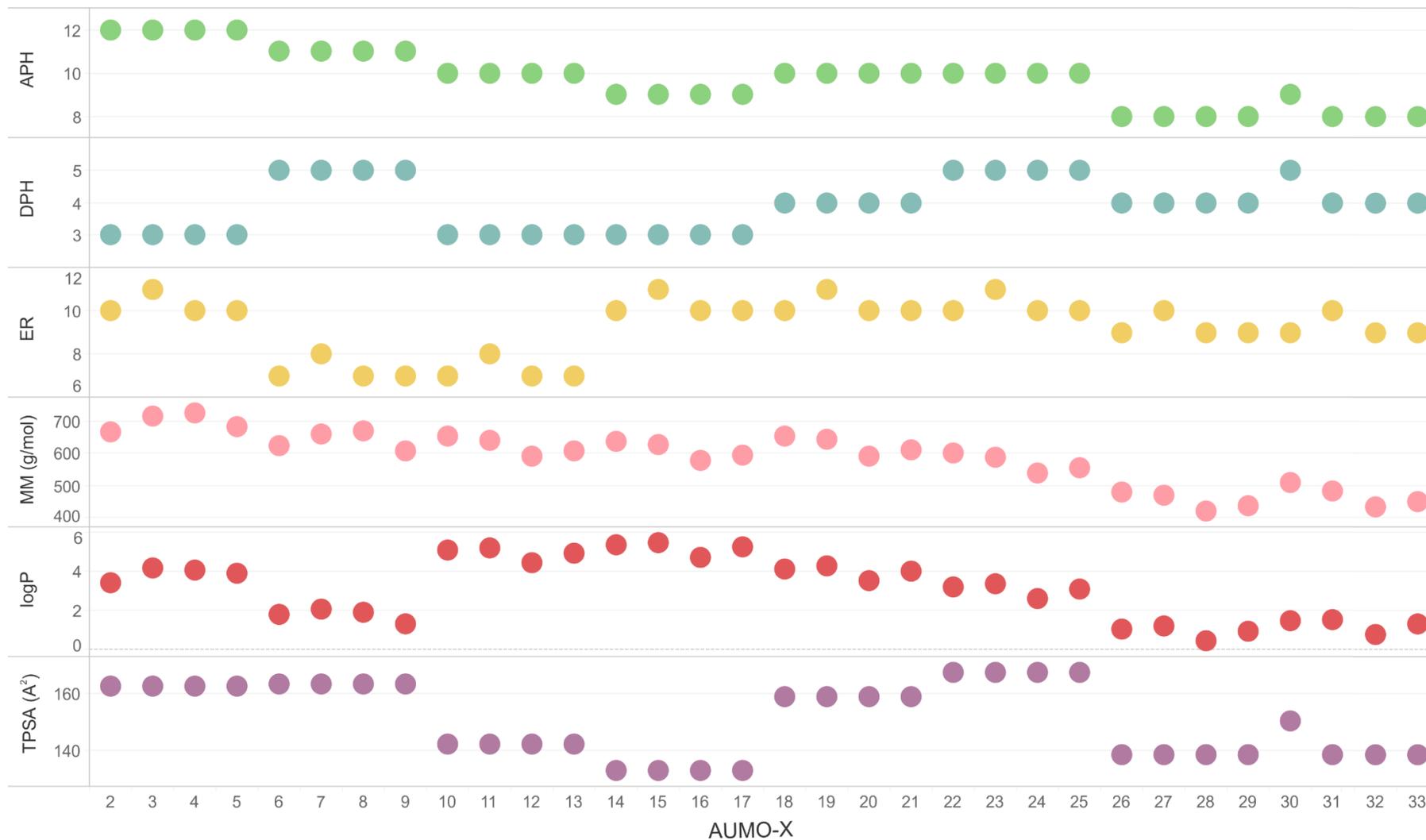


Gráfico 23. Propiedades fisicoquímicas de serie AUMO. APH: Aceptores de puente de hidrógeno; DPH: Donadores de puente de hidrógeno; ER: Enlaces rotables; MM: masa molar.

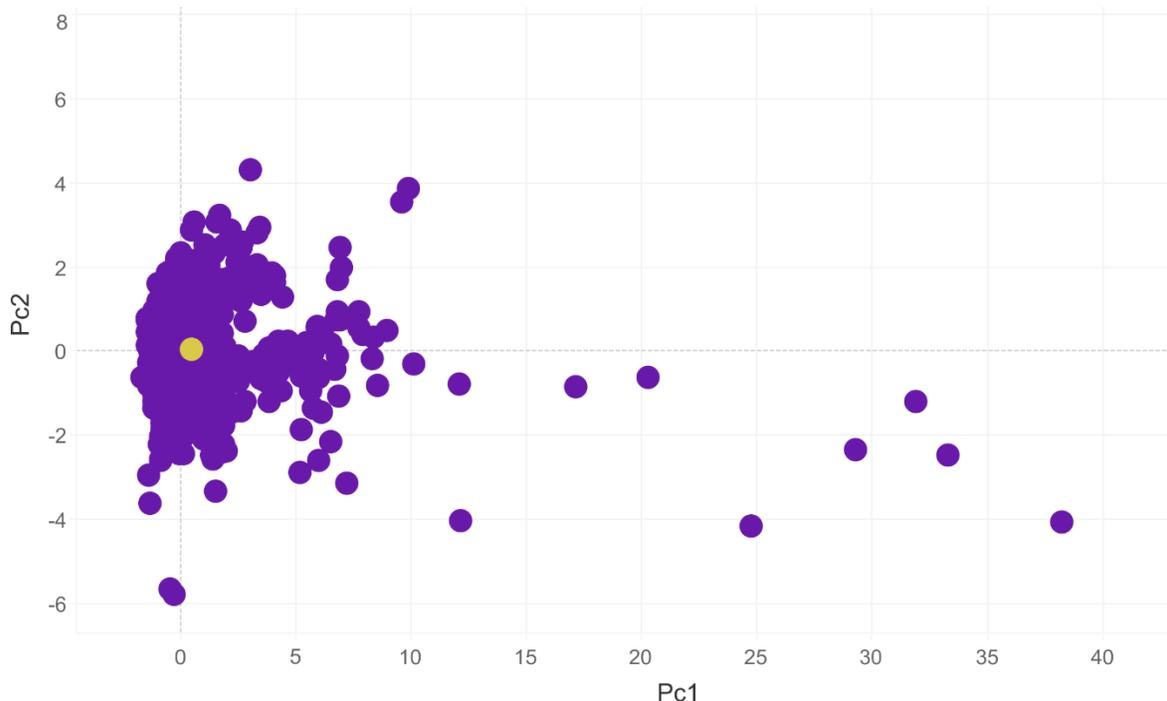


Gráfico 24. Representación bidimensional de propiedades fisicoquímicas de fármacos aprobados mediante componentes principales (pc1, pc2). El círculo amarillo indica la posición de AUMO.

El segundo análisis de espacio químico se muestra en el **Gráfico 25**. Similar a lo observado para **CUMO-13**, **AUMO-28** se localizó lejano a la zona más poblada de los inhibidores. Esto fue muy claro debido al bajo logP que tiene esta molécula; la mayoría de los inhibidores muestran este valor entre 2 y 5. Sin embargo también vale la pena mencionar que una gran parte de estas moléculas sobre pasan los 500 g/mol, algunos pocos no cumplen con los DPH o TPSA por lo que **AUMO-28** tiene mejores propiedades farmacéuticas en general.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

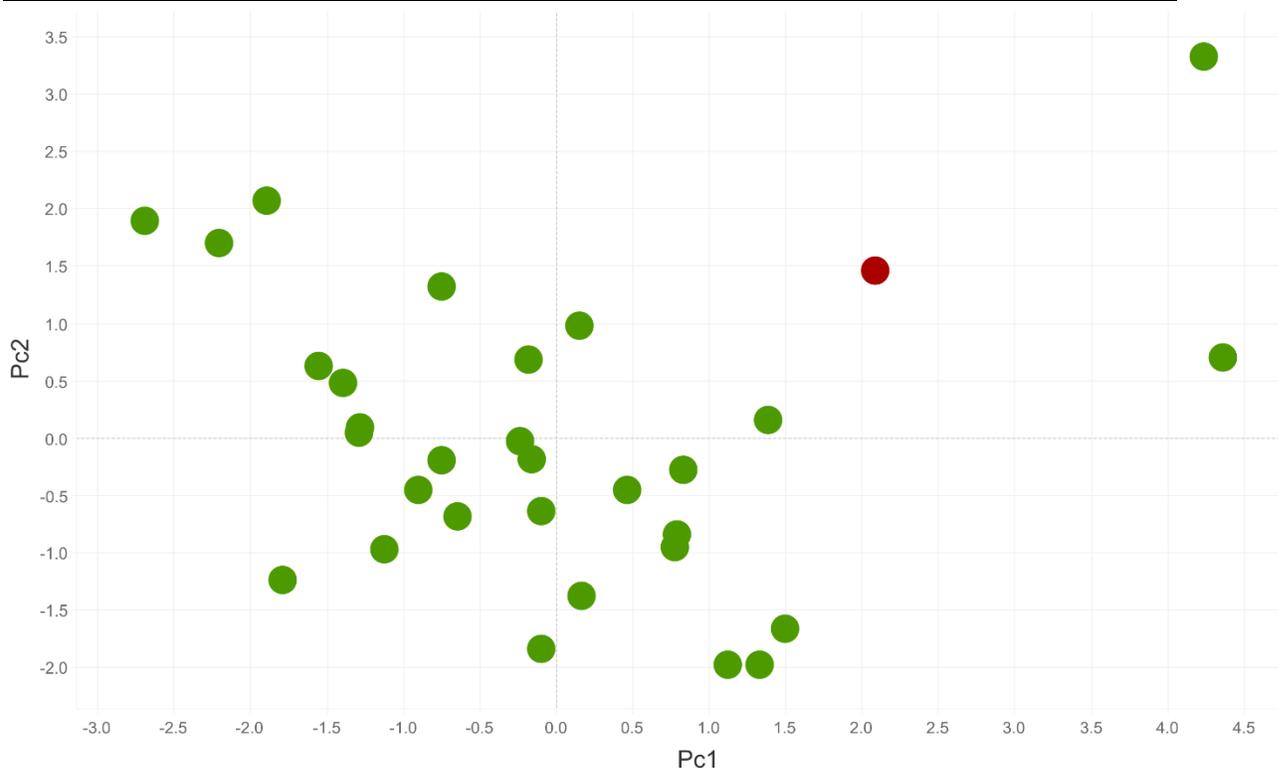


Gráfico 25. Representación bidimensional de propiedades fisicoquímicas de inhibidores de cinasas mediante componentes principales (pc1, pc2). El círculo anillo rojo muestra la posición de AUMO-30.

La comparación entre el *Hit* **AUMO-1** y **AUMO-28** (Tabla 10) muestra de manera clara la mejoría en las propiedades fisicoquímicas. **AUMO-28** cumplió en su totalidad con las reglas de *Lipinski* y *Veber* por lo que esta molécula se consideró entonces un candidato a fármaco.

Tabla 10. Comparación de las propiedades fisicoquímicas de AUMO-1 y AUMO-28

Molécula	MM (g/mol)	logP	DPH	APH	TPSA	ER
Hit AUMO-1	524.613	-2.181	3	11	152.22	8
AUMO-28	469.487	1.1838	4	8	138.61	10

8. CONCLUSIONES

El trabajo realizado permitió diseñar dos derivados de quinazolina como potenciales inhibidores duales en la vía de señalización de EGFR.

El primero, **CUMO-13**, se diseñó sobre EGFR y PARP1 basándose en el ligando natural NADH. En lo que respecta a PARP1, el modo de unión fue validado mediante acoplamiento consenso y dinámica molecular. Para el primer caso, los acoplamientos presentaron RMSD menores a 2 Å con respecto a sus poses. La dinámica molecular confirmó la validez del consenso demostrando la estabilidad del complejo proteína-ligando al ser expuesto a un ambiente simulado de condiciones reales. Las interacciones con Gly863 y Ser904, consideradas indispensables para presentar posible actividad biológica, ocurrieron durante toda la simulación y **CUMO-13** se estabilizó gracias a interacciones tipo π - π con Tyr889, Tyr896 y Tyr907.

Para EGFR, el modo de unión consenso presentó poses similares con RMSD menores a 2 Å. Sin embargo, la dinámica molecular reveló que el modo de unión predicho no fue el más estable pues la isoquinolinona salió del sitio de unión predicho provocando que **CUMO-13** perdiera interacciones clave como el puente de hidrógeno con Met769. A pesar de ello, **CUMO-13** se mantuvo dentro del sitio de unión gracias a las interacciones generadas entre la isoquinolinona y Arg817. Lo anterior se debió al poco volumen que representa el pirrol en la posición 4 de la quinazolina pues funge como pivote al poder moverse con más facilidad dentro de la zona hidrofóbica. Esto llevó a resaltar que realizar dinámica molecular puede ser indispensable para descartar falsos positivos.

Las propiedades fisicoquímicas de **CUMO-13** y la serie CUMO en general se mantuvieron dentro de los límites que considera *Lipinski* y se violó una regla de *Veber* que, a pesar de ello, se pudo considerar como candidato a fármaco. El posicionamiento de la molécula en el espacio químico de los fármacos comerciales demostró la similitud que ésta molécula posee y por lo tanto aumenta la posibilidad de presentar actividad biológica. En el espacio químico de inhibidores de cinasa, **CUMO-13** se localizó cercano a los fármacos comerciales y su posicionamiento se

CONCLUSIONES

debió al valor alto de TPSA que tiene la molécula que se debió principalmente a la sulfona presente en la molécula. En el espacio químico de inhibidores PARP1 no fue el suficientemente amplio para realizar un análisis adecuado pues no existen muchas moléculas comerciales cuya diana biológica sea PARP1.

La segunda molécula diseñada, **AUMO-28**, se diseñó a partir la obtención de interacciones clave más importantes en AKT2 mediante el uso de PLIFS las cuales fueron Asp293, Glu236 y Val 132 que permitieron encontrar un *Hit* computacional proveniente de un cribado virtual posterior.

Consecuentes modificaciones estructurales que permitieron encontrar a una molécula candidata a ser fármaco la cual presentó puntajes de acoplamiento similares en EGFR y AKT2. El modo de unión de **AUMO-28** se validó mediante acoplamiento consenso al presentar RMSD menores a 2 Å.

AUMO-28 puede competir por el sitio de unión del magnesio en las cinasas pues la amina primaria que se encuentra protonada a pH fisiológico se une a EGFR y AKT2 generando interacciones iónicas con residuos involucrados en el reconocimiento y estabilización del magnesio. Además, el estudio predictivo de constantes de acidez mostró que un 54% de **AUMO-28** se encuentra protonado exclusivamente en la amina primaria, debido a que la especie protonada es más afín a los receptores es posible un desplazamiento del equilibrio a la especie protonada.

La dinámica molecular de **AUMO-28** en EGFR permitió observar que dicho complejo proteína-ligando fue estable durante 3 ns. Además, permitió identificar que las interacciones de tipo puente de hidrógeno entre Met769 y el nitrógeno 1 de la quinazolina son claves para estabilizar el complejo pues durante la simulación se generó un puente de agua entre dicho aminoácido y el átomo de la quinazolina que alejó de manera considerable a la quinazolina de su posición original. Otras interacciones de tipo π -catión entre la Lys721 y el anillo tipo anilina de la quinazolina que aumentan la estabilidad del complejo además de que prácticamente en toda la simulación la interacción entre de la amina protonada y Asp831 y Asn818 ocurrieron.

En el caso de la dinámica molecular de AUMO-28 en AKT2, el estudio permitió observar 2 distintos modos de unión a lo largo de la simulación los cuales son

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

estables. Dichos modos de unión están determinados por el hidroxilo terminal del ligando que, en los primeros momentos de la simulación, forma un ángulo de 90° y, posteriormente, da un giro de 180°. El segundo modo de unión generado es más estable al presentar interacciones de tipo puente de hidrógeno con Ala232 y el nitrógeno 1 de la quinazolina el cual es equivalente a la Met769 en EGFR.

La estimación energética de los complejos AUMO-28-EGFR y AUMO-28-AKT2 mostró una afinidad durante la dinámica molecular muy similar siendo menor en AKT2 debido al modo de unión con el cual se inició la simulación.

Las propiedades fisicoquímicas de **AUMO-28** y la serie AUMO fueron difíciles de controlar. Durante gran parte del diseño de la molécula las propiedades rebasaron el límite de *Lipinski y Veber*. Sin embargo, debido a que **AUMO-28** cumplió con las reglas de *Lipinski y Veber* se pudo considerar en como un buen candidato a fármaco. Su posicionamiento en el espacio químico de los fármacos comerciales se encontró en la zona con mayor cantidad de fármacos. El posicionamiento dentro del espacio químico de los inhibidores de cinasas fue ligeramente alejado y principalmente se debió al valor alto de TPSA que es generado por la sulfona y el oxígeno terminal así como el valor de logP de la molécula.

Gracias a las técnicas computacionales y estudios predictivos, las moléculas **AUMO-28** y **CUMO-13** presentaron características favorables e interesantes que permiten ser candidatas a ser fármacos y ser evaluadas biológicamente.

9. PERSPECTIVAS

- Proponer una ruta de síntesis y sintetizar **AUMO-28** y **CUMO-13**.
- Demostrar que las moléculas diseñadas son inhibidores de las dianas biológicas utilizadas en este trabajo.
- Demostrar los modos de unión de **AUMO-28** y **CUMO-13** mediante cristalografía de proteínas.
- Determinar la afinidad de las moléculas por las dianas biológicas utilizadas en este trabajo.
- Realizar evaluaciones biológicas en líneas adecuadas para determinar su efecto antitumoral.

10. REFERENCIAS

1. Sneader, W. *Drug Discovery: A History. Drug Discovery: A History* (2006). doi:10.1002/0470015535
2. DeVita, V. T. & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research* (2008). doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6611
3. Hitchings, G. H. & Elion, G. B. THE CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF PURINE ANALOGS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **60**, 195–199 (1954).
4. Elion, G. B., Hitchings, G. H. & Vander, H. Antagonists of Nucleic Acid Derivatives. *J. Biol. Chem.* **192**, 505 (1951).
5. Heidelberger, C. Fluorinated Pyrimidines. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **4**, 1–50 (1965).
6. Goddard, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* (2018). doi:10.1002/pro.3235
7. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* (2002). doi:10.1016/S0092-8674(02)00741-9
8. Liu, Y. & Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature Chemical Biology* (2006). doi:10.1038/nchembio799
9. Traxler, P. & Furet, P. Strategies toward the Design of Novel and Selective Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. *Pharmacol. Ther.* (1999). doi:10.1016/S0163-7258(98)00044-8
10. Normanno, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* (2006). doi:10.1016/j.gene.2005.10.018
11. Hurvitz, S. & Mead, M. Triple-negative breast cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* (2015). doi:10.1097/GCO.0000000000000239
12. Schulze, W. X., Deng, L. & Mann, M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol.* (2005). doi:10.1038/msb4100012

13. Downward, J. *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* (1984). doi:10.1038/307521a0
 14. Hunter, T. & Hunter, T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. *Most* **117**, 2036 (2007).
 15. Morrison, W. B. Cancer Chemotherapy: An Annotated History. *Journal of Veterinary Internal Medicine* (2010). doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0590.x
 16. Roche-Lestienne, C. *et al.* Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* (2002). doi:10.1182/blood.V100.3.1014
 17. Giaccone, G. *et al.* Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J. Clin. Oncol.* (2004). doi:10.1200/JCO.2004.08.001
 18. Herbst, R. S. *et al.* Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J. Clin. Oncol.* (2004). doi:10.1200/JCO.2004.07.215
 19. López-Bergami, P. *et al.* RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol. Cell* (2005). doi:10.1016/j.molcel.2005.06.025
 20. Krause, D. S. & Van Etten, R. a. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* (2005). doi:10.1056/NEJMra044389
 21. Zhang, J., Yang, P. L. & Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* (2009). doi:10.1038/nrc2559
 22. Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* (2009). doi:10.1016/j.cell.2009.02.024
 23. Kamb, A. Mutation load, functional overlap, and synthetic lethality in the evolution and treatment of cancer. *J. Theor. Biol.* (2003). doi:10.1016/S0022-5193(03)00087-0
-

24. Yang, W. *et al.* Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): A resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* (2013). doi:10.1093/nar/gks1111
 25. Hartwell, L. H. Integrating Genetic Approaches into the Discovery of Anticancer Drugs. *Science (80-.).* (1997). doi:10.1126/science.278.5340.1064
 26. Guo, J., Liu, H. & Zheng, J. SynLethDB: Synthetic lethality database toward discovery of selective and sensitive anticancer drug targets. *Nucleic Acids Res.* (2016). doi:10.1093/nar/gkv1108
 27. Hoeijmakers, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* (2009). doi:10.1056/NEJMra0804615
 28. Dittmann, K. *et al.* Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M506591200
 29. Dittmann, K., Mayer, C. & Rodemann, H. P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. in *Radiotherapy and Oncology* (2005). doi:10.1016/j.radonc.2005.06.022
 30. Roos, W. P. & Kaina, B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters* (2013). doi:10.1016/j.canlet.2012.01.007
 31. Gonzalez, E. & McGraw, T. E. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* (2009). doi:10.4161/cc.8.16.9335
 32. Uhlen, M. *et al.* Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-.).* (2015). doi:10.1126/science.1260419
 33. Uhlen, M. *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science (80-.).* (2017). doi:10.1126/science.aan2507
 34. McCubrey, J. A. *et al.* Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv. Enzyme*
-

- Regul.* (2006). doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.004
35. Vasudevan, K. M. *et al.* AKT-Independent Signaling Downstream of Oncogenic PIK3CA Mutations in Human Cancer. *Cancer Cell* (2009). doi:10.1016/j.ccr.2009.04.012
 36. She, Q. B. *et al.* Breast tumor cells with P13K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* (2008). doi:10.1371/journal.pone.0003065
 37. Dong, Y., Li, A., Wang, J., Weber, J. D. & Michel, L. S. Synthetic lethality through combined notch-epidermal growth factor receptor pathway inhibition in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0173
 38. YI, Y. W. *et al.* Dual inhibition of EGFR and MET induces synthetic lethality in triple-negative breast cancer cells through downregulation of ribosomal protein S6. *Int. J. Oncol.* (2015). doi:10.3892/ijo.2015.2982
 39. Medina-Franco, J. L., Fernán-Dezde Gortari, E. & Jesús Naveja, J. Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educ. Quim.* (2015). doi:10.1016/j.eq.2015.05.002
 40. Milletti, F. & Vulpetti, A. Predicting polypharmacology by binding site similarity: From kinases to the protein universe. *J. Chem. Inf. Model.* (2010). doi:10.1021/ci1001263
 41. Peters, J. U. *Polypharmacology in Drug Discovery. Polypharmacology in Drug Discovery* (2012). doi:10.1002/9781118098141
 42. Tan, Z., Chaudhai, R. & Zhang, S. Polypharmacology in Drug Development: A Minireview of Current Technologies. *ChemMedChem* (2016). doi:10.1002/cmdc.201600067
 43. Ciceri, P. *et al.* Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology. *Nat. Chem. Biol.* (2014). doi:10.1038/nchembio.1471
 44. Reddy, A. S. & Zhang, S. Polypharmacology: Drug discovery for the future.
-

- Expert Review of Clinical Pharmacology* (2013). doi:10.1586/ecp.12.74
45. Schneider, P. & Schneider, G. Privileged Structures Revisited. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2017). doi:10.1002/anie.201702816
46. Samira, I., Patel, S., Hasmin, M. & Patel, S. Biological Profile of Quinazoline. *Int. J. Pharm. Chem. Sci.* (2012).
47. Ghorab, M. M., Ismail, Z. H., Radwan, A. A. & Abdalla, M. Synthesis and pharmacophore modeling of novel quinazolines bearing a biologically active sulfonamide moiety. *Acta Pharm.* (2013). doi:10.2478/acph-2013-0006
48. Smits, R. A. *et al.* Synthesis and QSAR of Quinazoline Sulfonamides As Highly Potent Human Histamine H4 Receptor Inverse Agonists. *J. Med. Chem.* (2010). doi:10.1021/jm901379s
49. Kikuchi, H. *et al.* Exploration of a new type of antimalarial compounds based on febrifugine. *J. Med. Chem.* (2006). doi:10.1021/jm0601809
50. Giri, R. S. *et al.* Design, synthesis and characterization of novel 2-(2,4-disubstituted-thiazole-5-yl)-3-aryl-3H-quinazoline-4-one derivatives as inhibitors of NF-kappaB and AP-1 mediated transcription activation and as potential anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* (2009). doi:10.1016/j.ejmech.2008.10.031
51. Rosell, R. *et al.* Adaptive resistance to targeted therapies in cancer. *Transl. lung cancer Res.* (2013). doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2012.12.08
52. Friesner, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* (2004). doi:10.1021/jm0306430
53. Berman, H. M. *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* (2000). doi:10.1093/nar/28.1.235
54. Schrödinger Release 2017-1 Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY. (2017).
-

55. Stortz, C. A., Johnson, G. P., French, A. D. & Csonka, G. I. Comparison of different force fields for the study of disaccharides. *Carbohydr. Res.* (2009). doi:10.1016/j.carres.2009.08.019
 56. Schrödinger, LLC, New York, N. LigPrep, version 2.5. *Suite 2012* (2012).
 57. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. & Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* (1996). doi:10.1021/ja9621760
 58. Jain, A. N. Bias, reporting, and sharing: Computational evaluations of docking methods. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* (2008). doi:10.1007/s10822-007-9151-x
 59. Cole, J. C., Murray, C. W., Nissink, J. W. M., Taylor, R. D. & Taylor, R. Comparing protein-ligand docking programs is difficult. *Proteins: Structure, Function and Genetics* (2005). doi:10.1002/prot.20497
 60. Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* (2011). doi:10.1093/nar/gkr366
 61. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina. *J. Comput. Chem.* (2010). doi:10.1002/jcc.21334
 62. Wang, Z. *et al.* Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2016). doi:10.1039/c6cp01555g
 63. Schrödinger. Schrödinger Release 2018-1. *Maestro-Desmond Interoperability Tools, Desmond Molecular Dynamics System* (2018).
 64. Tableau. Visual Analysis Best Practices. *Tableau Softw.* (2014).
 65. Adobe. Adobe Premiere Pro. (2018).
 66. Google. YouTube. 2005 (2018). Available at: <https://www.youtube.com>.
-

67. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* (2004). doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007
 68. Sander, T., Freyss, J., Von Korff, M. & Rufener, C. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J. Chem. Inf. Model.* (2015). doi:10.1021/ci500588j
 69. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* (2018). doi:10.1093/nar/gkx1037
 70. Gaulton, A. *et al.* The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1074
 71. ChemicalComputingGroupInc. Molecular Operating Environment (MOE). *Sci. Comput. Instrum.* (2004). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 72. Marcou, G. & Rognan, D. Optimizing fragment and scaffold docking by use of molecular interaction fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* (2007). doi:10.1021/ci600342e
 73. Deng, Z., Chuaqui, C. & Singh, J. Structural Interaction Fingerprint (SIFt): A Novel Method for Analyzing Three-Dimensional Protein-Ligand Binding Interactions. *J. Med. Chem.* (2004). doi:10.1021/jm030331x
 74. Mpamhanga, C. P., Chen, B., McLay, I. M. & Willett, P. Knowledge-based interaction fingerprint scoring: A simple method for improving the effectiveness of fast scoring functions. in *Journal of Chemical Information and Modeling* (2006). doi:10.1021/ci050420d
 75. Perez-Nueno, V. I., Rabal, O., Borrell, J. I. & Teixido, J. APIF: A new interaction fingerprint based on atom pairs and Its application to virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* (2009). doi:10.1021/ci900043r
 76. Jagtap, P. & Szabó, C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2005). doi:10.1038/nrd1718
 77. Stierand, K. & Rarey, M. Drawing the PDB: Protein-ligand complexes in two
-

- dimensions. *ACS Med. Chem. Lett.* (2010). doi:10.1021/ml100164p
78. Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M. & Medina-Franco, J. L. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* (2018). doi:10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143
79. Abdi, H. & Williams, L. J. Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* (2010). doi:10.1002/wics.101
80. Jacobsen, D. M., Bao, Z. Q., Obrien, P., Brooks, C. L. & Young, M. A. Price to be paid for two-metal catalysis: Magnesium ions that accelerate chemistry unavoidably limit product release from a protein kinase. *J. Am. Chem. Soc.* (2012). doi:10.1021/ja304419t
81. Yu, L. *et al.* Role of Mg²⁺ ions in protein kinase phosphorylation: insights from molecular dynamics simulations of ATP-kinase complexes. *Mol. Simul.* (2011). doi:10.1080/08927022.2011.561430
82. Szegezdi, J. & Csizmadia, F. Prediction of dissociation constants using microconstants. in *American Chemical Society National Meeting* (2004).
83. Baeza R., A. Constante de complejación, pKd' a pH impuesto. 1 (2009). Available at: http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/DOCUMENTO_APOY_pL_pH_pL_2011_I_21254.pdf. (Accessed: 17th October 2018)
84. Sargsyan, K., Grauffel, C. & Lim, C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* (2017). doi:10.1021/acs.jctc.7b00028
85. Hansson, T., Marelus, J. & Åqvist, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* (1998). doi:10.1023/A:1007930623000
86. Samaraweera, M. A. On the use of the Linear Interaction Energy Method to predict affinities of charged aromatic amines to naturally occurring clay
-

- minerals. (University of Connecticut-Storrs, 2015).
87. Harder, E. *et al.* OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* (2016). doi:10.1021/acs.jctc.5b00864
 88. Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina de helmintos y protozoarios. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2012).
 89. Chen, W. L. Chemoinformatics: past, present, and future. *J. Chem. Inf. Model.* (2006). doi:10.1021/ci060016u
 90. Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S. & Coleman, R. G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling* (2012). doi:10.1021/ci3001277
 91. Cereto-Massagué, A. *et al.* Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Methods* (2015). doi:10.1016/j.ymeth.2014.08.005
 92. Shoichet, B. K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature* (2004). doi:10.1038/nature03197
 93. Camps García, P., Vázquez Cruz, S. & Escolano Mirón, C. in *QUÍMICA FARMACÉUTICA I: Tomo 1* (2010).
 94. Connolly, M. L. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* (1983). doi:10.1126/science.6879170
 95. Goodford, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J. Med. Chem.* (1985). doi:10.1021/jm00145a002

APÉNDICE I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Este apartado fue elaborado con el fin de incluir únicamente los aspectos relevantes de los temas que permitan explicar algunos fundamentos computacionales empleados en el presente trabajo. Se abordan temas relacionados a bases de datos quimioinformáticas, técnicas y principios para diseño de fármacos asistido por computadora, acoplamiento molecular y dinámica molecular.

A1.1 Quimioinformática

La quimioinformática es la conjunción de la informática y el conocimiento químico para resolver problemas químicos ⁸⁹. Este término ha existido ya 20 años y aún se encuentra en desarrollo. El uso de la quimioinformática para el descubrimiento de fármacos involucra un numeroso grupo de técnicas y el gran aumento de información ha llevado a la creación de diversas bases de datos en donde es posible manejar información farmacológica y de interés químico. Diversos grupos de investigación y académicos han desarrollado bases de que son de libre acceso (**Tabla A1**).

Tabla A1. Base de datos disponibles de manera gratuita

Base de datos	Descripción
ZINC ⁹⁰	Base de datos comercial de compuestos para cribado virtual. Creada por el Pharmaceutical Chemistry Department en la Universidad de California en San Francisco.
ChEMBL	Cuenta con información de moléculas ensayadas, ensayos biológicos, dianas biológicas, información de líneas celulares y tejidos. Creada por el European Bioinformatic Institute
DrugBank	Contiene información detallada de fármacos comerciales (mecanismos de acción, farmacocinética, forma farmacéutica, etc) y de las dianas biológicas (vías de señalización, estructura). Creada por Canadian Institutes of Health Research.

PubChem	Contiene información de estructuras químicas tal como propiedades fisicoquímicas, actividades biológicas, patentes, toxicidad, etc. Creada por el National Institutes of Health
----------------	---

A.1.2 Diseño de fármacos asistido por computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora (DFAC) tiene como objetivos el diseño, optimización y selección de compuesto con actividad biológica. Forma parte de diversas disciplinas científicas pues abarca modelado molecular, quimioinformática, química teórica y química computacional. Los métodos del DFAC se pueden agrupar en dos áreas muy distinguidas: basado en el ligando y basado en la estructura. Los métodos basados en el ligando se utilizan cuando se conoce la estructura de una serie de moléculas que comparten actividad biológica. Los métodos basados en el receptor se emplean cuando se conoce la estructura del receptor pudiendo determinar dónde interaccionará el ligando donde se utiliza la técnica de acoplamiento molecular (molecular docking). Cuando se requiere realizar un análisis de gran número se utiliza la técnica de cribado virtual (virtual screening)³⁹.

A1.3 Cribado virtual

El cribado de alta eficiencia (*High throughput screening*, HTS traducido del inglés) ha sido utilizado por diversas compañías farmacéuticas e institutos de investigación en el descubrimiento de fármacos sigue siendo un método que requiere gran cantidad de tiempo y sobre todo recursos monetarios por lo que otros investigadores han tenido que utilizar el diseño racional mediante métodos computacionales. Una de ellas es el cribado virtual (Virtual screening, VS) en donde se realiza un cribado a bibliotecas de moléculas y que puede realizarse de dos distintas maneras: cribado sobre una diana molecular o cribado por similitud de moléculas activas. En el caso del cribado sobre una diana molecular se utiliza la técnica de acoplamiento molecular y se eligen las moléculas con mejor energía de unión además de utilizar otro tipo de filtros como reglas de Lipinski-Veber, aspectos tóxicos, o propiedades ADME (Administración, distribución, metabolismo y excreción) Si se trata de cribado

por similitud se utilizan funciones de similitud y huellas digitales (Fingerprints traducido del inglés) y las moléculas más similares a un compuesto conocido que es activo se seleccionan. Una vez seleccionadas las moléculas con cualquier método utilizado se procede a sintetizar o comprar para poder ser evaluadas biológicamente^{91,92}.

A1.4 Acoplamiento molecular

Se trata de un método computacional basado en la estructura para el diseño de fármacos. Este método involucra la predicción de la conformación de un ligando dentro de un sitio de unión de una diana molecular. Los objetivos principales de estudios de acoplamiento es predecir de manera adecuada la conformación y la energía de unión la molécula. Esta energía de unión se ha modelado como un equilibrio químico de formación de un complejo proteína-ligando generalmente en medio acuoso y electrolitos. A esta reacción se le es determinada la energía libre de Gibbs (ΔG) y se consideran diversos factores como estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno, energía de solvatación, desolvatación además de factores entrópicos rotacionales y traslacionales⁹³.

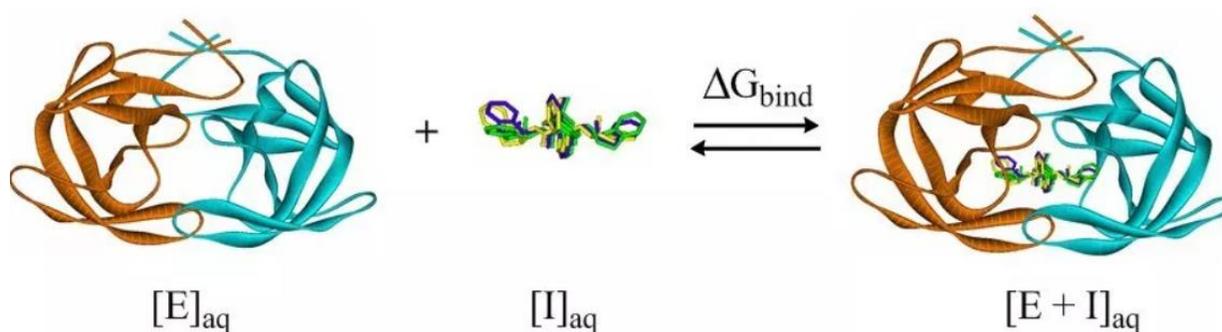


Figura A1. Esquema del fundamento del acoplamiento molecular. El inhibidor (I) se une a la enzima (E) para formar el complejo inhibidor-enzima (E-I) todo en medio acuoso. Tomado de <http://dlab.cl/molecular-design/>

Existen tres representaciones básicas del receptor: atómico, superficial y de rejilla (grid). El uso de rejillas energéticas se presenta en varios programas para realizar los cálculos de energía de unión. En esta rejilla se almacena información de puntos

energéticos que involucra dos tipos de potenciales: electrostáticos y van der Waals^{94,95}.

Si bien, los algoritmos de cálculo en acoplamiento molecular han producido avances importantes, aún resulta difícil asignar el cambio conformacional que pueda ocurrir en el receptor. Se han desarrollado algunas resoluciones como el uso de funciones de puntuación consenso, es decir, el uso de distintos programas para la selección de los conformeros más probables y la re-evaluación a posteriori de las afinidades y conformaciones mediante el empleo de dinámica molecular o metadinámica.

A1.5 Dinámica molecular

Los métodos de dinámica molecular son ampliamente utilizados para obtener la información acerca de la evolución de las conformaciones de proteínas y otras macromoléculas a lo largo del tiempo.

De manera general, un modelo se obtiene de manera experimental (cristalización de una proteína) o mediante modelado comparativo. El sistema simulado puede ser representado a diferentes niveles de detalle; la representación atómica ha sido la que mejor simula los sistemas. De igual forma, es importante definir la representación del solvente pues el disolvente explícito es capaz de recuperar la mayor parte de los efectos generados por solventes reales incluyendo aquellos que son exclusivos de orígenes entrópicos como el efecto hidrofóbico.

Una vez que el sistema se ha construido, las fuerzas que actúan sobre cada átomo se obtienen mediante ecuaciones conocidas como campos de fuerza que describen la energía potencial y fuerzas. Estos campos de fuerza se basan en distintas características de representación molecular: resortes para longitud de enlace y ángulos, funciones periódicas para rotación de enlaces, potenciales de Lennard-Jones para interacciones de van der Waals y la ley de Coulomb para interacciones electrostáticas.

Una vez que las fuerzas son calculadas para cada átomo individual, la ley de Newton se utiliza para calcular aceleraciones y velocidades así como actualizar las posiciones de los átomos.

A.1.6 Predicción de propiedades ADME

Si bien, la afinidad entre el ligando y receptor es una de las características más importantes en el desarrollo de un fármaco existe una progresiva necesidad de evaluar a priori las propiedades farmacocinéticas con el fin de excluir aquellos compuestos que puedan tener problema de biodisponibilidad, metabolismo inadecuado o toxicidad.

Estos parámetros se acuñen a Lipinski, quien sugirió un conjunto de reglas empíricas que debía reunir un compuesto para ser considerado un candidato a fármaco (drug-like por traducción del inglés) tales como masa molecular inferior a 500 Da, coeficiente de partición octanol-agua (logP) menor a 5, grupos donadores de puentes de hidrógeno menor a 5 y un número de grupos aceptores de puente de hidrógeno menor a 10. Diversas propiedades se han adicionado provenientes de distintos investigadores tales como Veber y Egan que limitan aún más las características.

Algunas propiedades son sencillas de calcular pues son conteos y sumas sencillas, sin embargo, algunos otras como logP, TPSA o logS no siempre resultan sencillas de determinar experimentalmente por lo que se han desarrollado diversas ecuaciones basándose en reglas empíricas para el caso de logP o en consideraciones estructurales para el caso de TPSA.

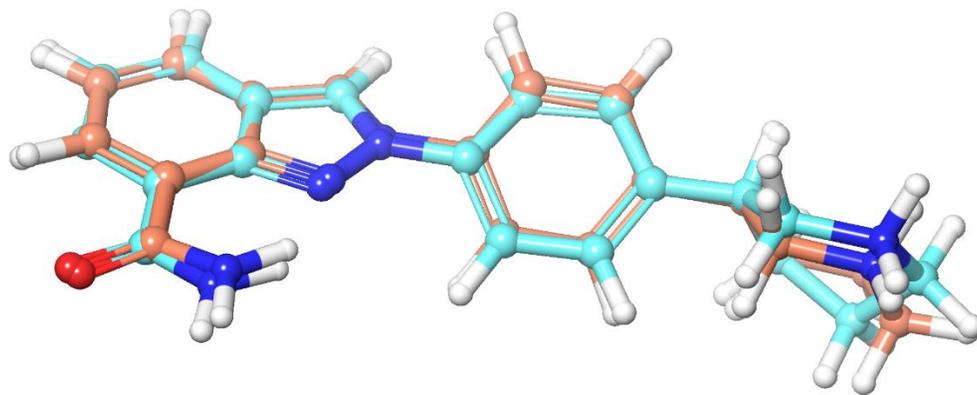
APÉNDICE II. PROTEÍNAS UTILIZADAS

Tabla A2. Especificaciones técnicas de proteínas utilizadas

Proteína	Código	R-Free	R-Work	Resolución (Å)	Organismo
EGFR	2gs7	0.298	0.233	2.6	Homo sapiens
AKT2	2jdo	0.210	0.175	1.8	Homo sapiens
PARP1	4r6e	0.218	0.202	2.2	Homo sapiens

APÉNDICE III. VALIDACIÓN DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

A)



B)

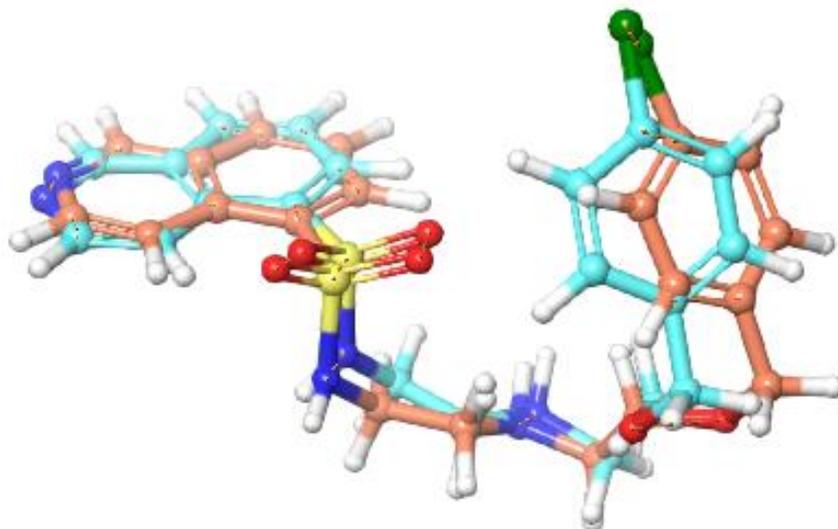


Figura A2. Alineamiento del re-acoplamiento del ligando co-cristalizado en 4r6e (A) y 2jdo (B). El RMDS presentó un valor de 0.3599 para 4r6e y 0.8059 para 2JDO. En azul se observa el ligando co-cristalizado y en rosa el acoplamiento realizado en GlideXP.

APÉNDICE IV. DISEÑO DE CANDIDATOS

A4.1 Acoplamientos moleculares de serie CUMO en PARP1

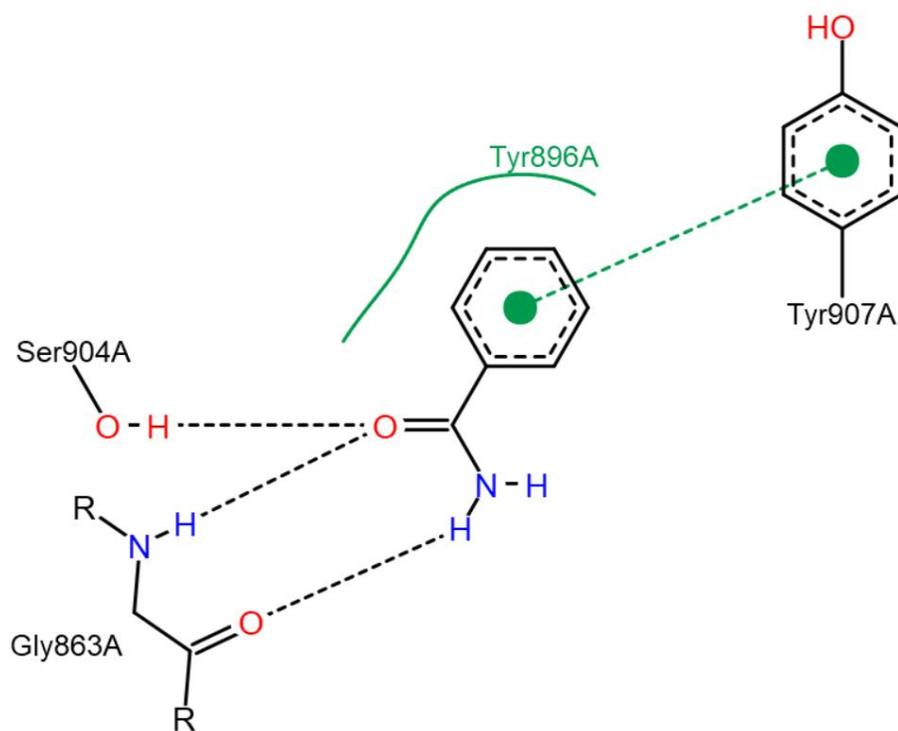
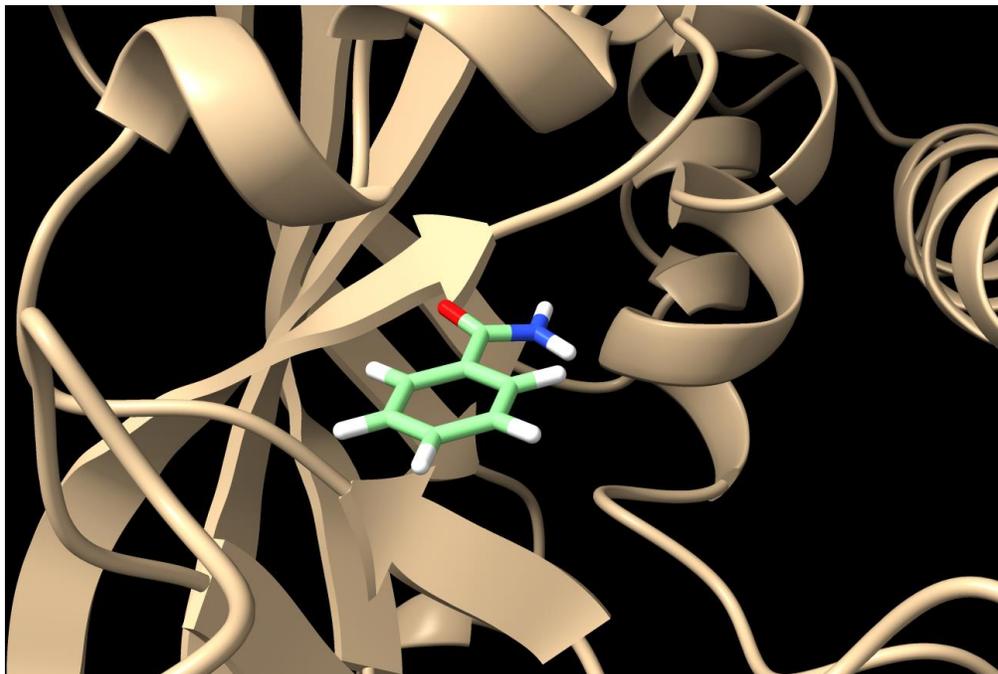


Figura A3. Modo de unión e interacciones de CUMO-1 en 4r6e

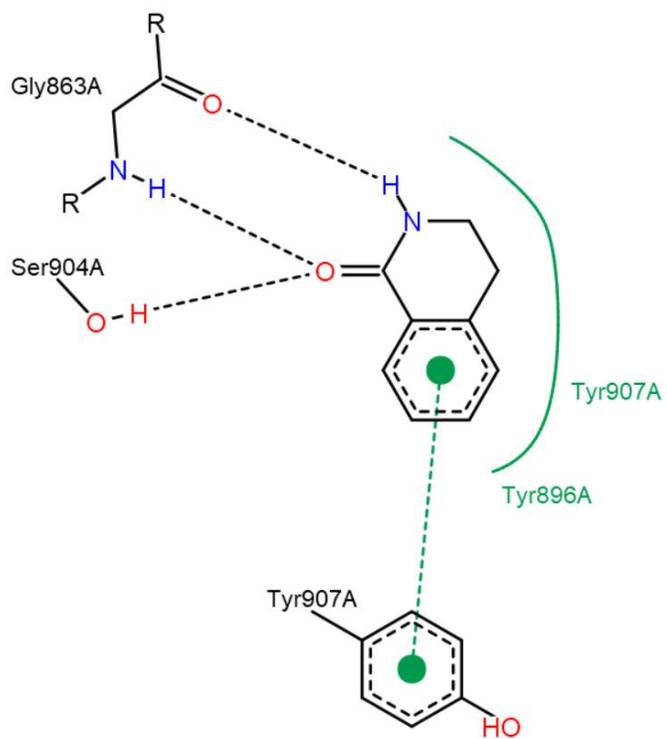
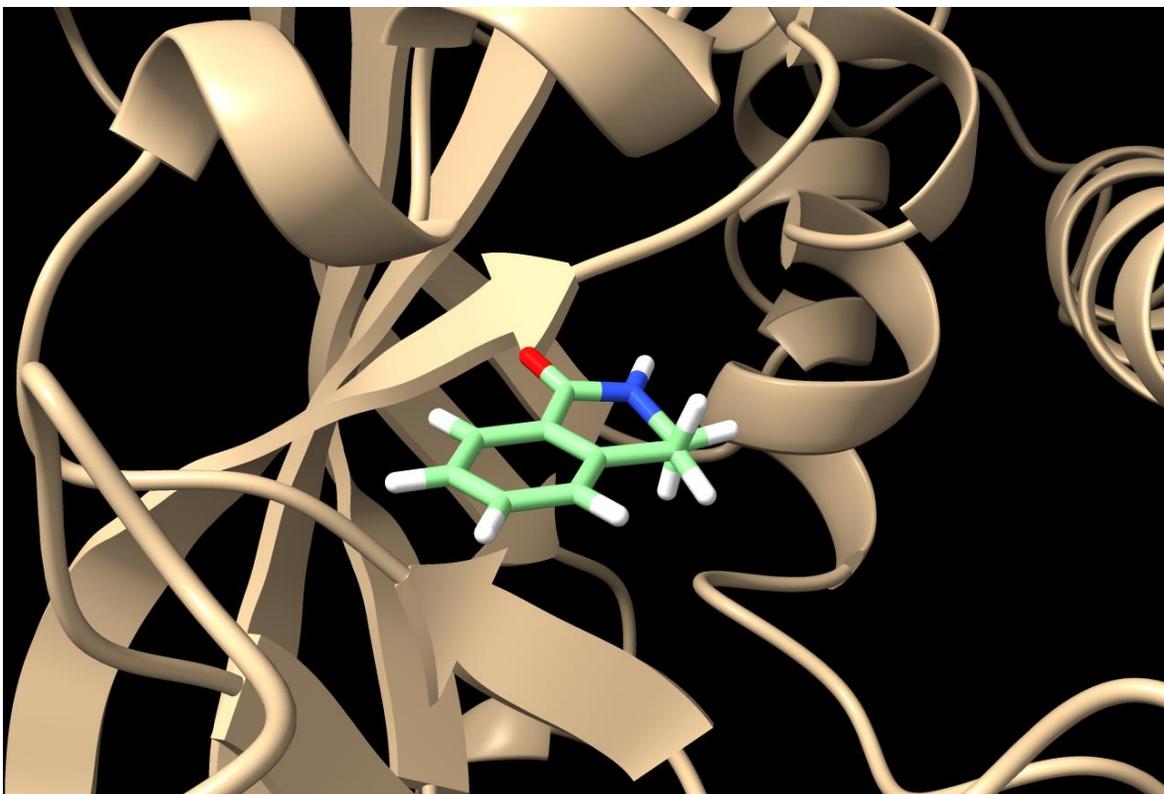


Figura A4. Modo de unión e interacciones de CUMO-2 en 4r6e

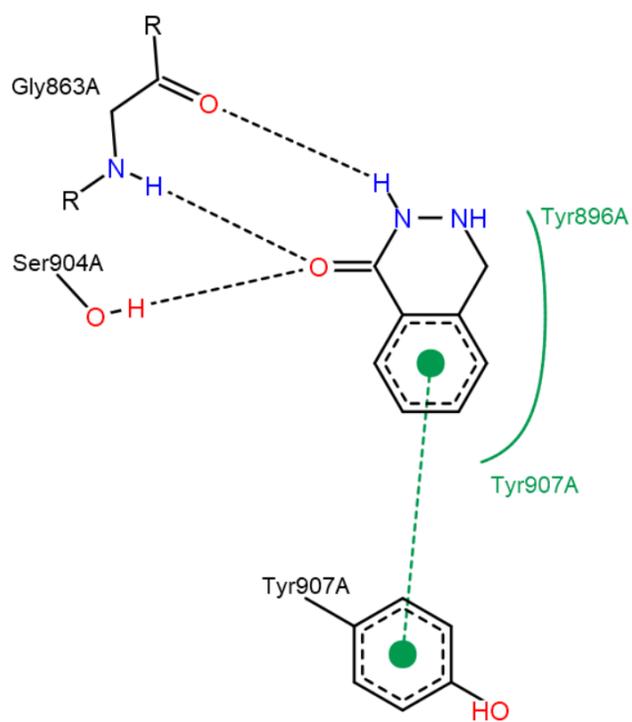
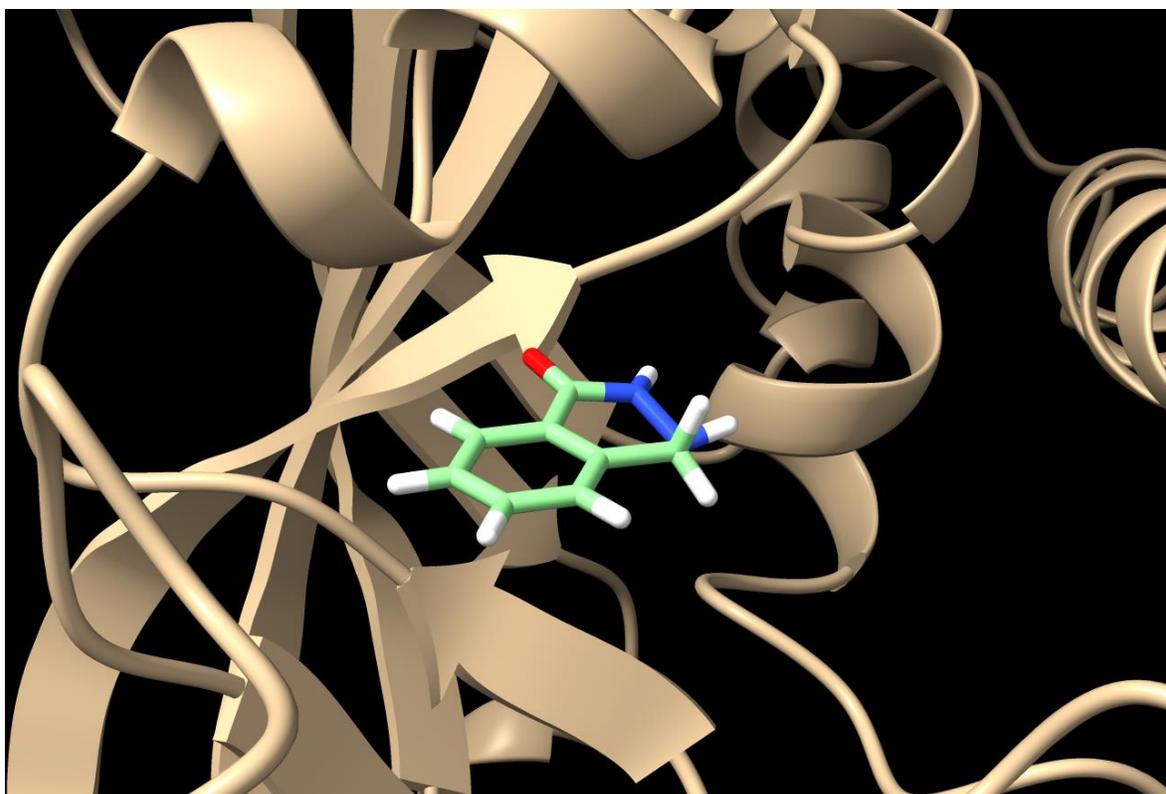


Figura A4. Modo de unión e interacciones de CUMO-3 en 4r6e

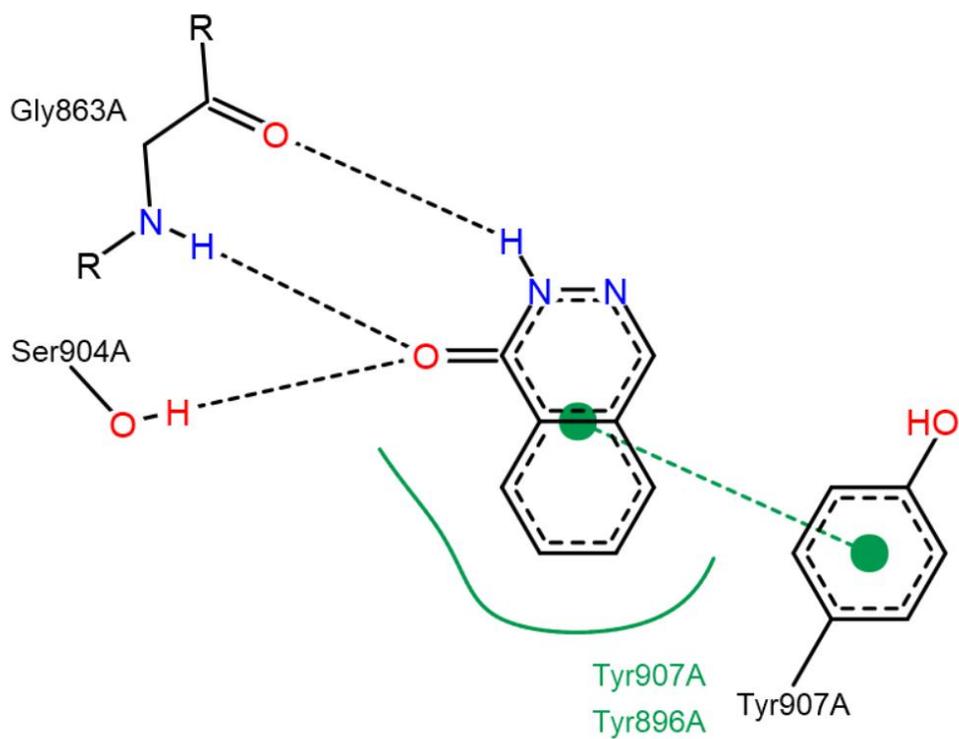
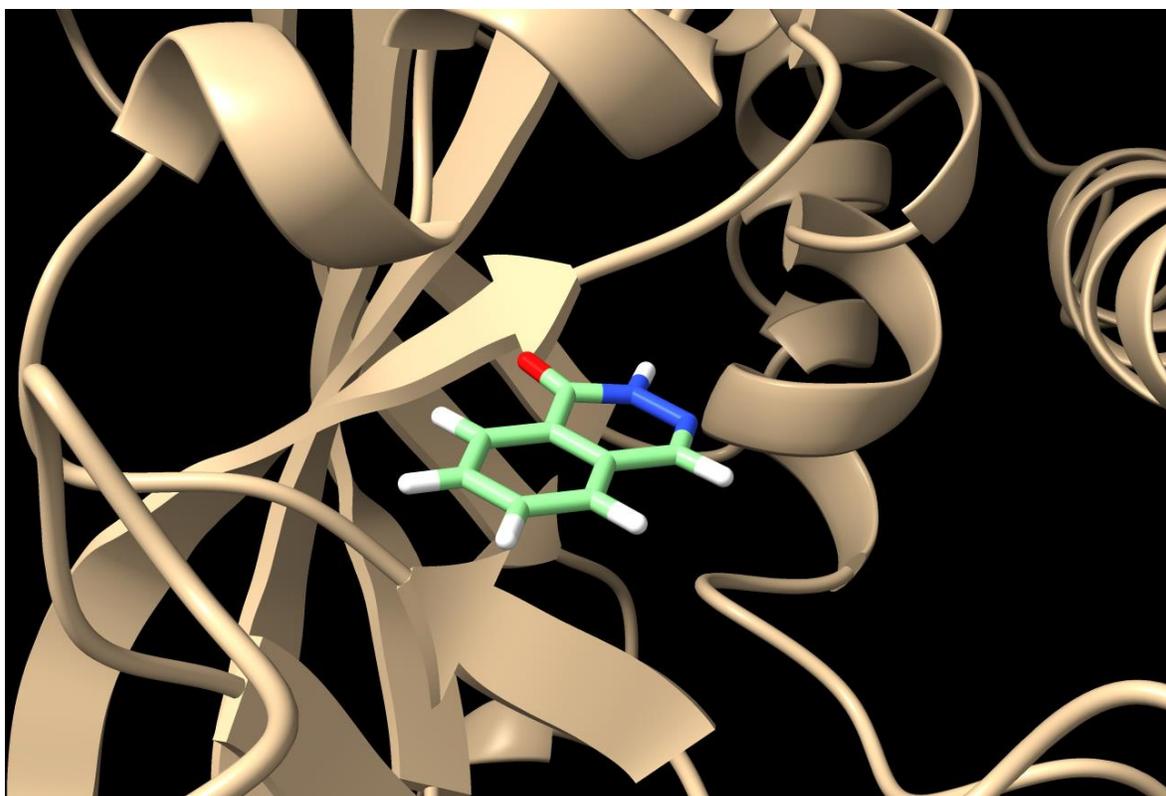


Figura A5 . Modo de unión e interacciones de CUMO-4 en 4r6e

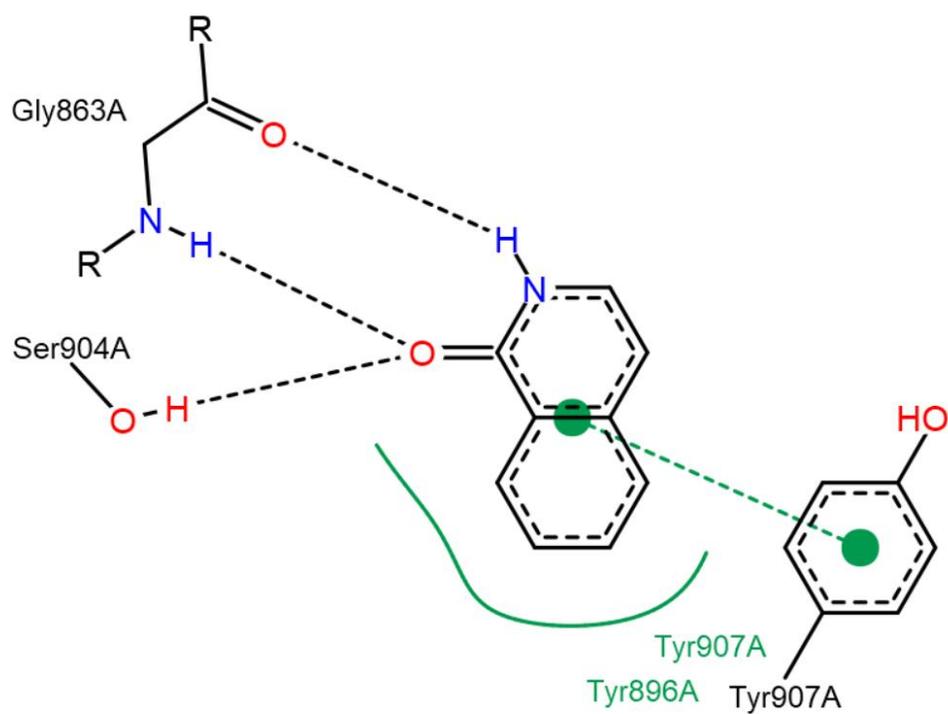
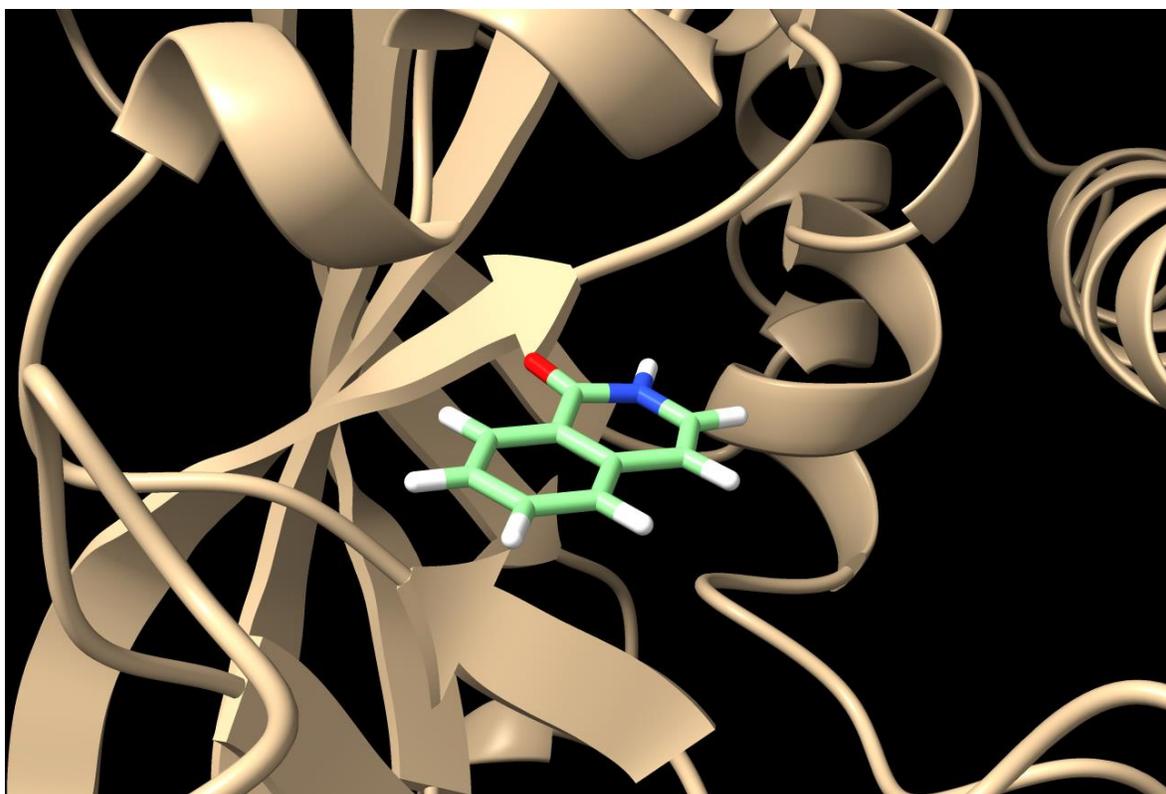


Figura A6 . Modo de unión e interacciones de CUMO-5 en 4r6e

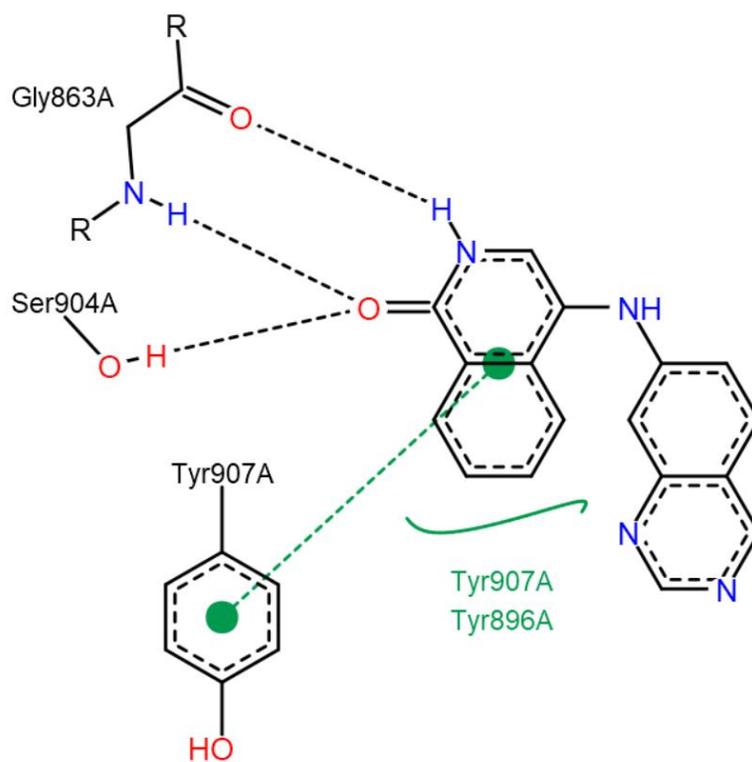
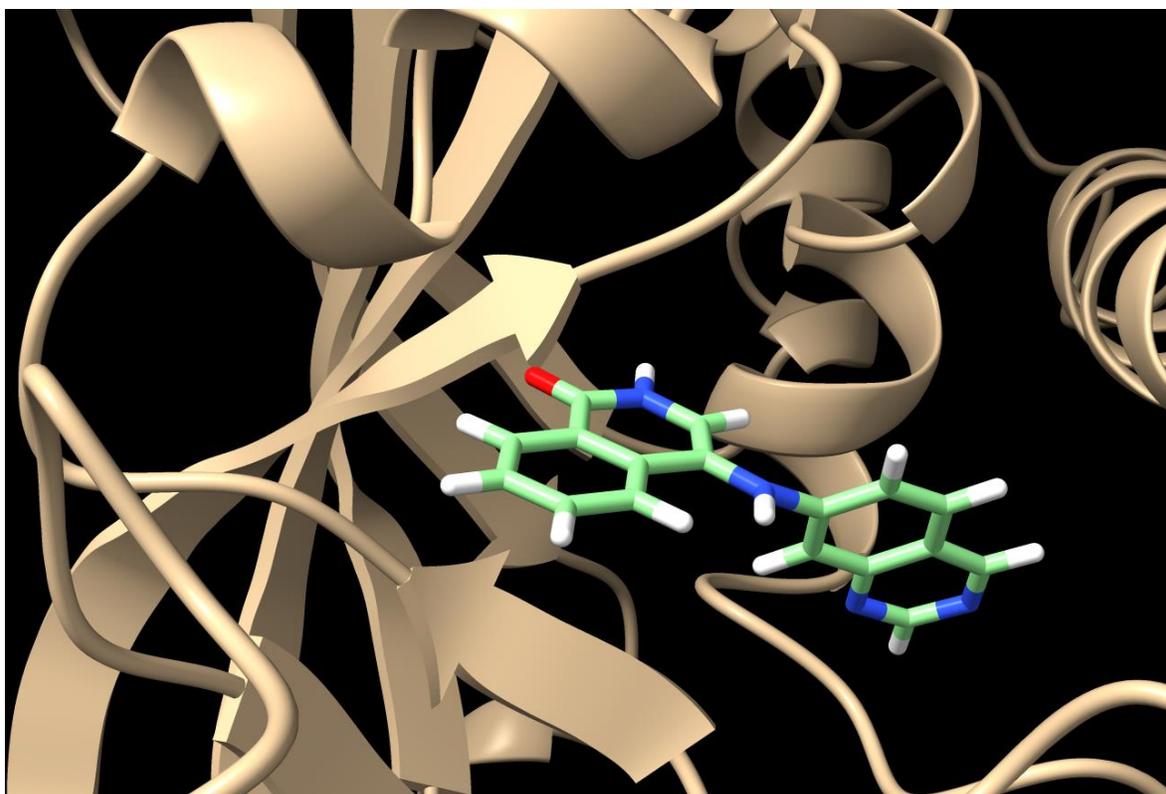


Figura A7 . Modo de unión e interacciones de CUMO-6 en 4r6e

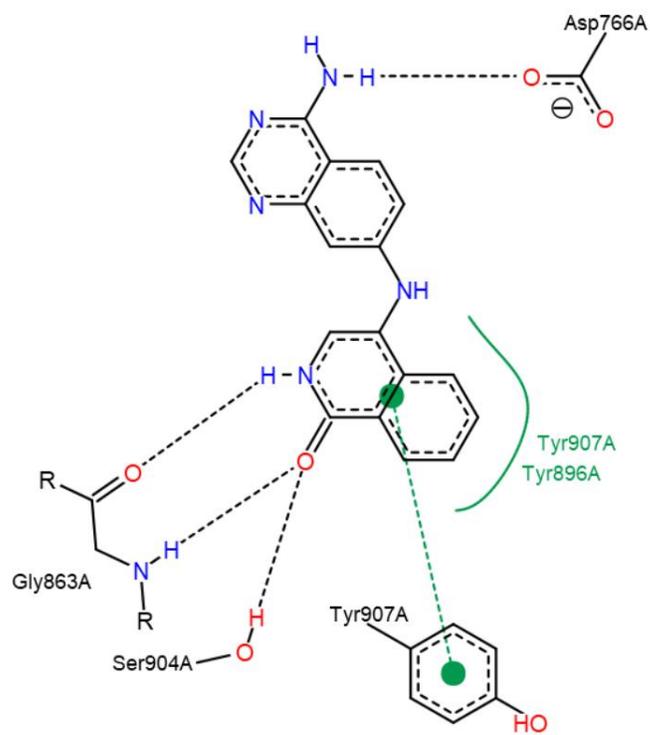
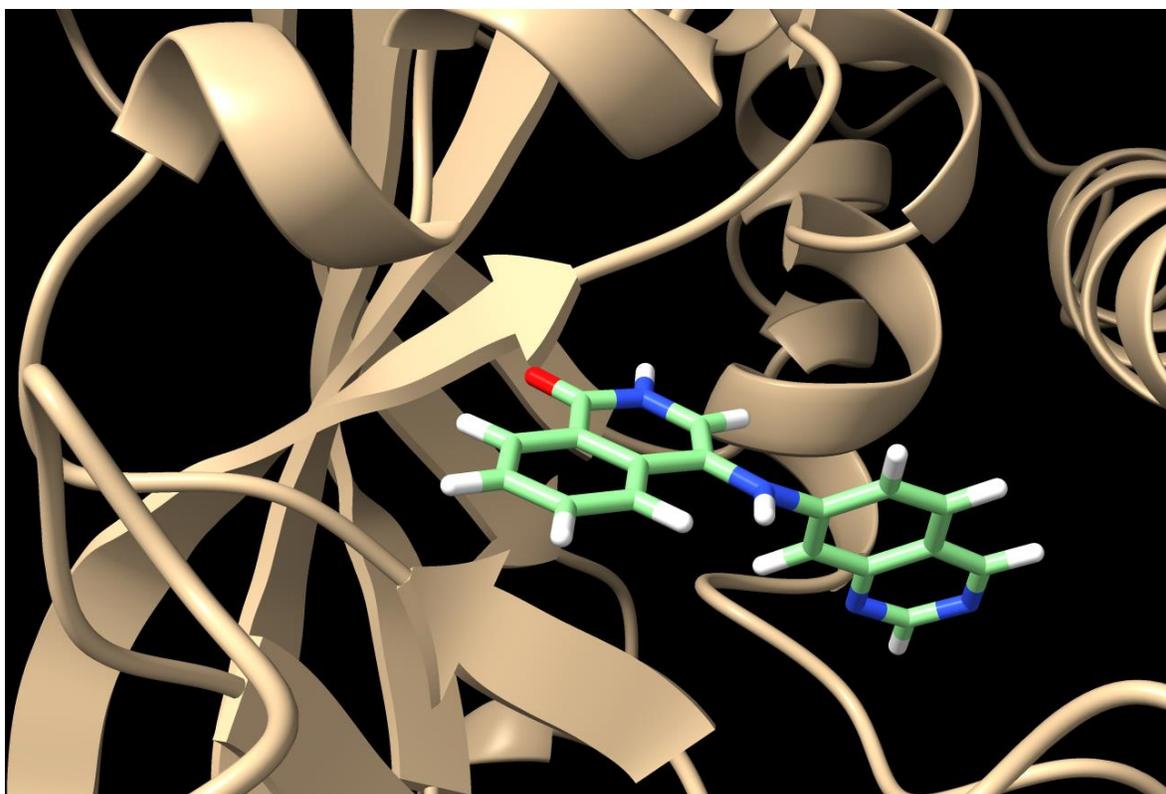


Figura A8. Modo de unión e interacciones de CUMO-7 en 4r6e

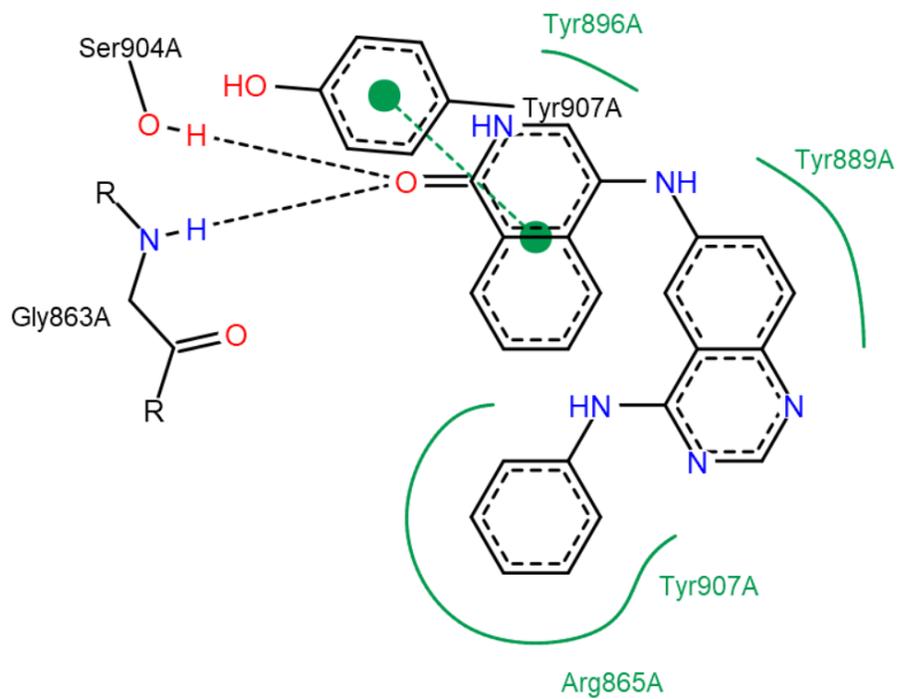
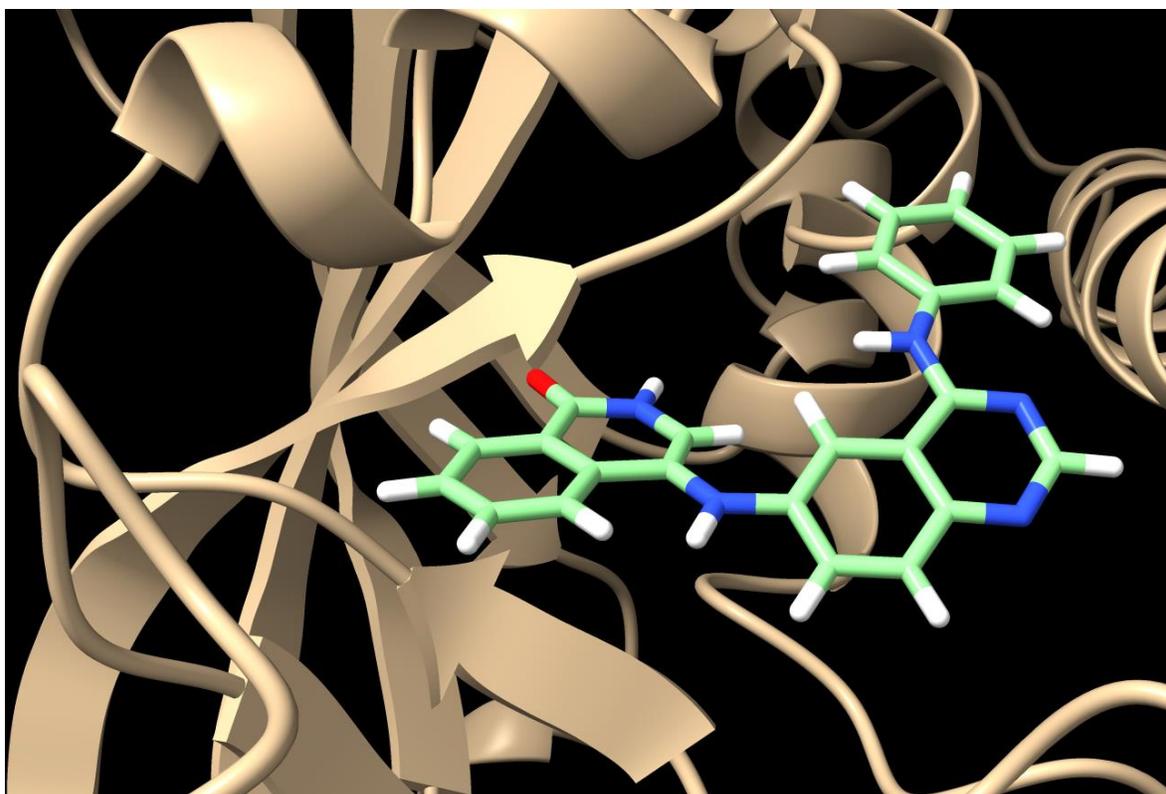


Figura A9. Modo de unión e interacciones de CUMO-8 en 4r6e

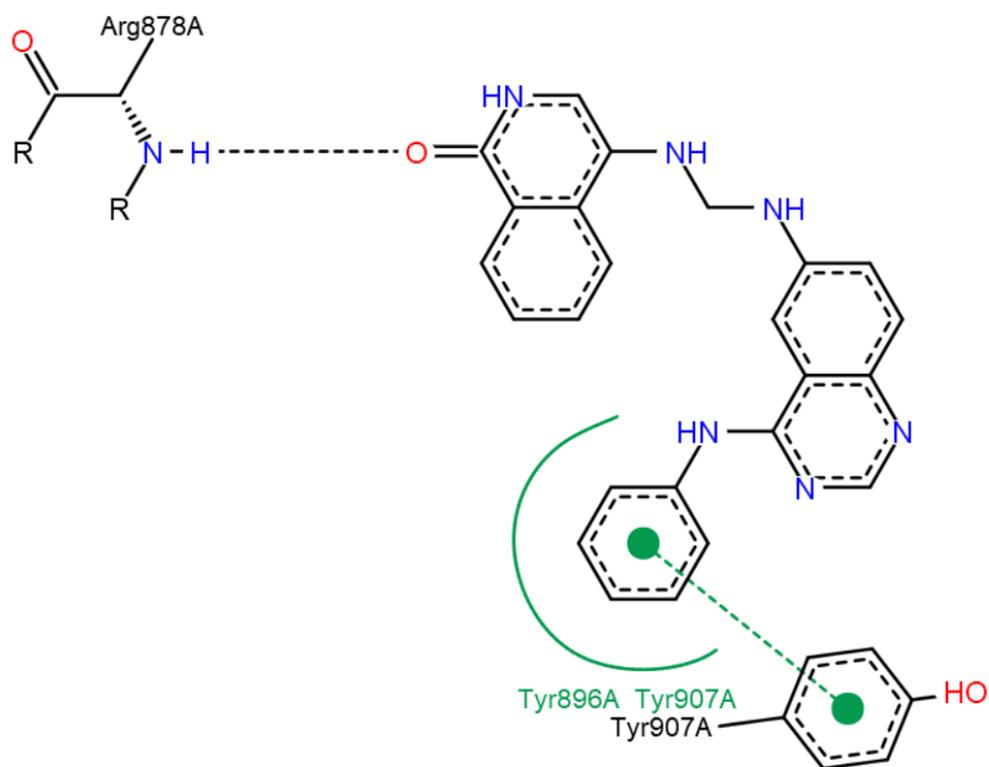
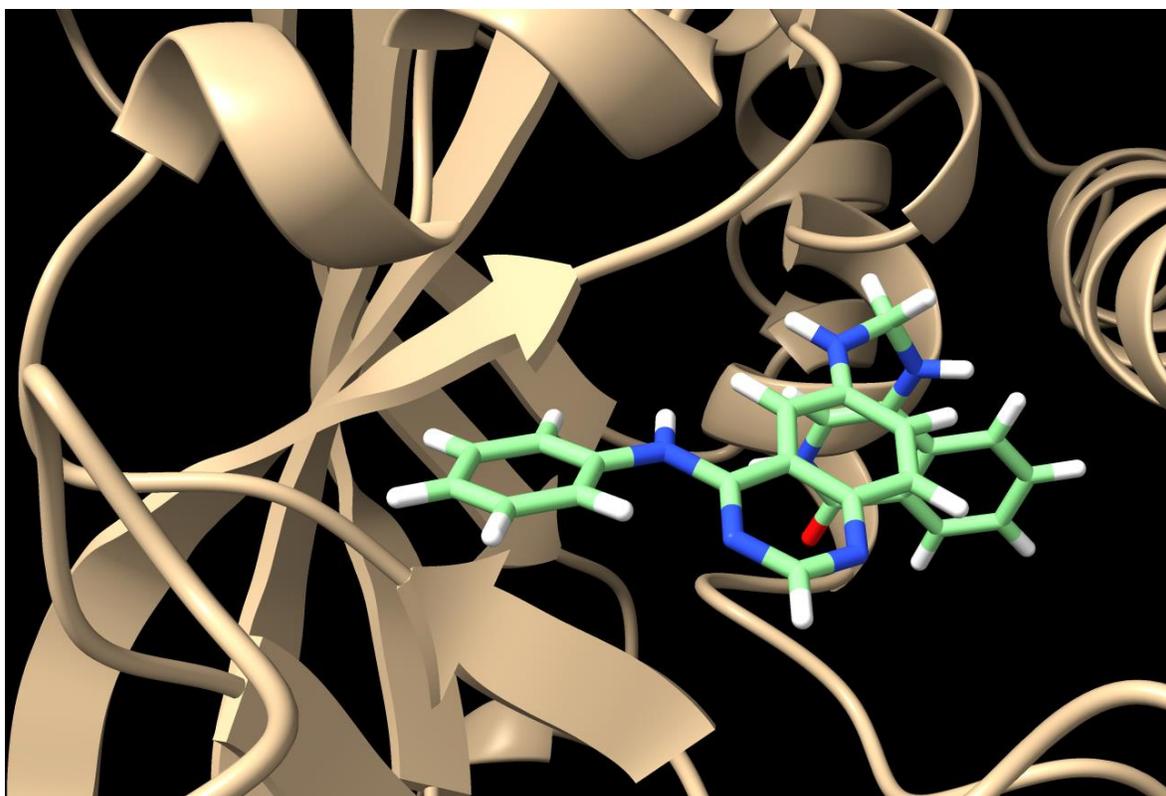


Figura A10. Modo de unión e interacciones de CUMO-9 en 4r6e

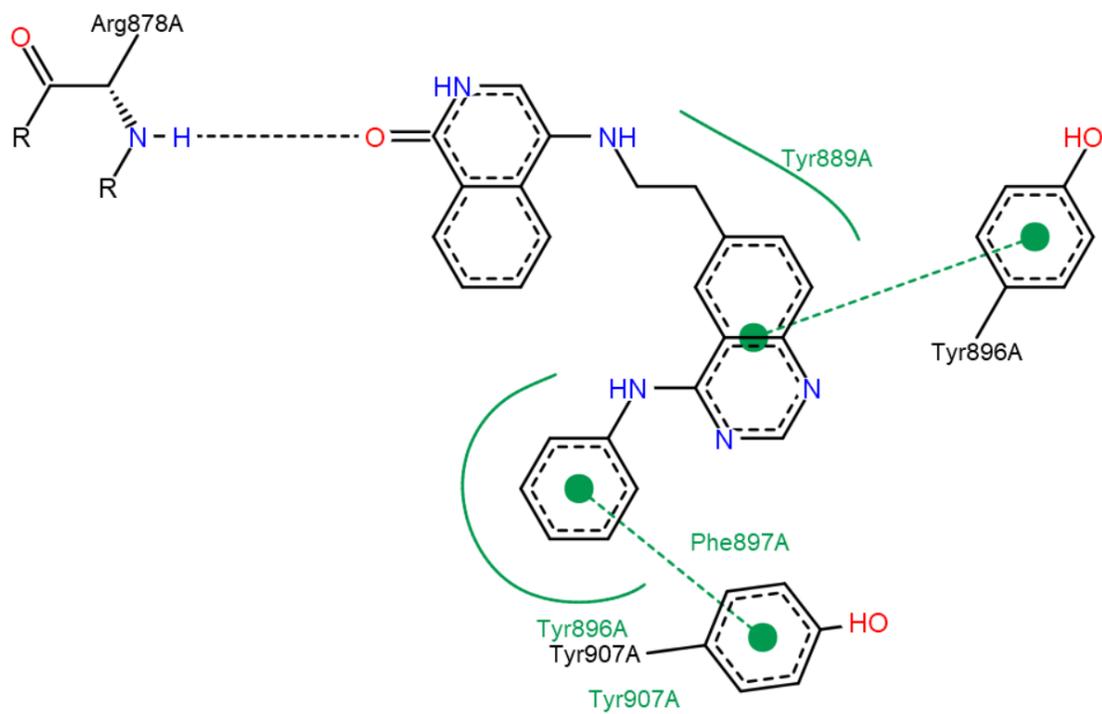
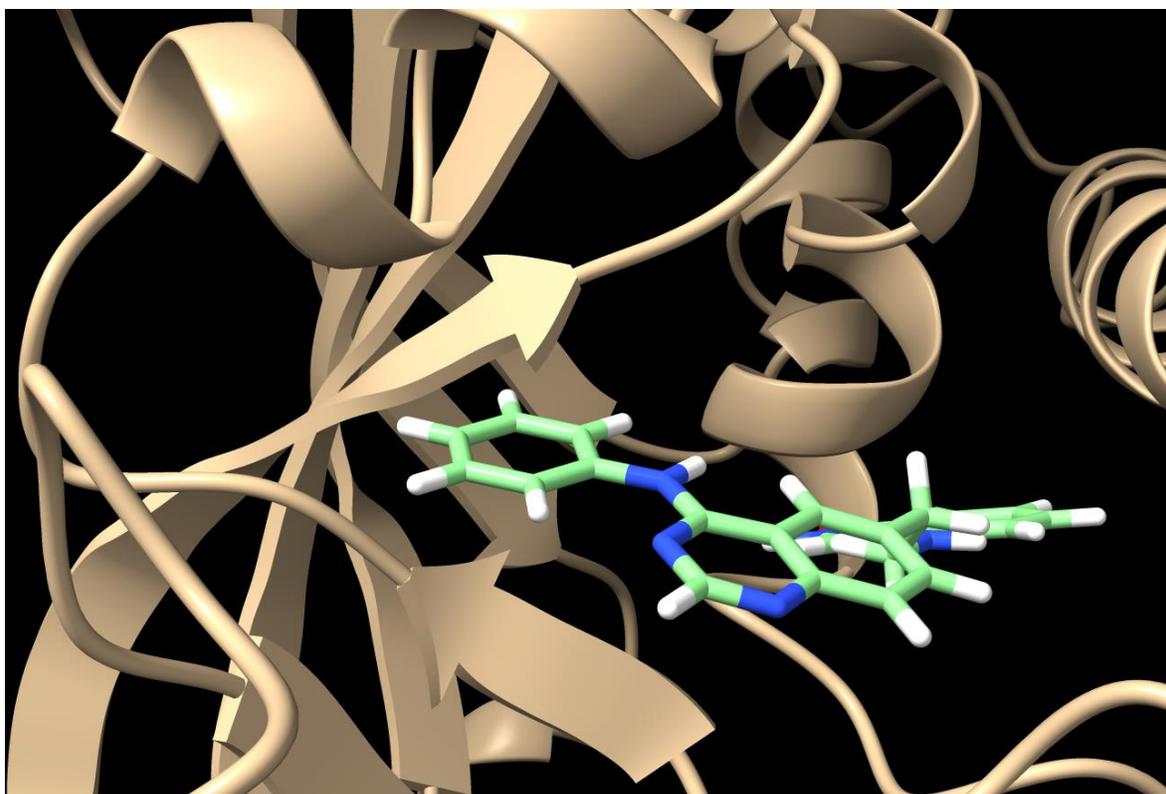


Figura A11. Modo de unión e interacciones de CUMO-10 en 4r6e

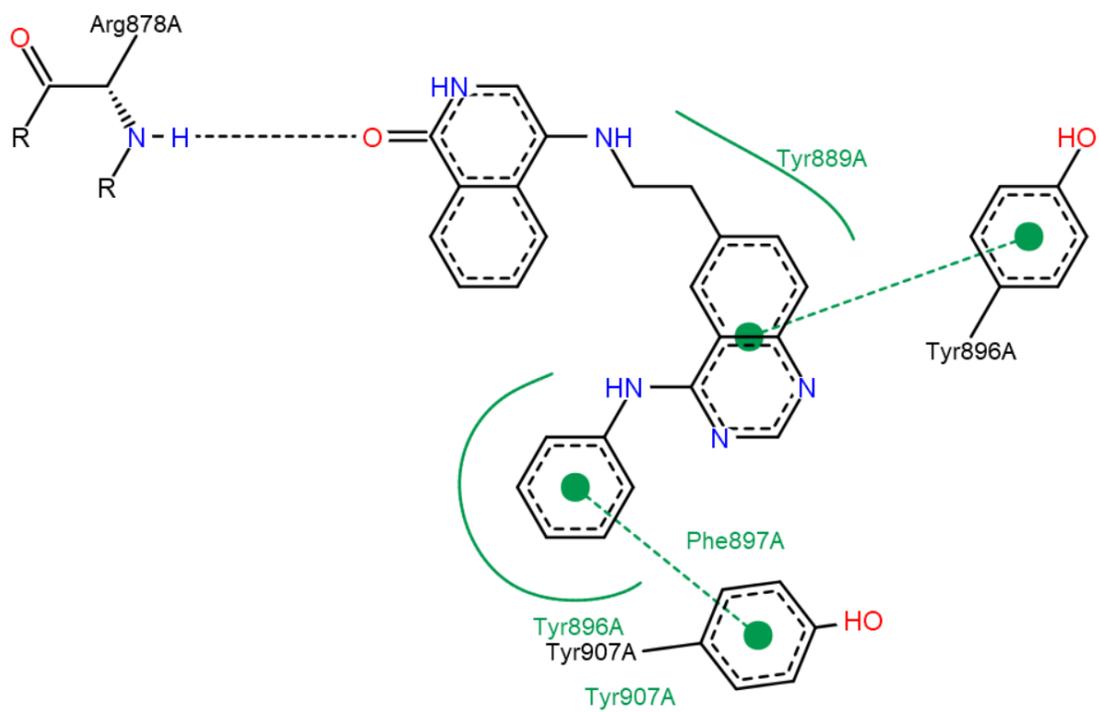
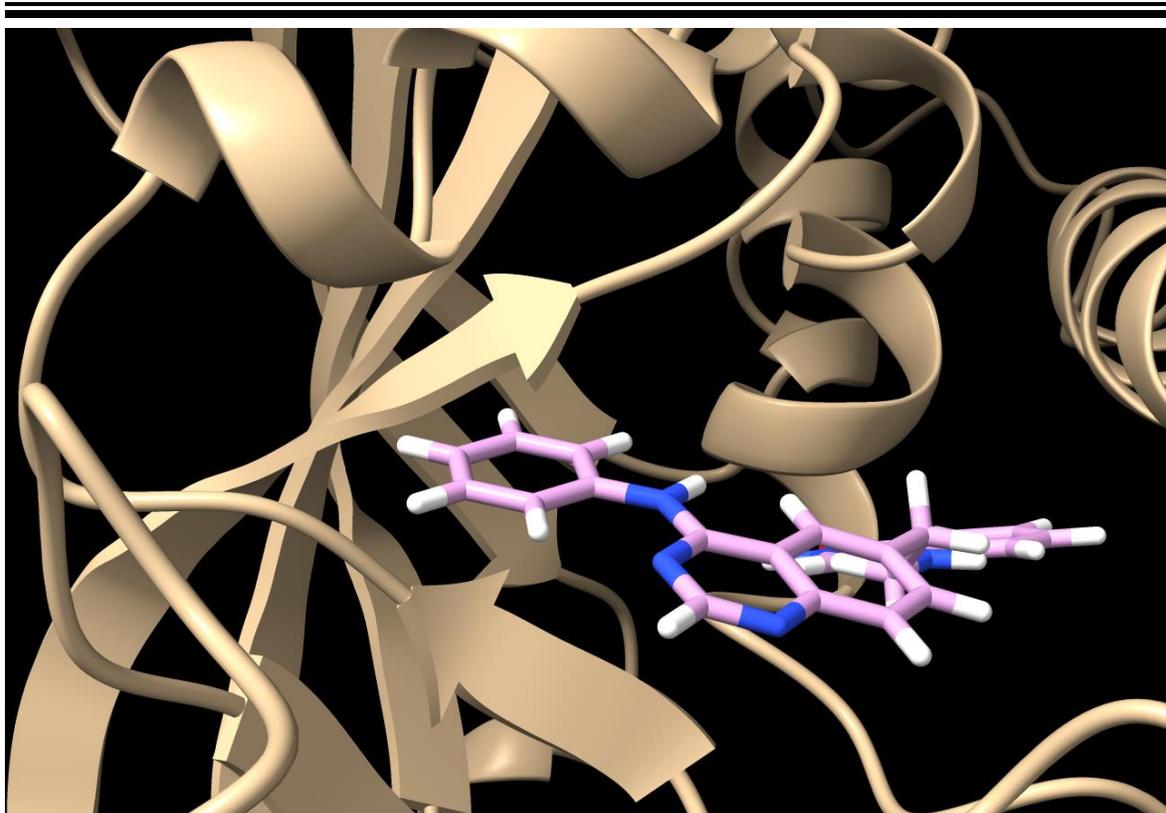


Figura A12. Modo de unión e interacciones de CUMO-11 en 4r6e

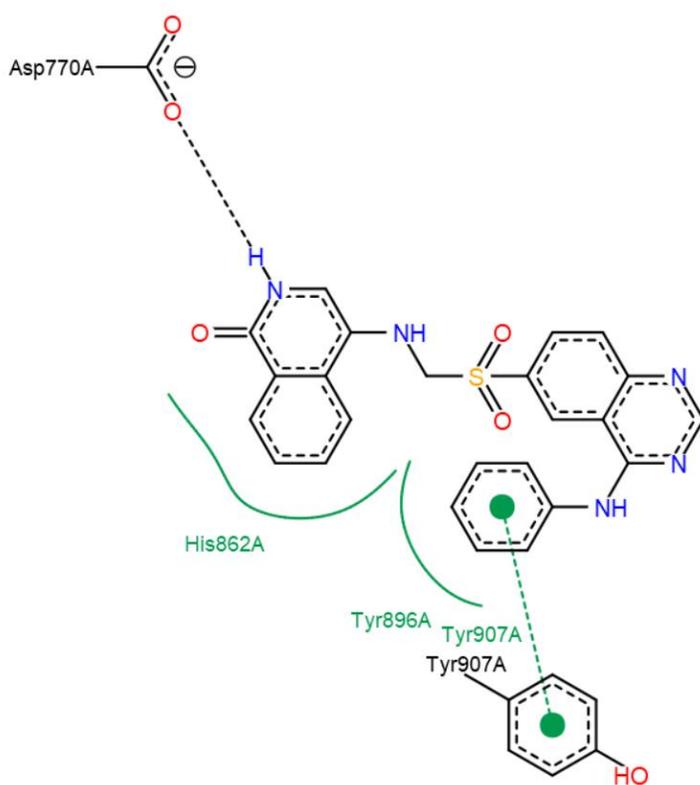
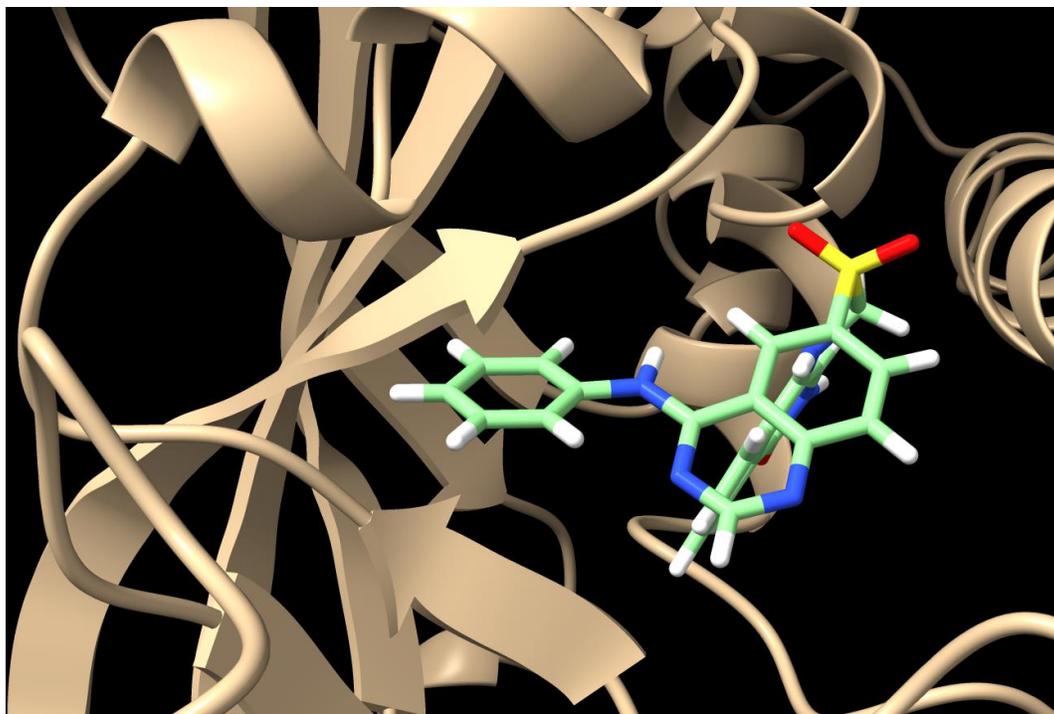


Figura A13. Modo de unión e interacciones de CUMO-12 en 4r6e

A 4.2 Acoplamientos de serie CUMO en EGFR

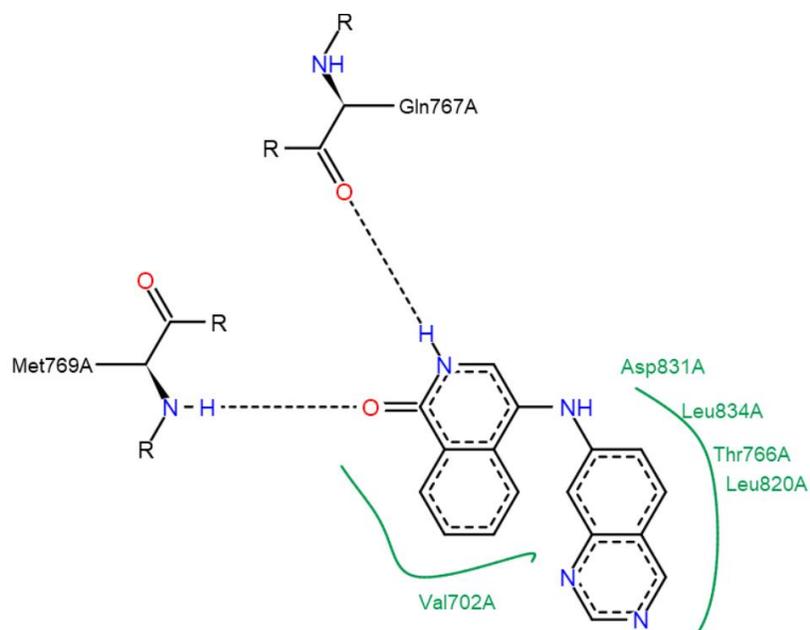
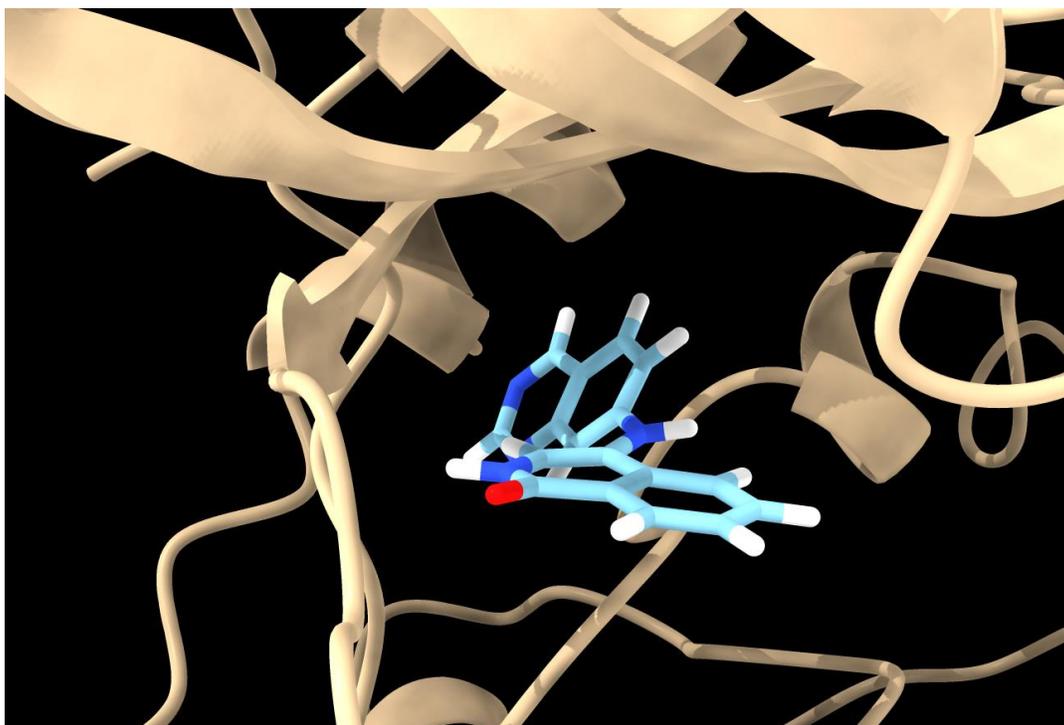


Figura A14. Modo de unión e interacciones de CUMO-6 en 2gs7

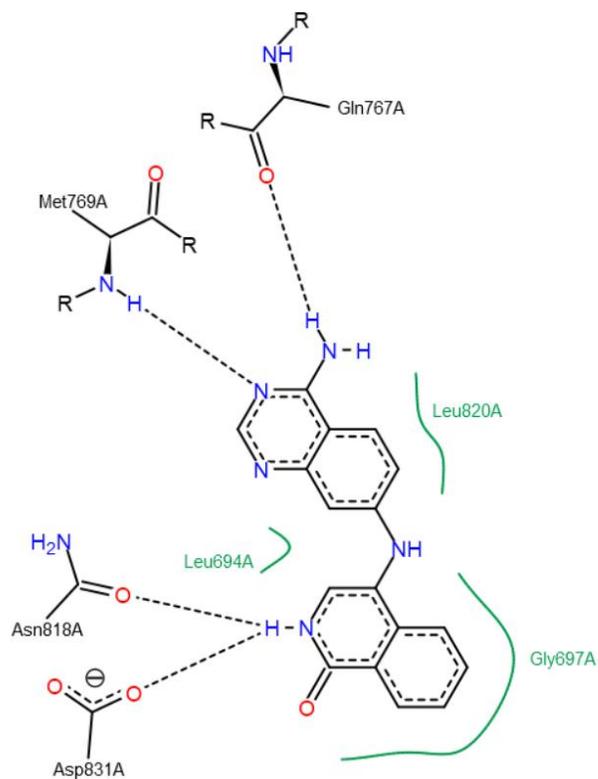
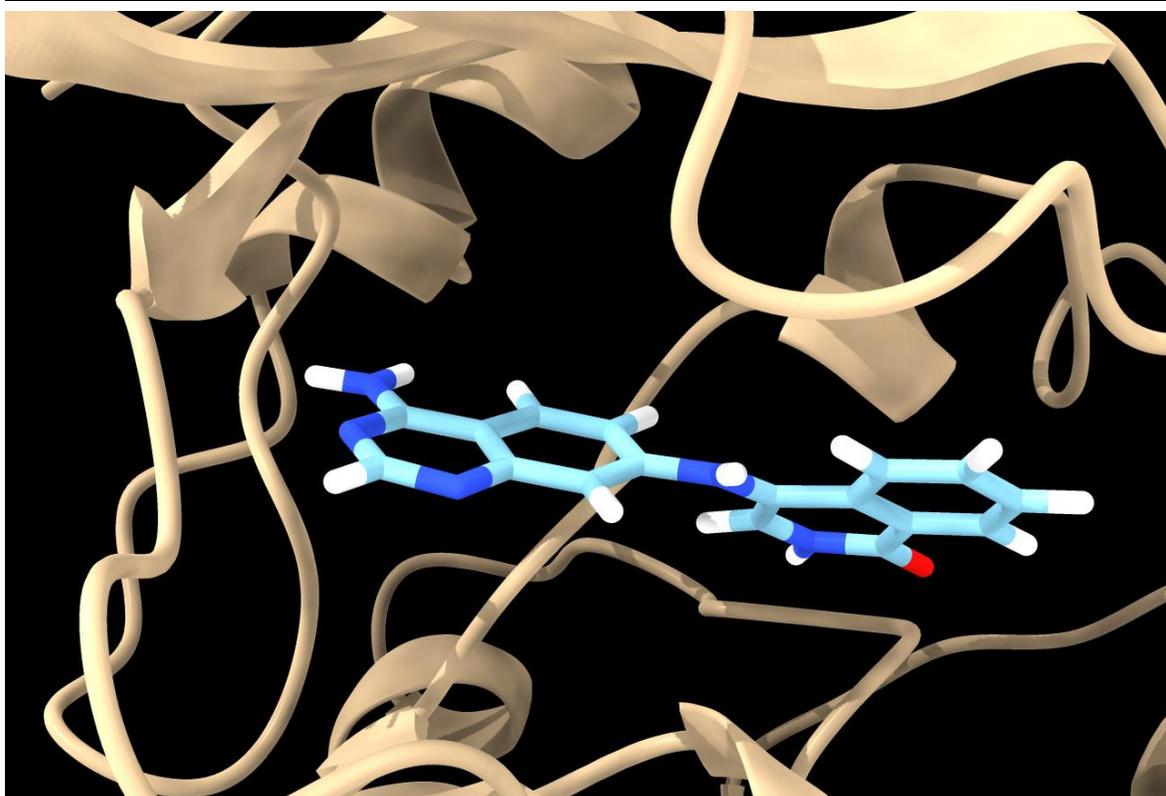


Figura A15. Modo de unión e interacciones de CUMO-7 en 2gs7

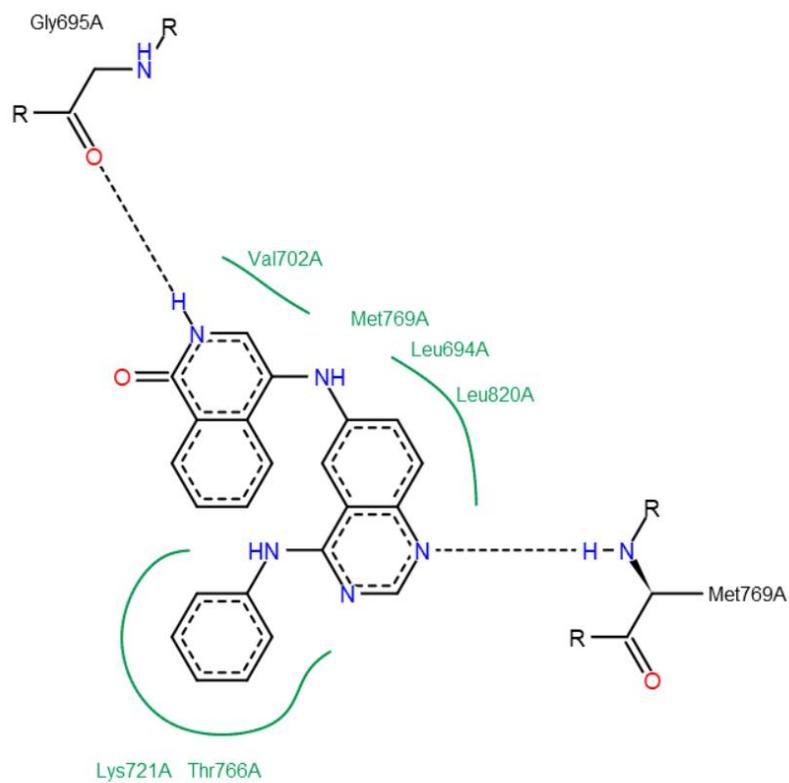
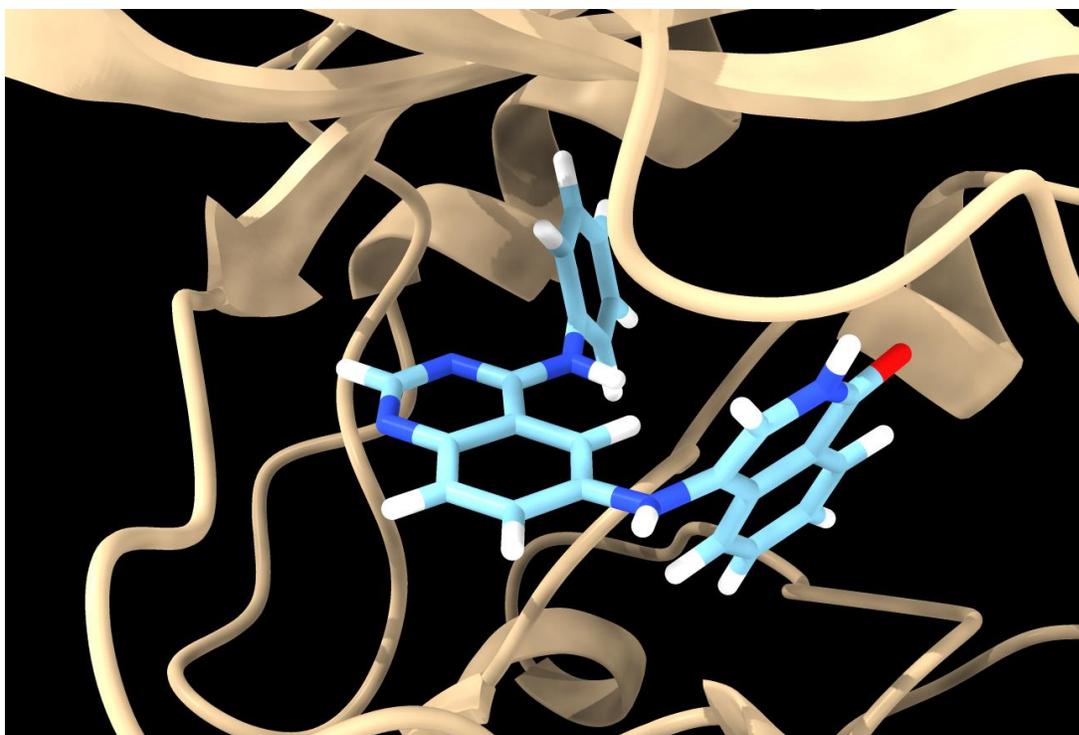


Figura A16 . Modo de unión e interacciones de CUMO-8 en 2gs7

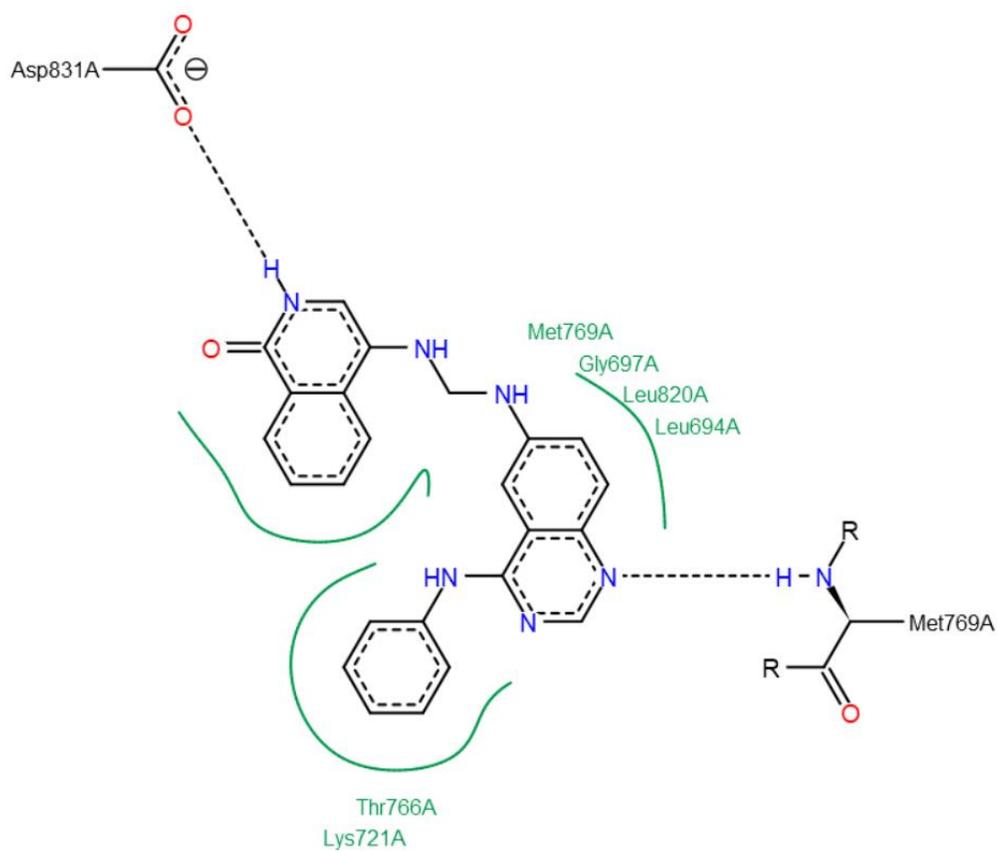
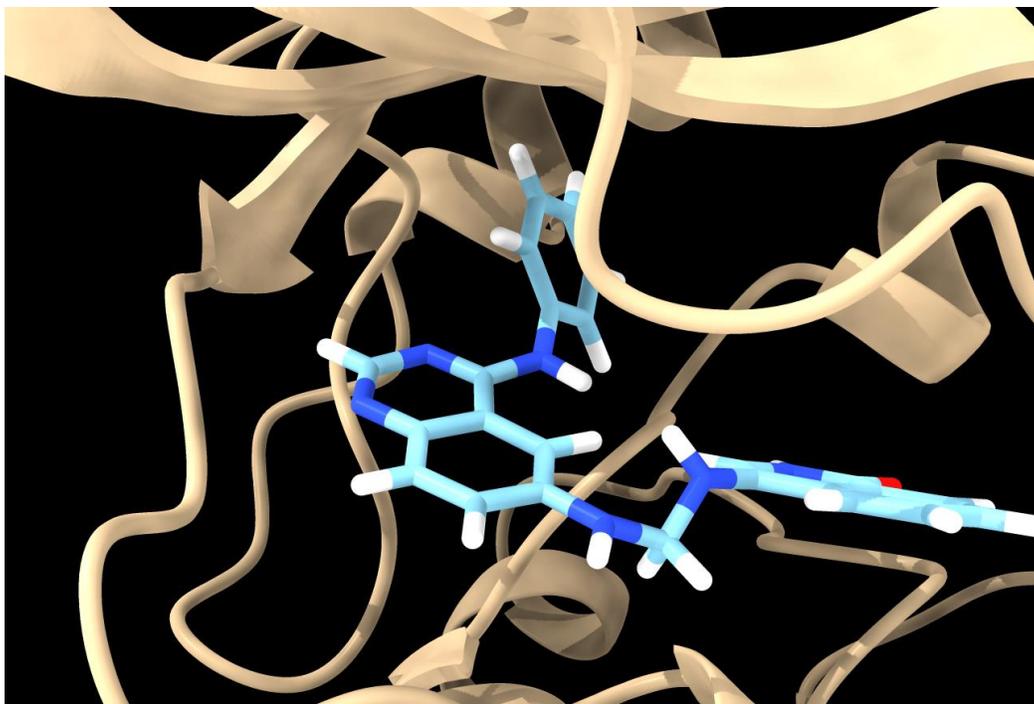


Figura A17. Modo de unión e interacciones de CUMO-9 en 2gs7

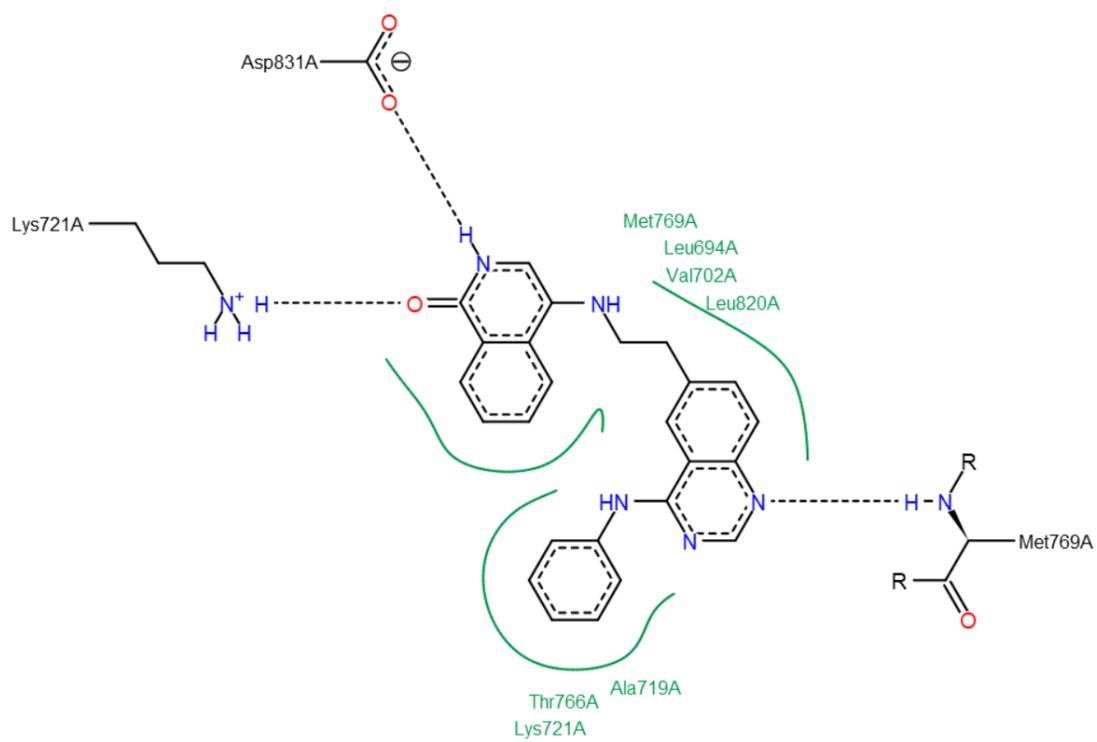
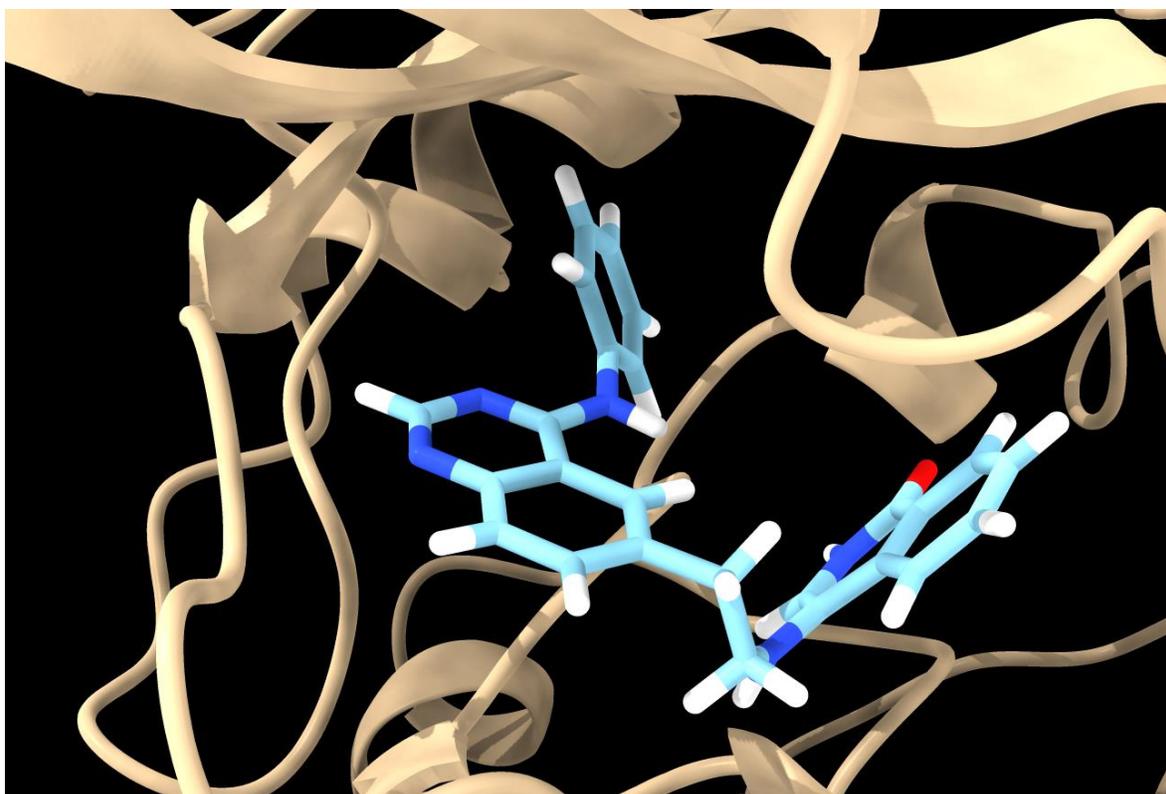


Figura A18. Modo de unión e interacciones de CUMO-10 en 2gs7

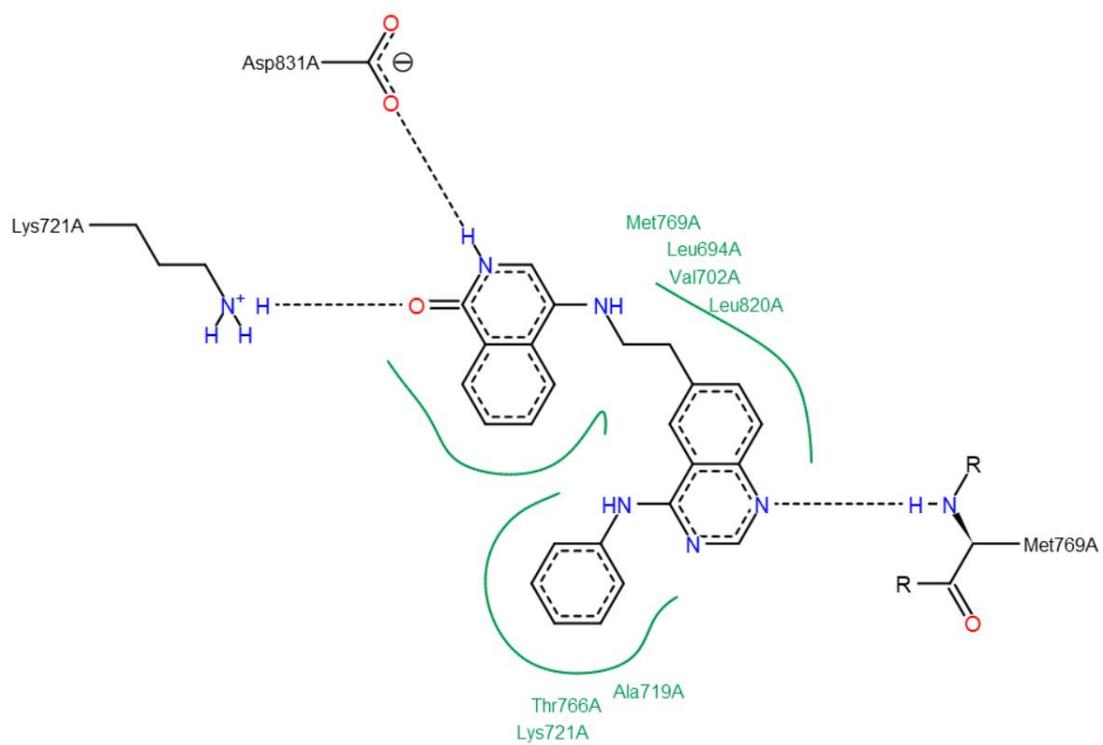
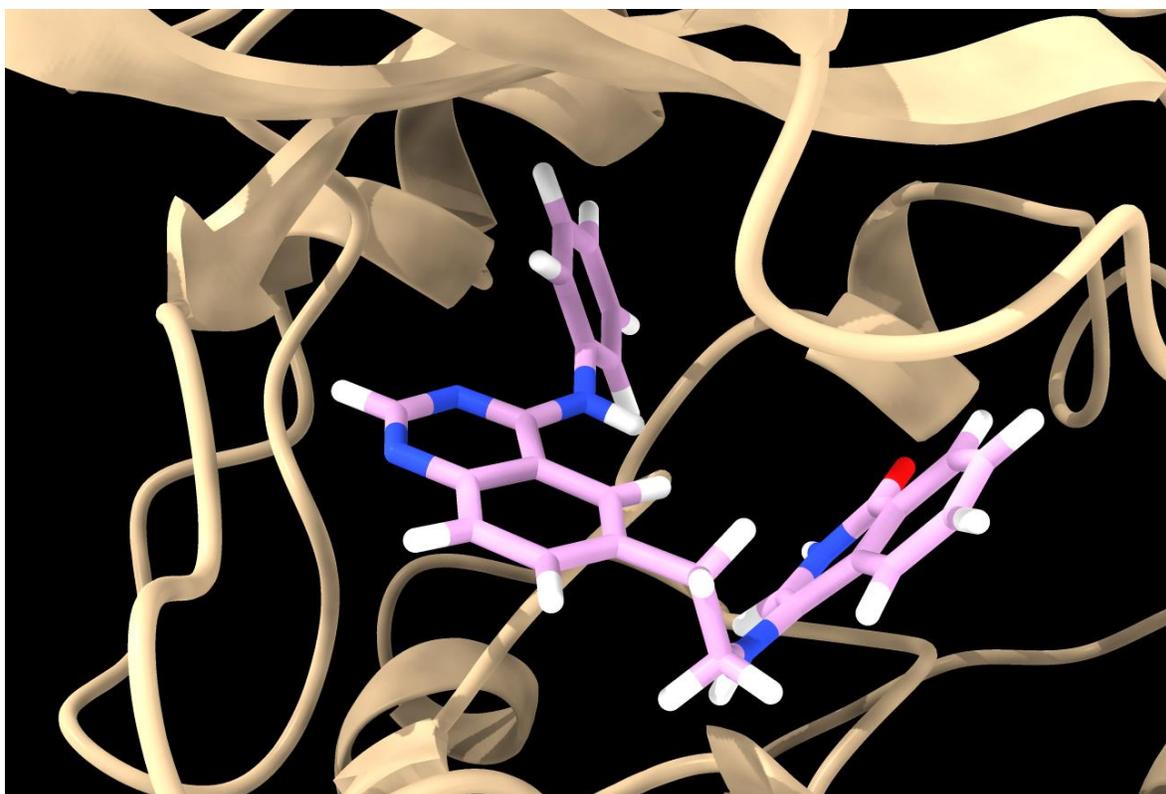


Figura A19. Modo de unión e interacciones de CUMO-11 en 2gs7

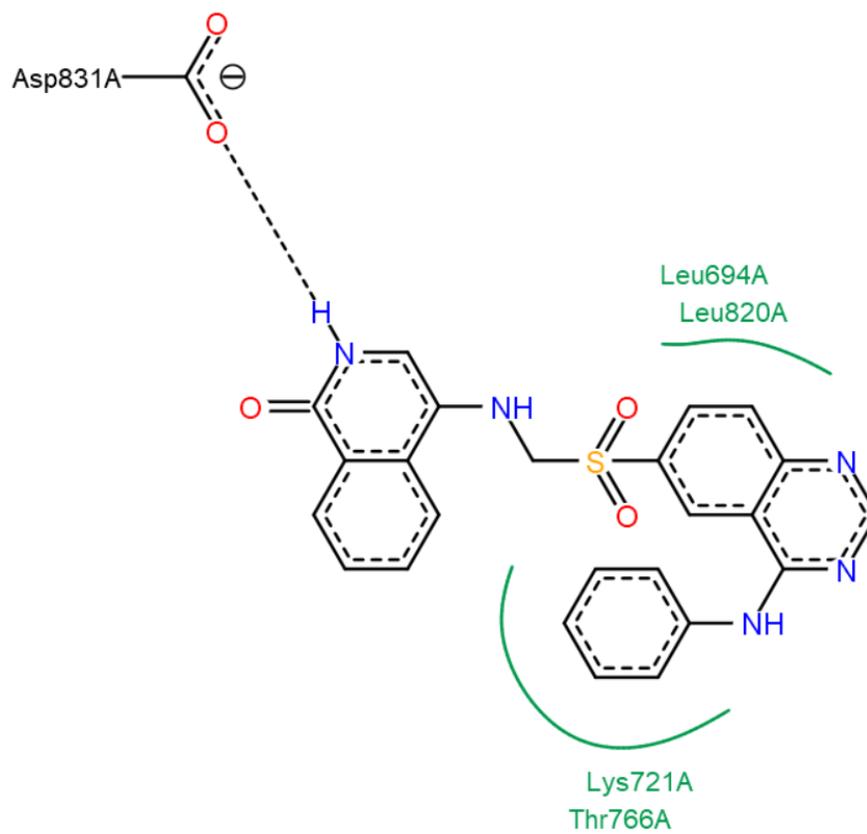
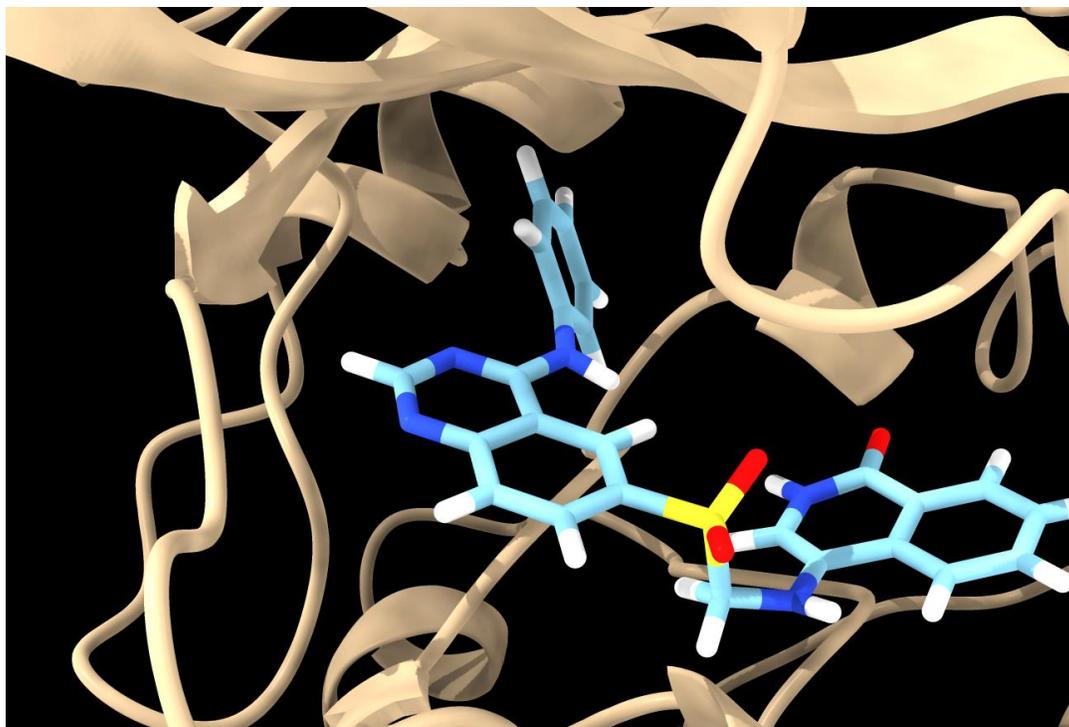


Figura A20. Modo de unión e interacciones de CUMO-12 en 2gs7

A4.3 Acoplamiento de serie AUMO en EGFR

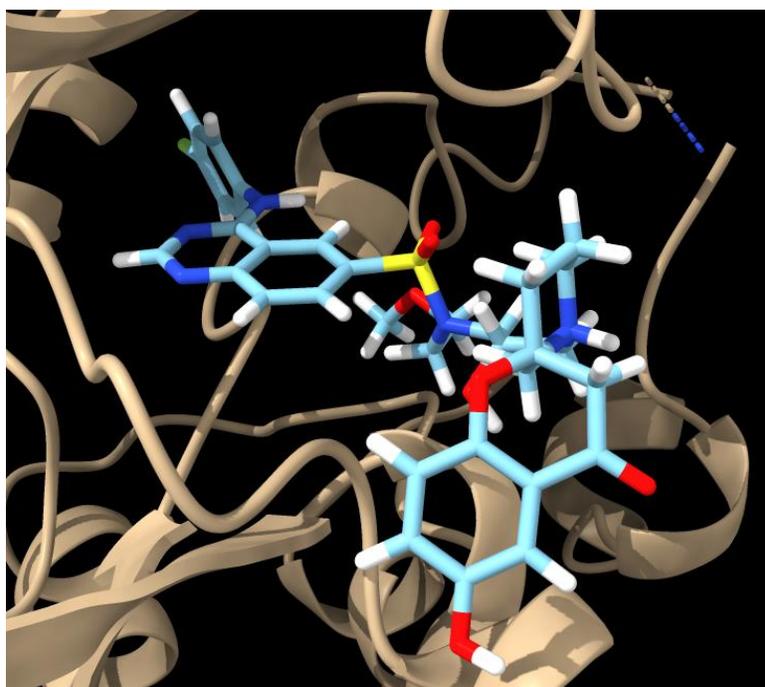
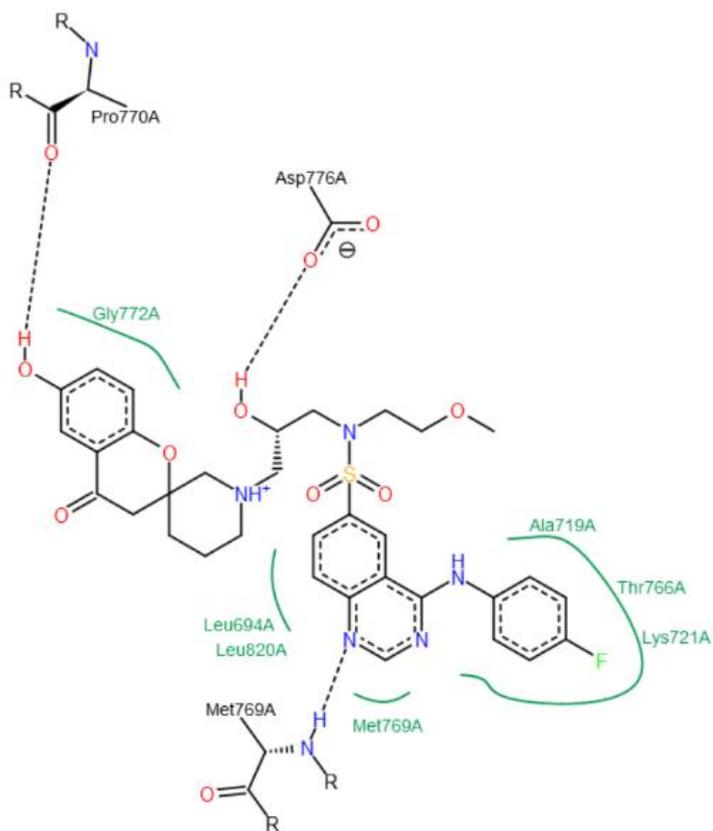


Figura A21. Modo de unión e interacciones de AUMO-2 en 2gs7

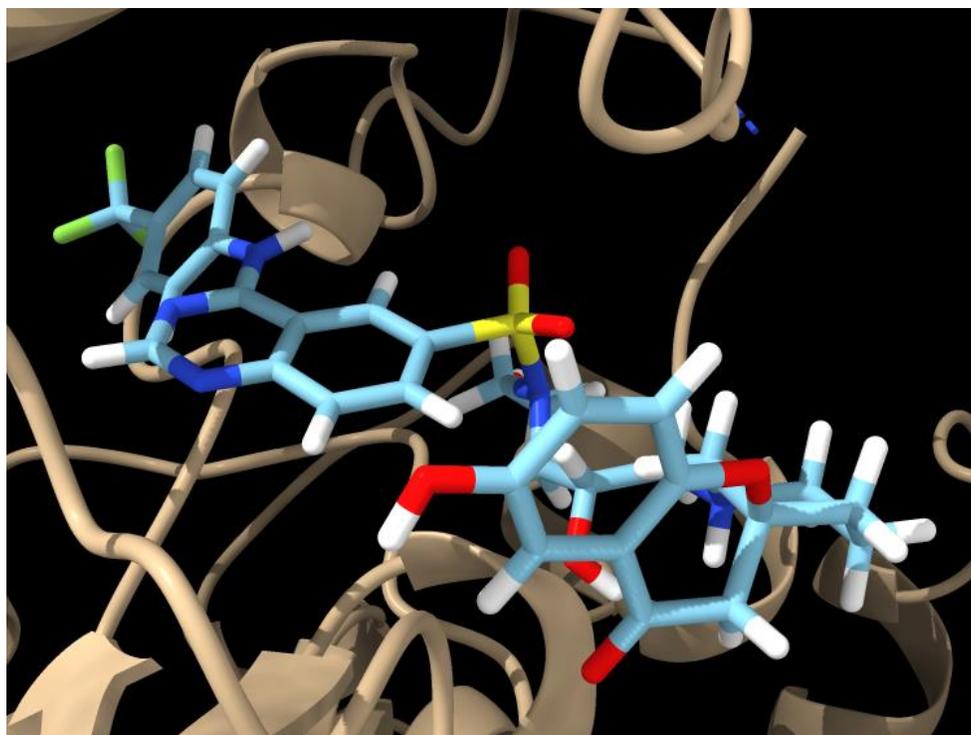
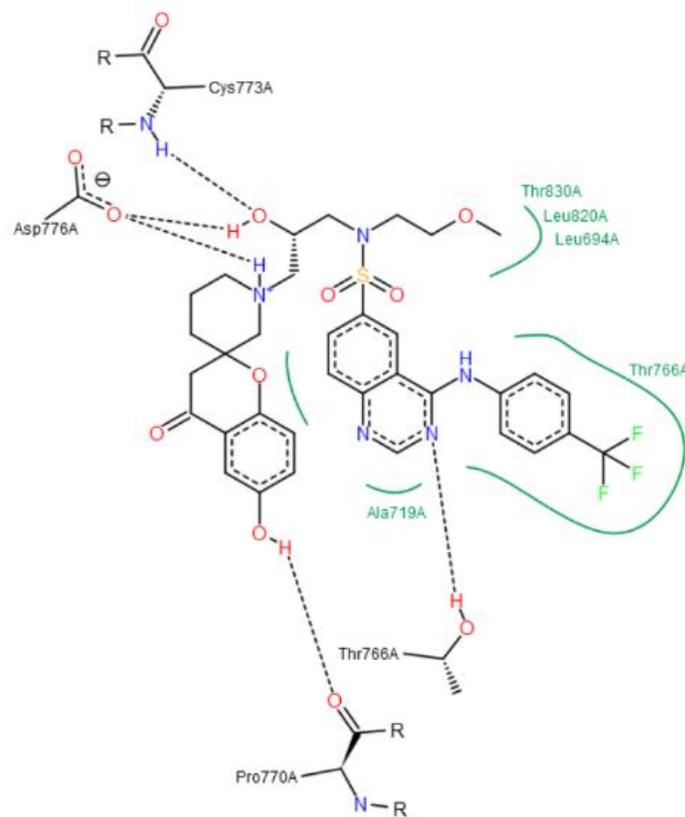


Figura A22. Modo de unión e interacciones de AUMO-3 en 2gs7

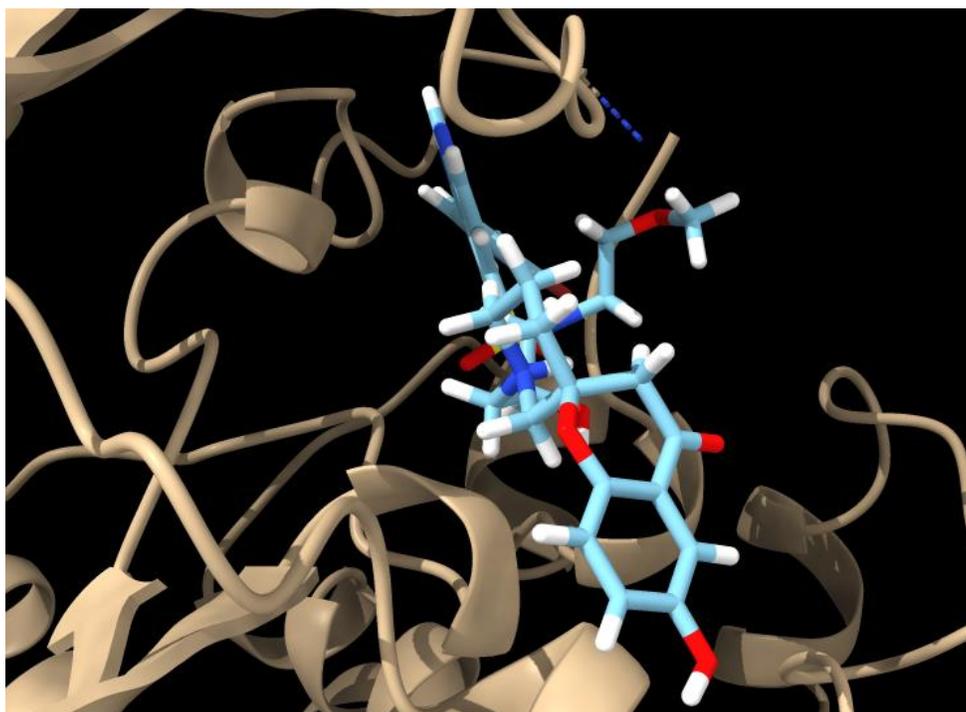
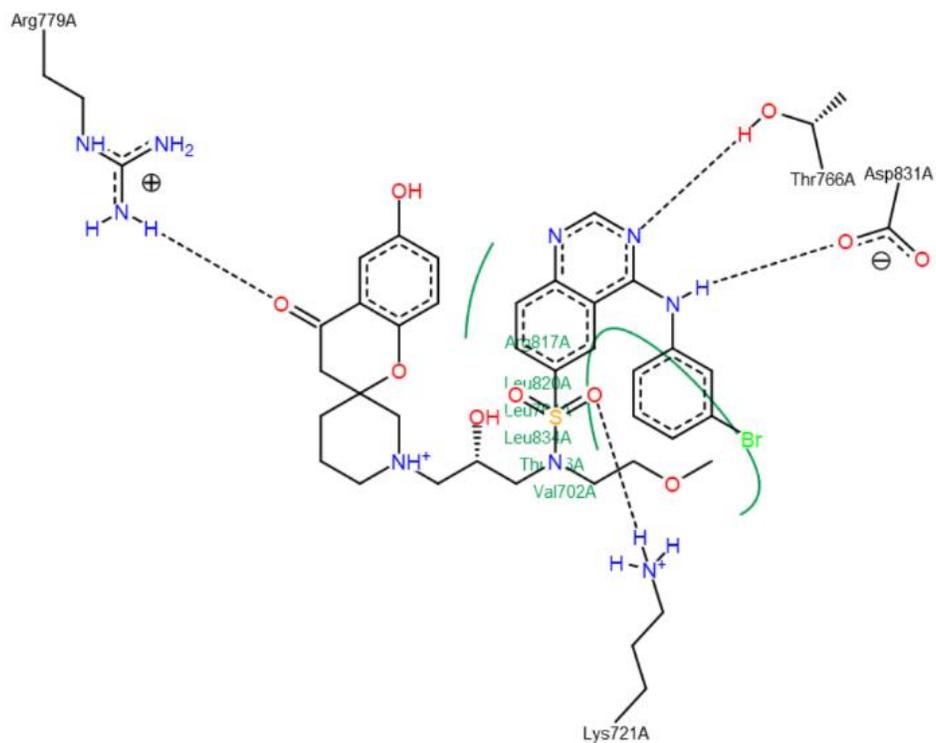


Figura A23. Modo de unión e interacciones de AUMO-4 en 2gs7

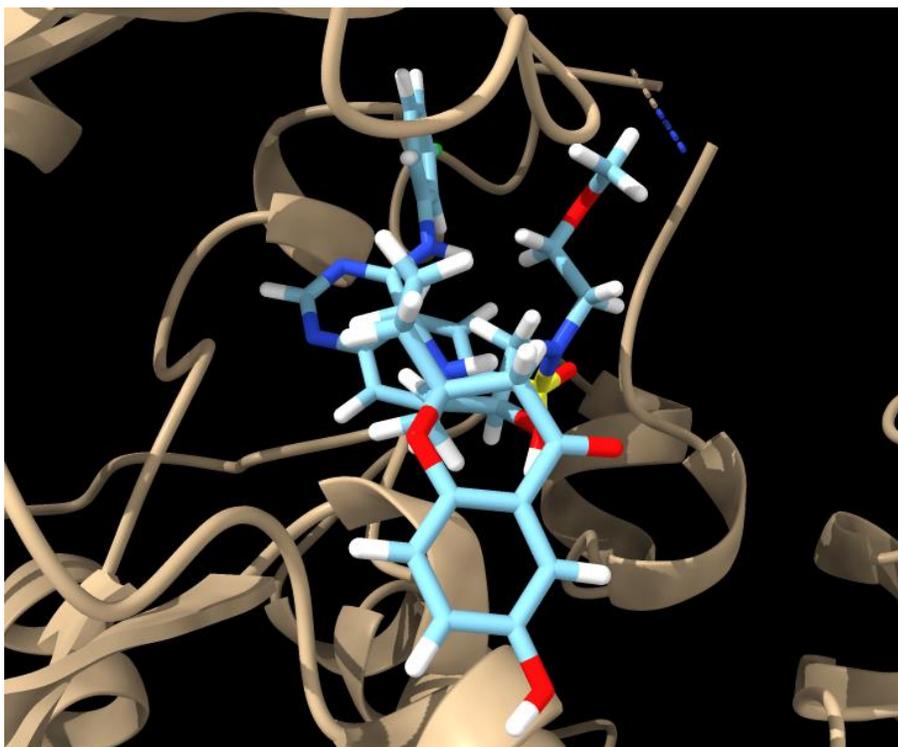
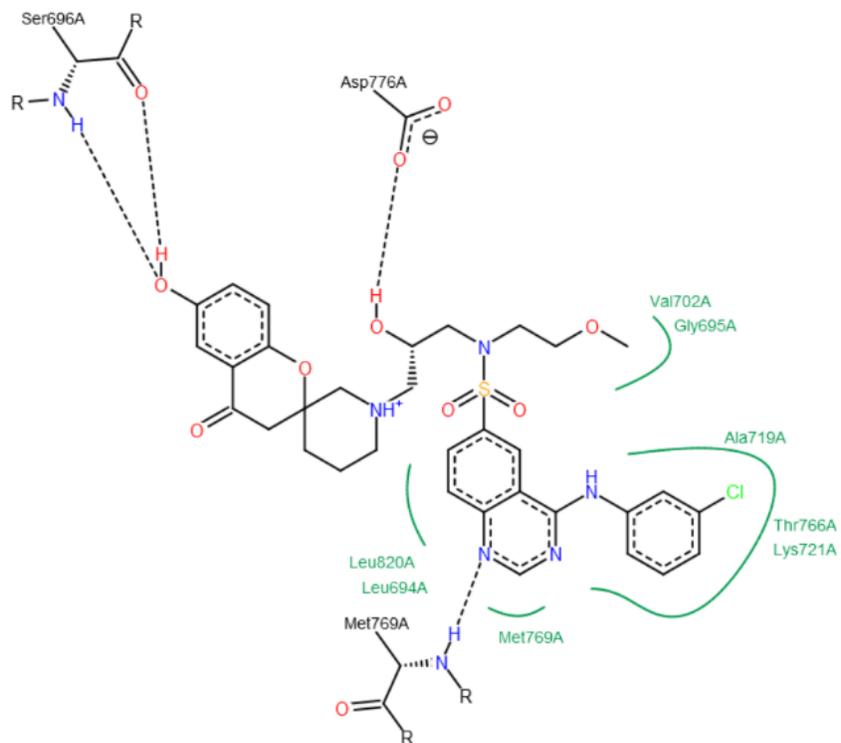


Figura A24. Modo de unión e interacciones de AUMO-5 en 2gs7

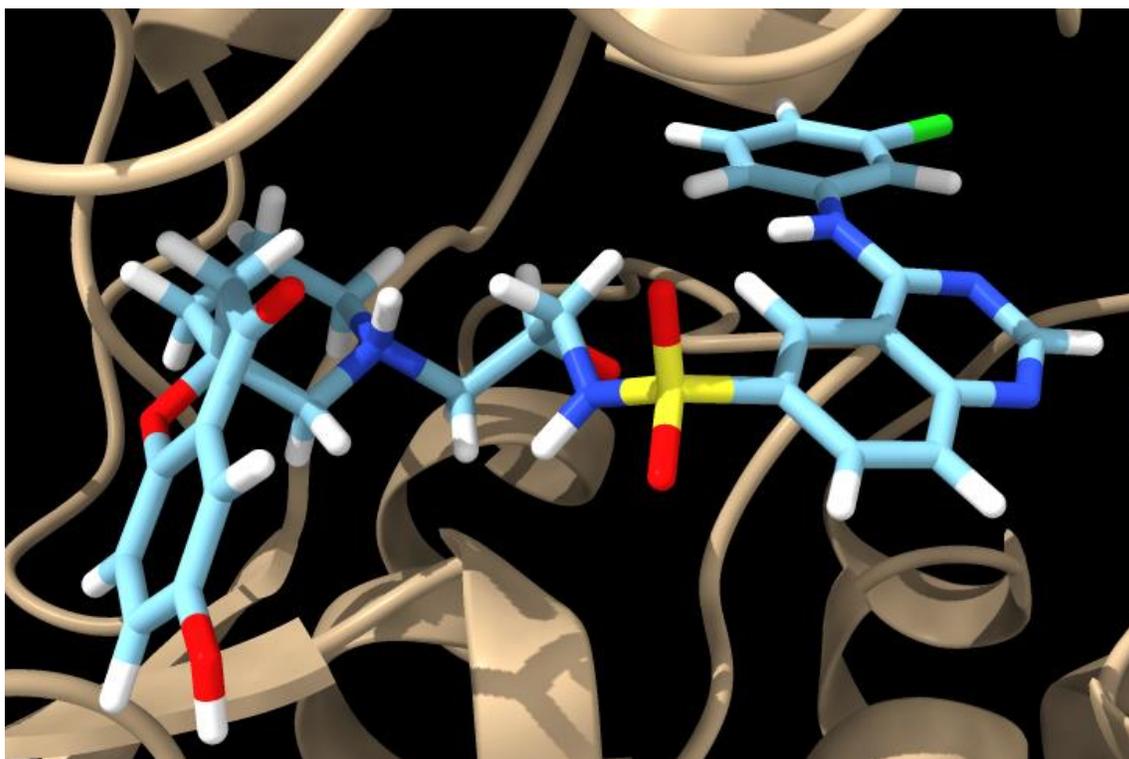
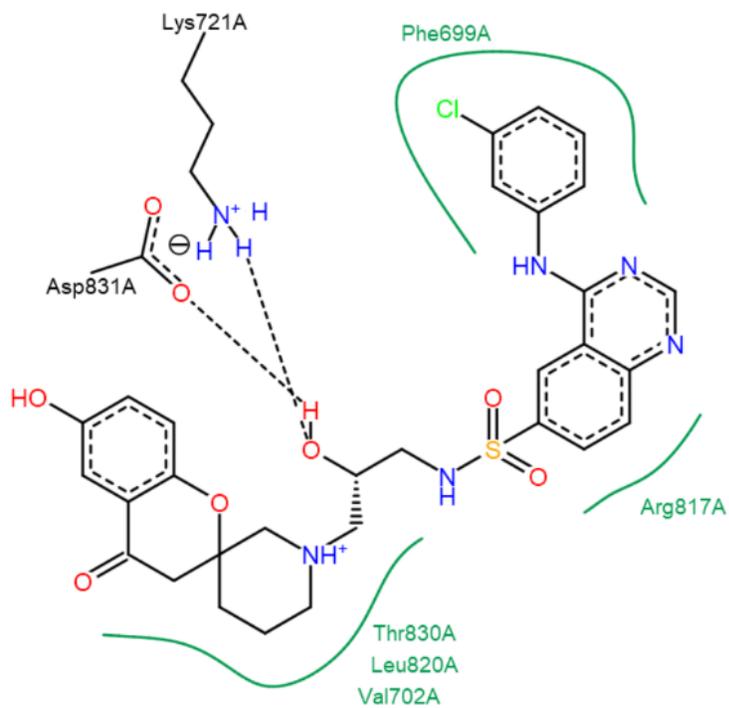


Figura A25. Modo de unión e interacciones de AUMO-6 en 2gs7

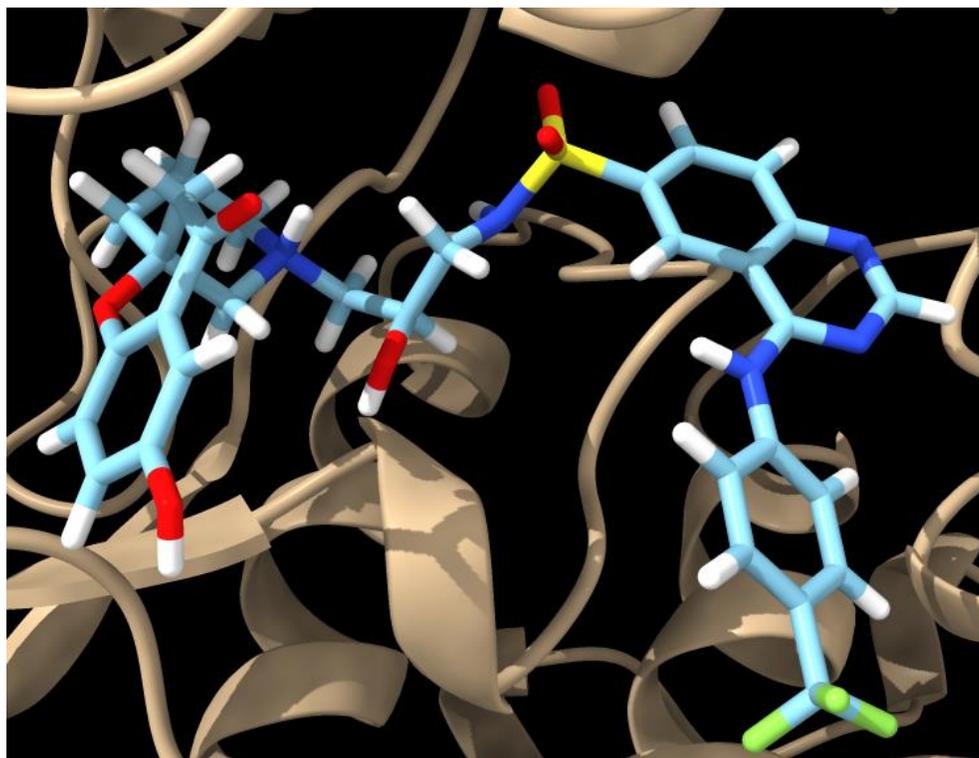
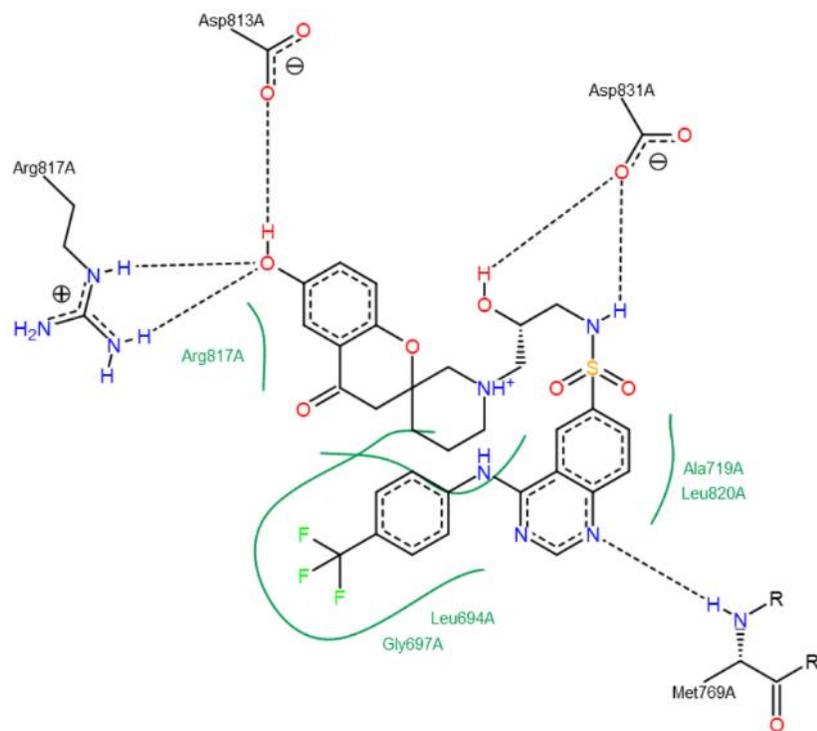


Figura A26. Modo de unión e interacciones de AUMO-7 en 2gs7

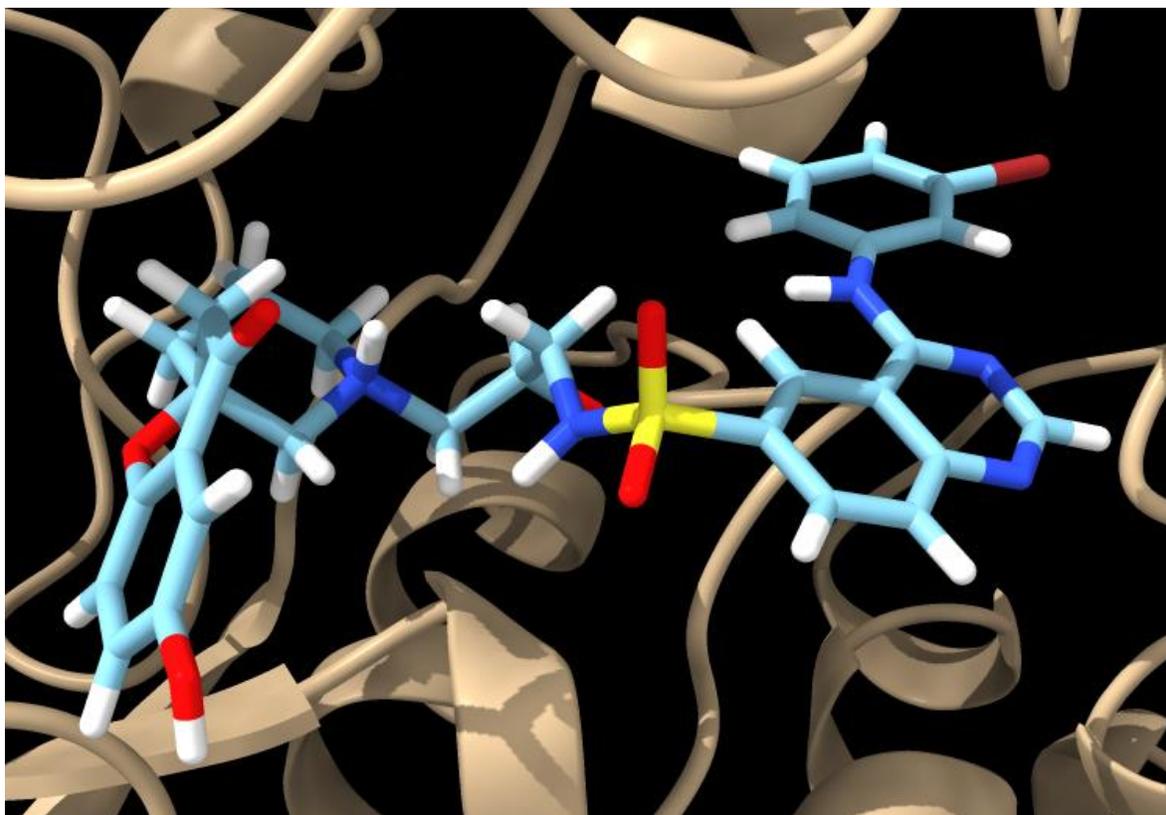
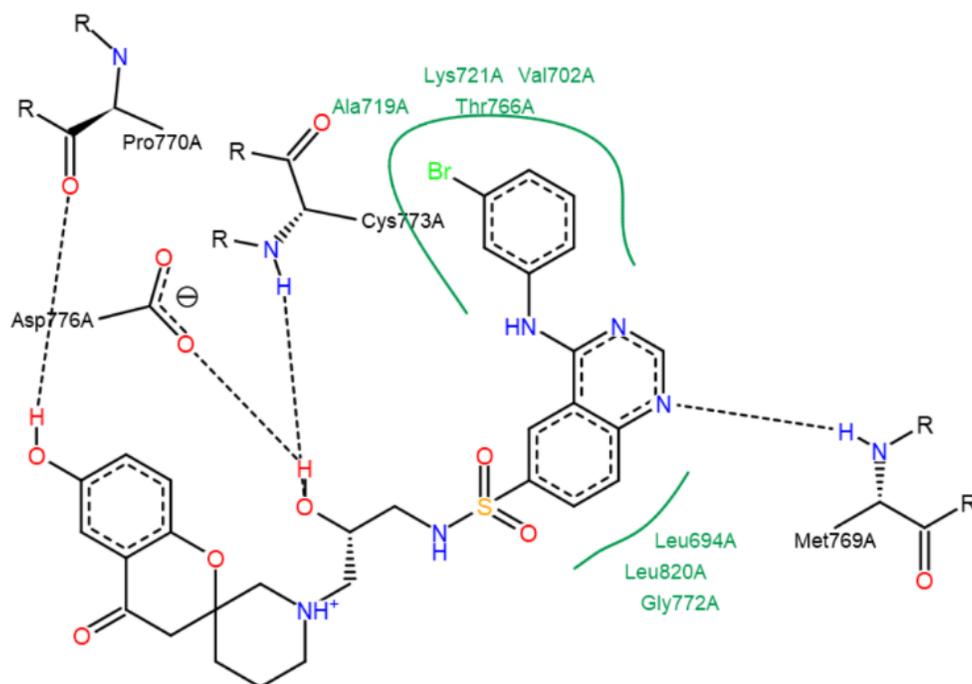


Figura A27. Modo de unión e interacciones de AUMO-8 en 2gs7

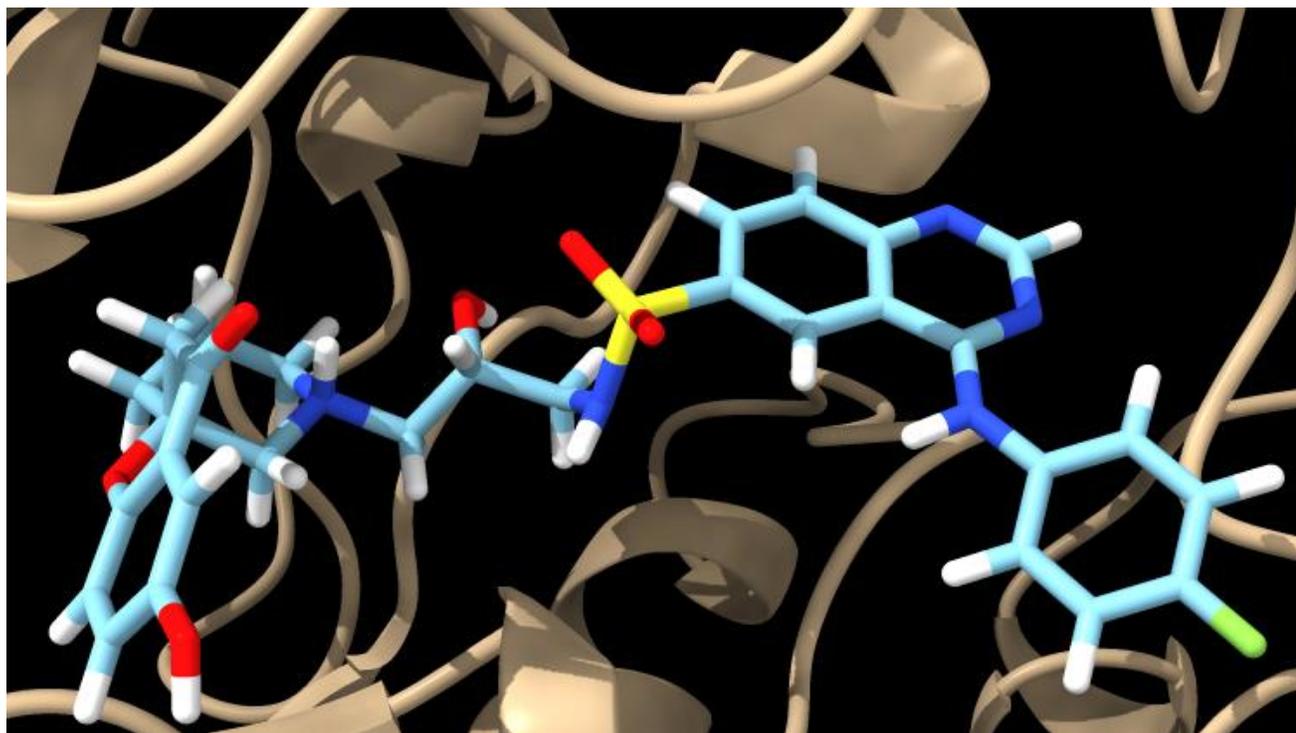
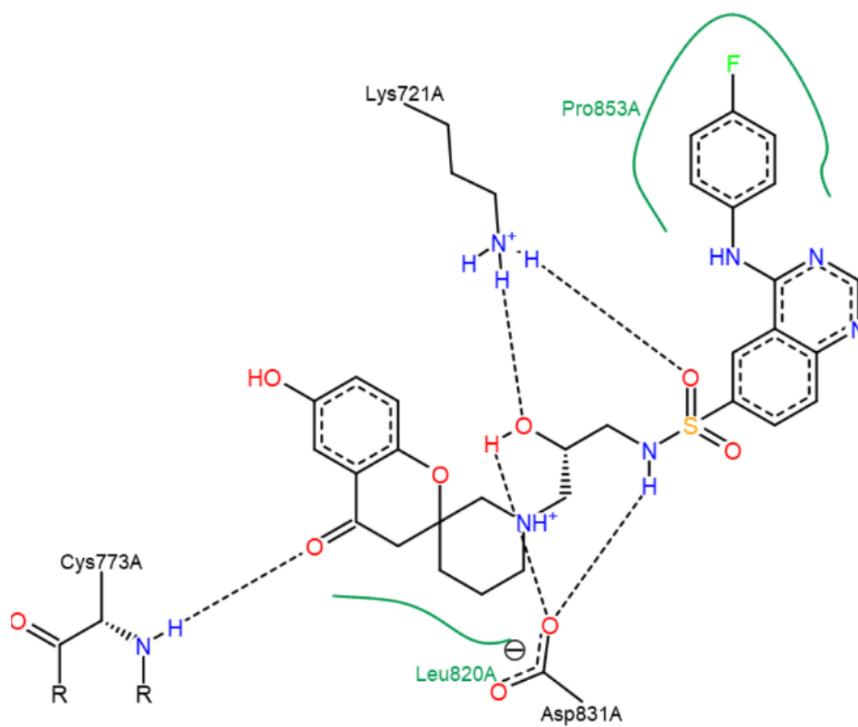


Figura A28. Modo de unión e interacciones de AUMO-9 en 2gs7

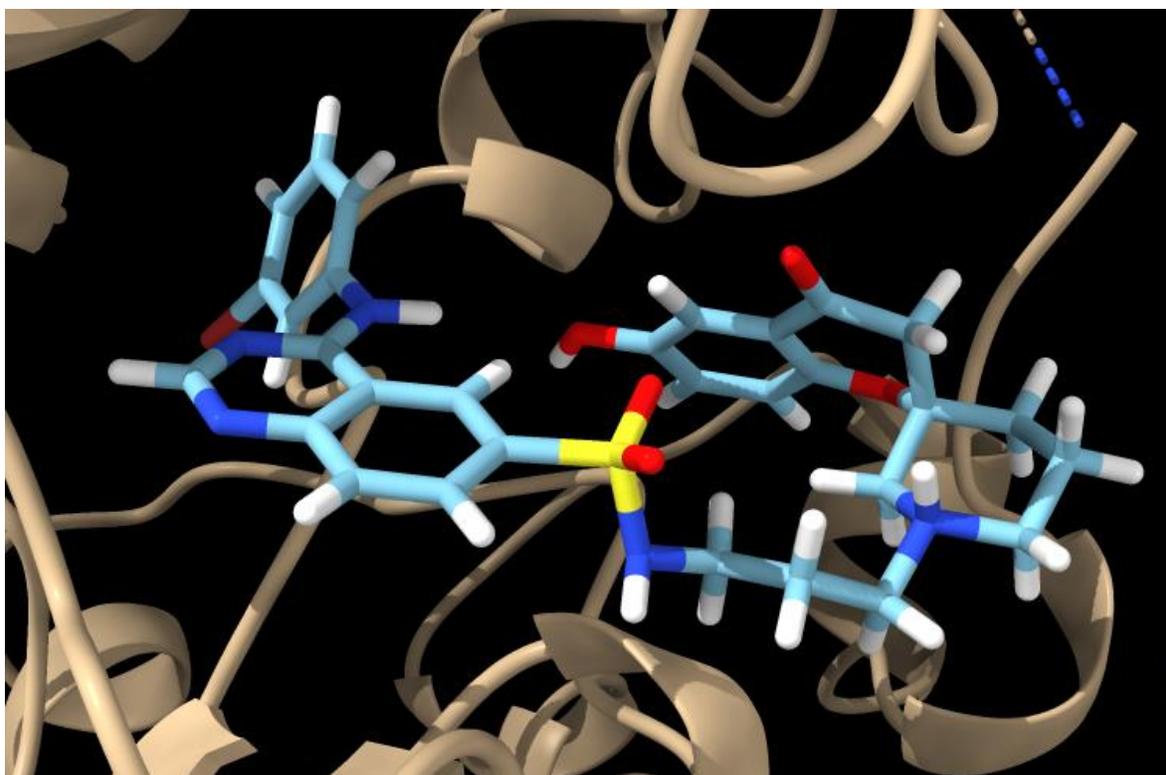
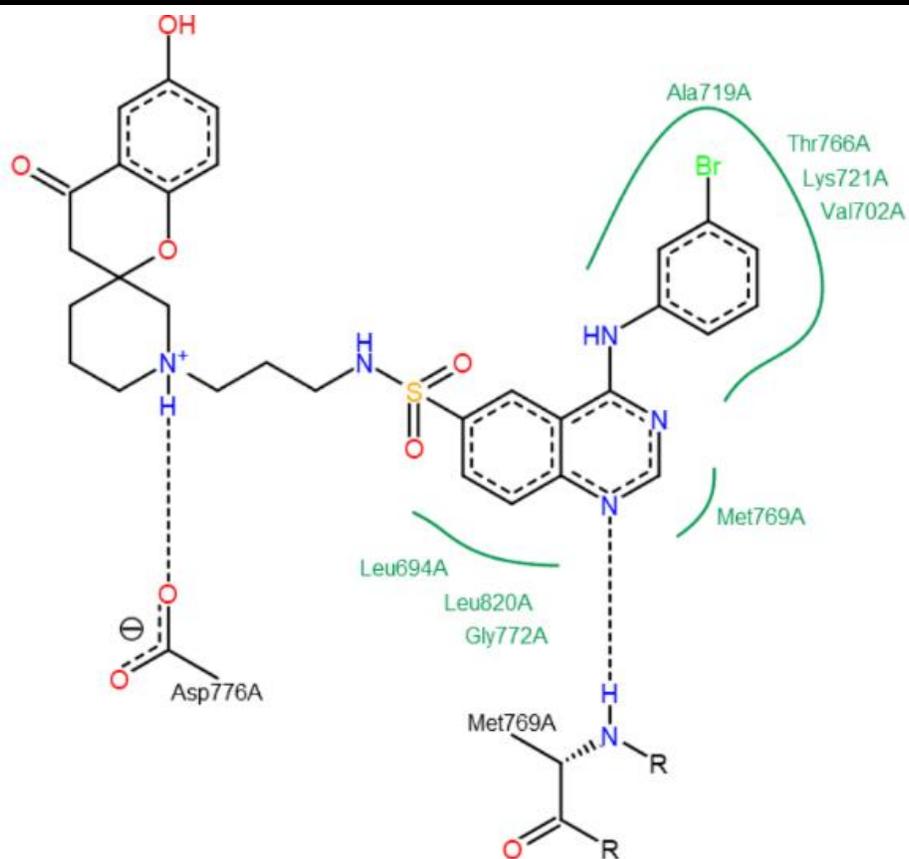


Figura A29. Modo de unión e interacciones de AUMO-10 en 2gs7

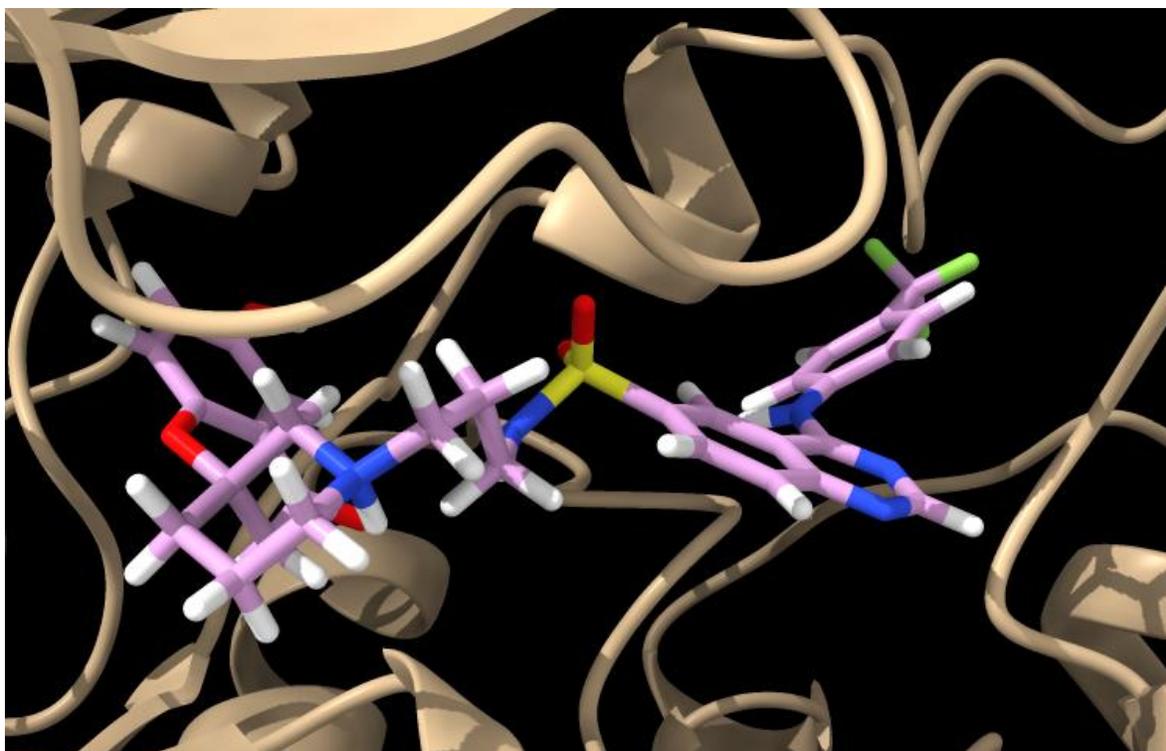
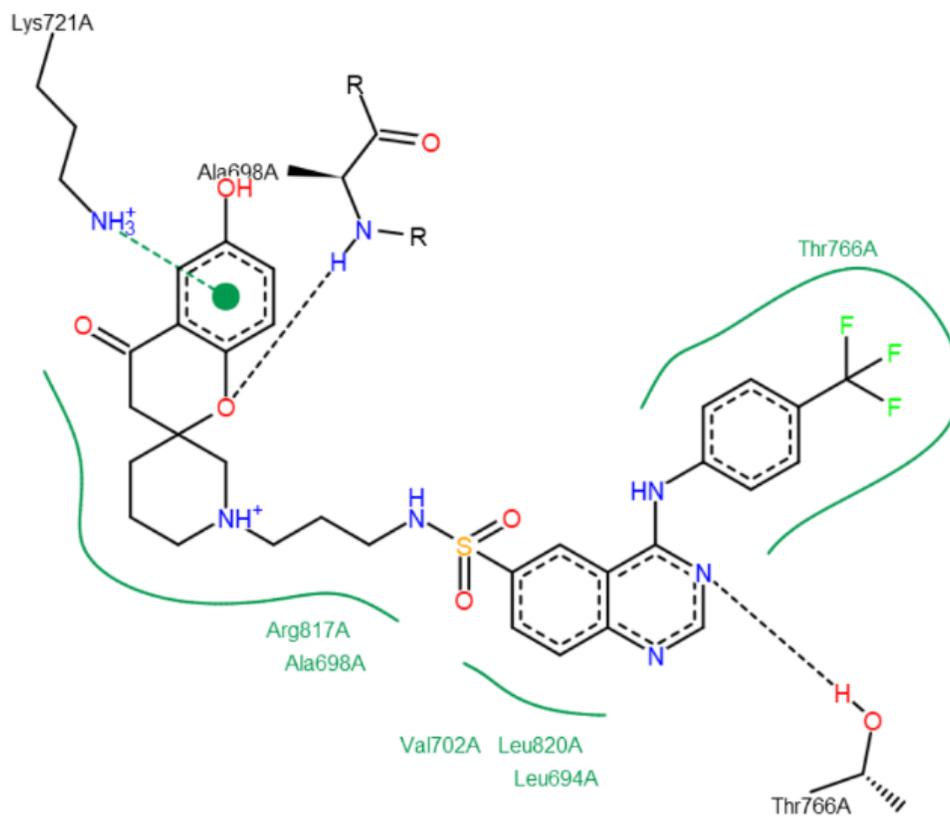
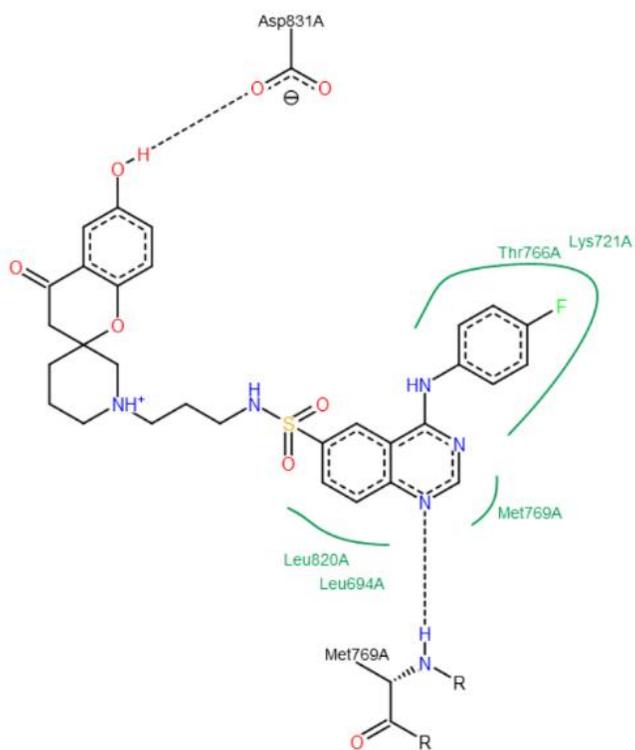


Figura A30. Modo de unión e interacciones de AUMO-11 en 2gs7



V

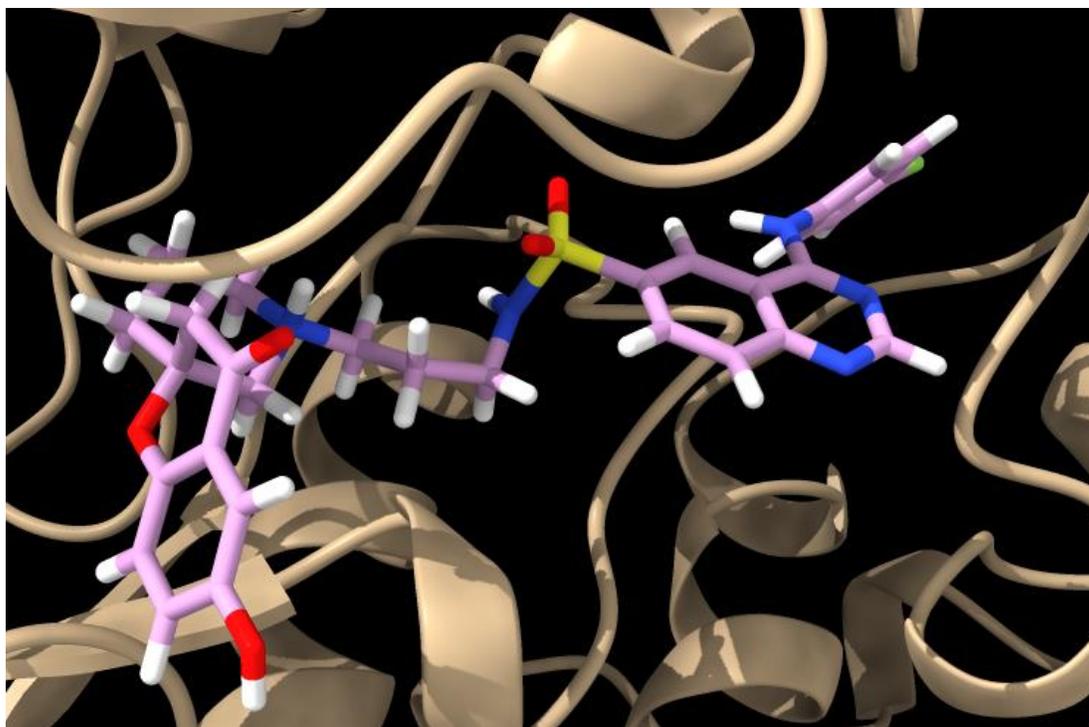


Figura A31. Modo de unión e interacciones de AUMO-12 en 2gs7

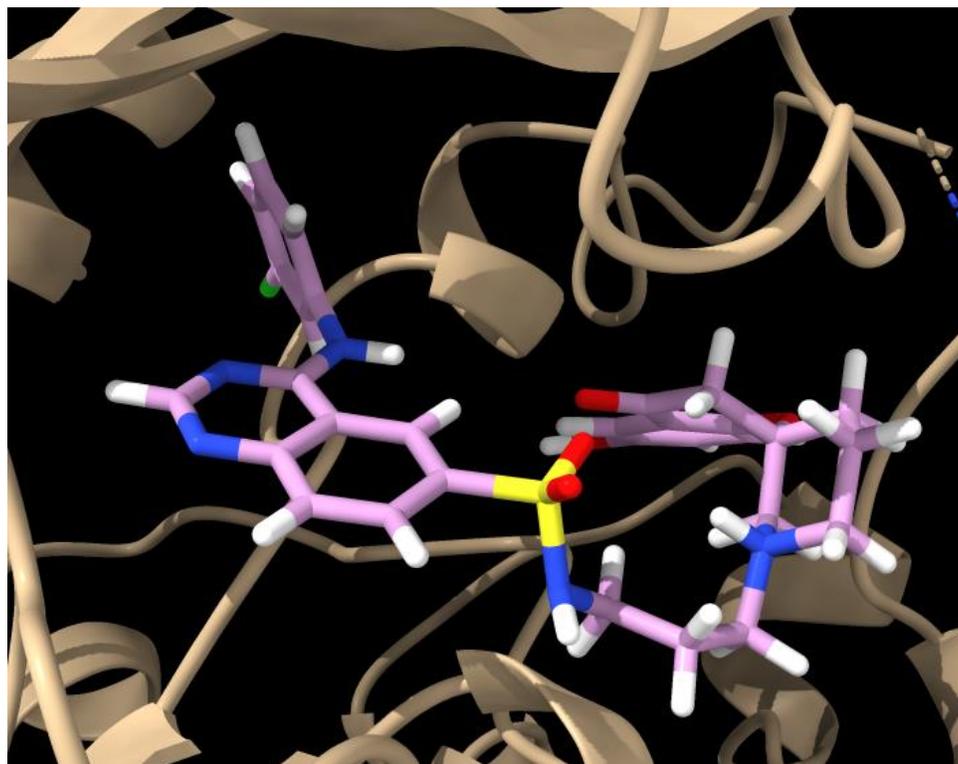
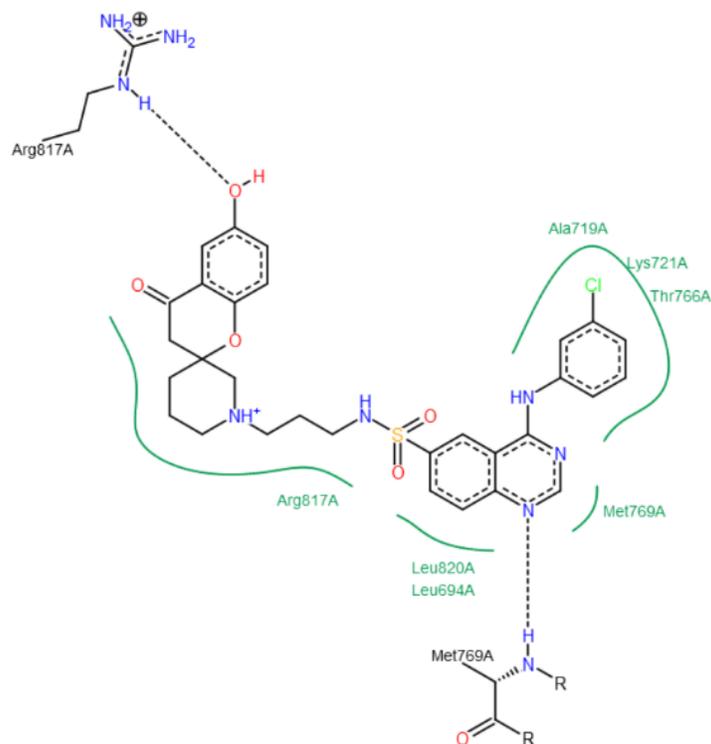


Figura A32. Modo de unión e interacciones de AUMO-13 en 2gs7

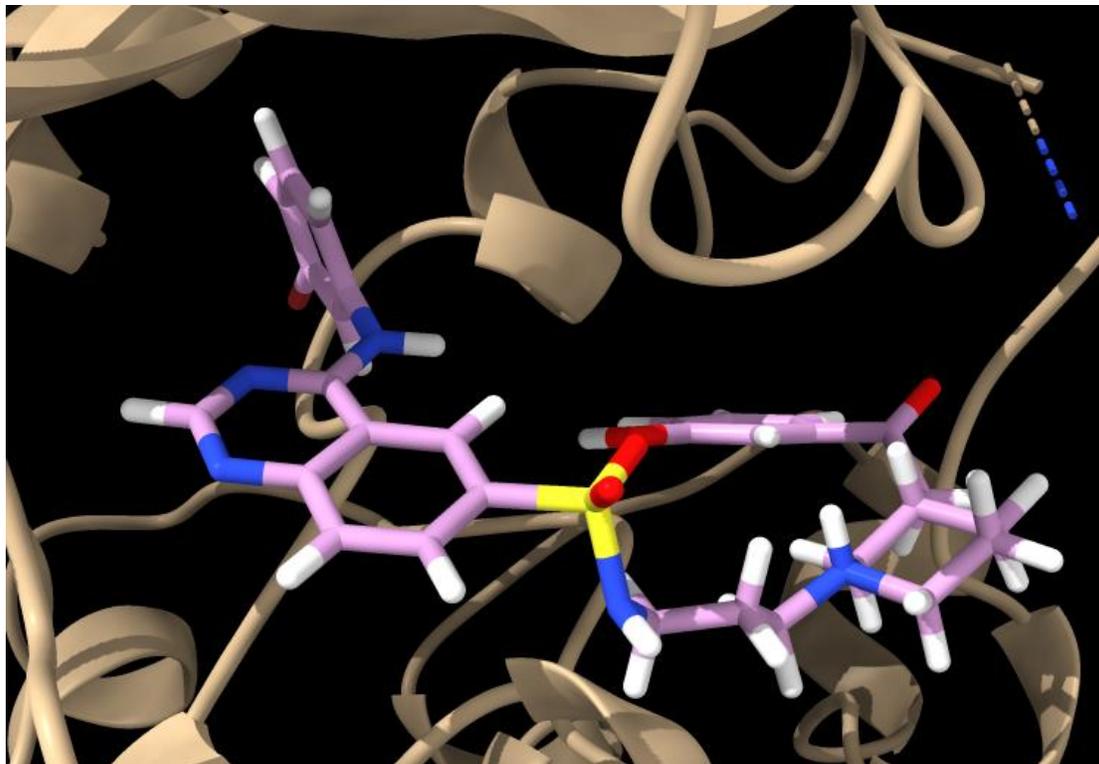
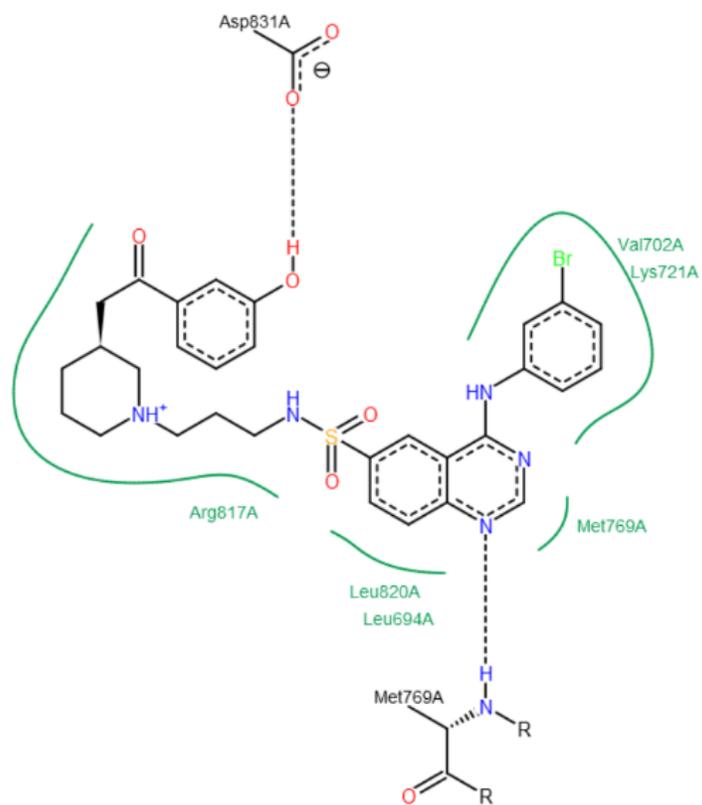


Figura A33. Modo de unión e interacciones de AUMO-14 en 2gs7

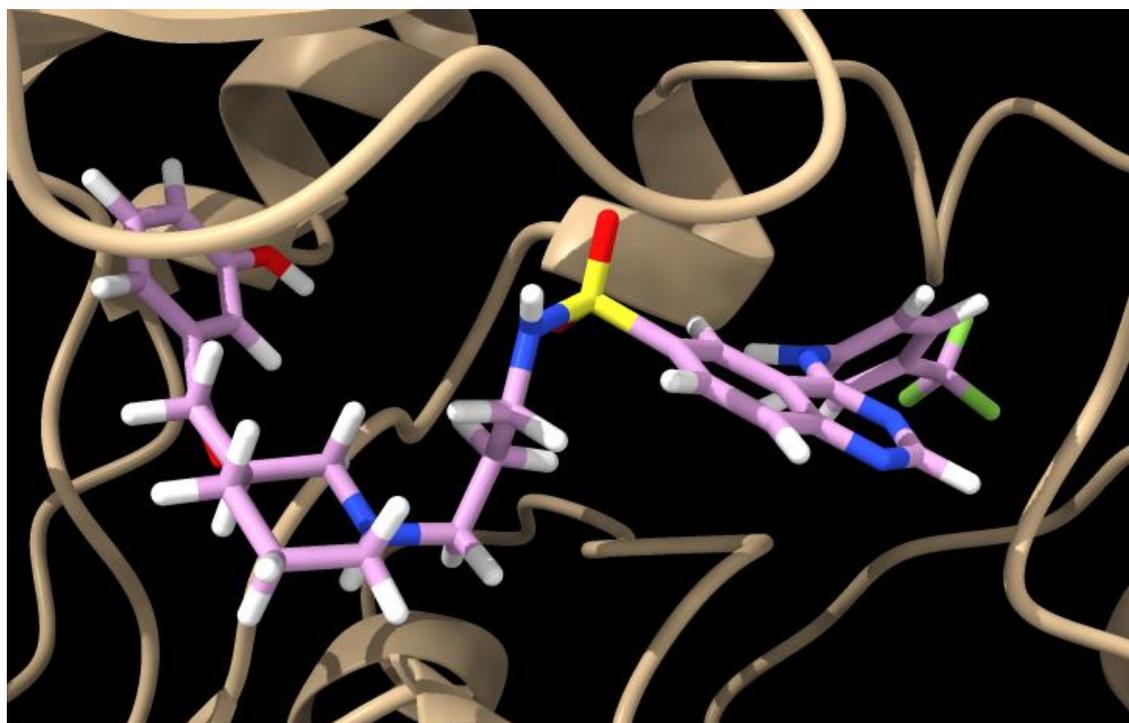
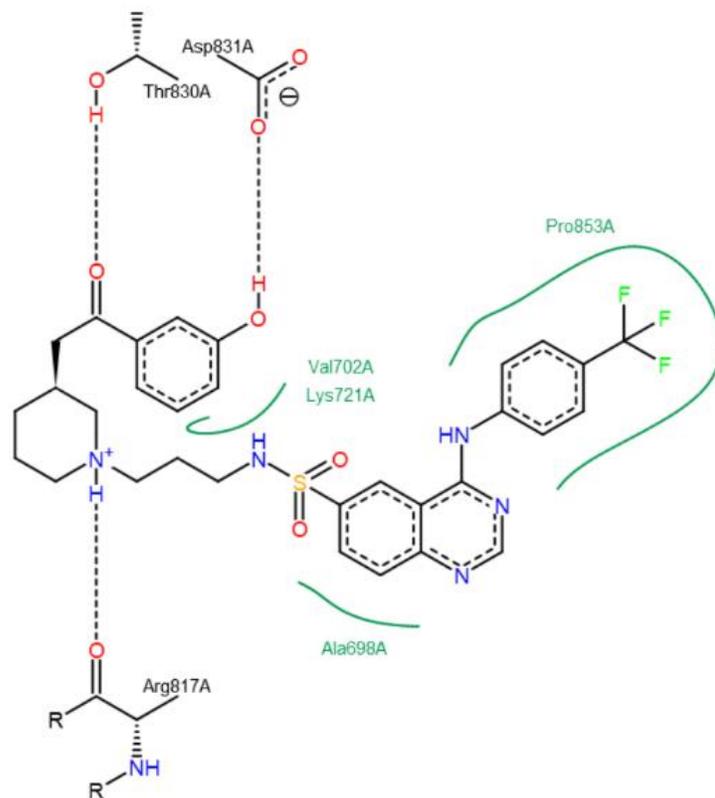


Figura A34. Modo de unión e interacciones de AUMO-15 en 2gs7

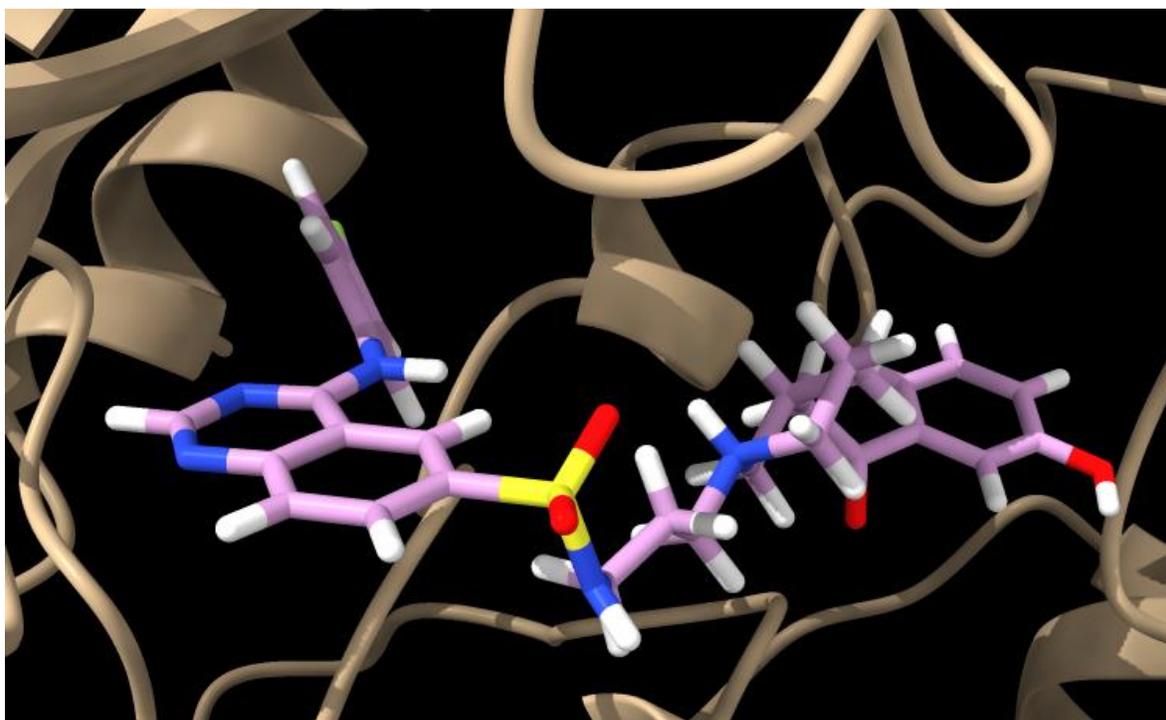
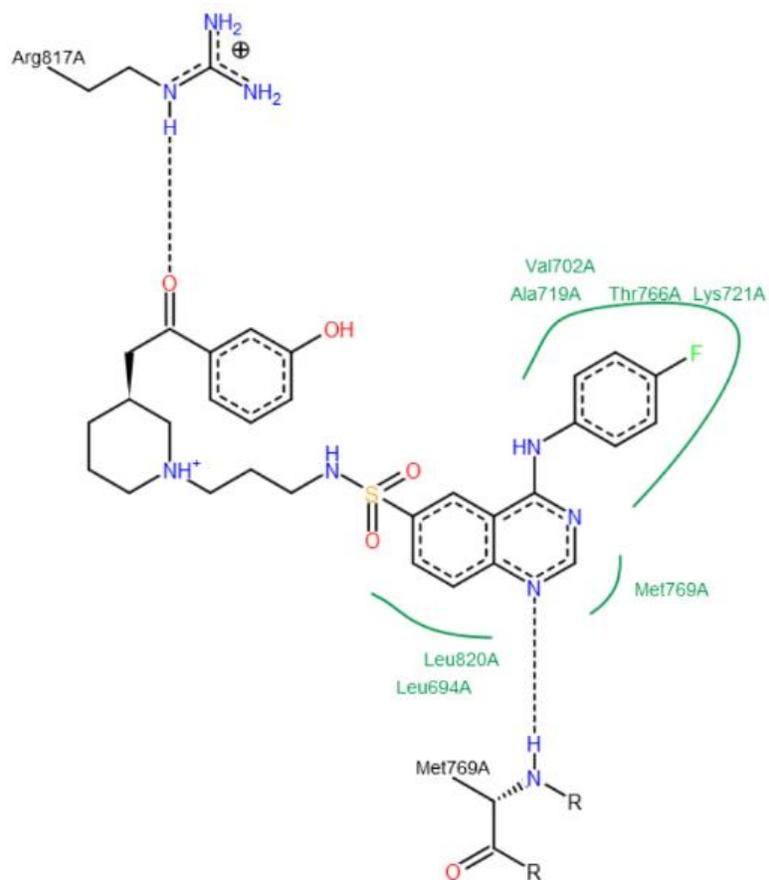


Figura A35. Modo de unión e interacciones de AUMO-16 en 2gs7

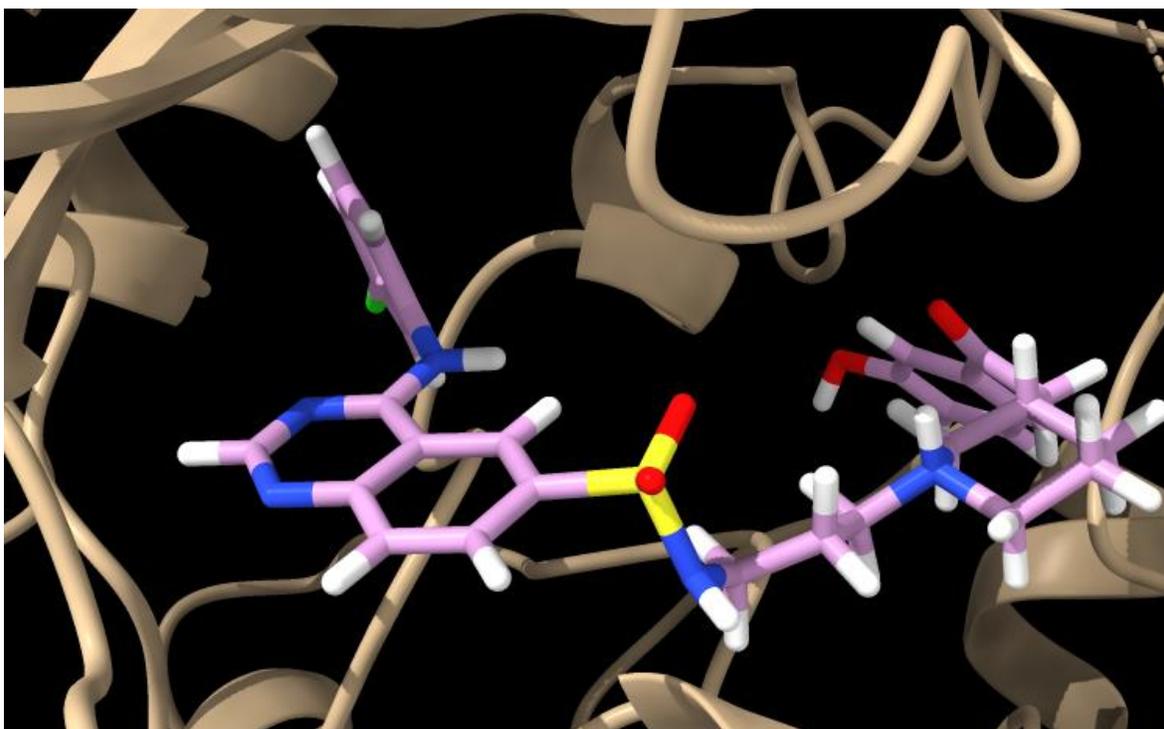
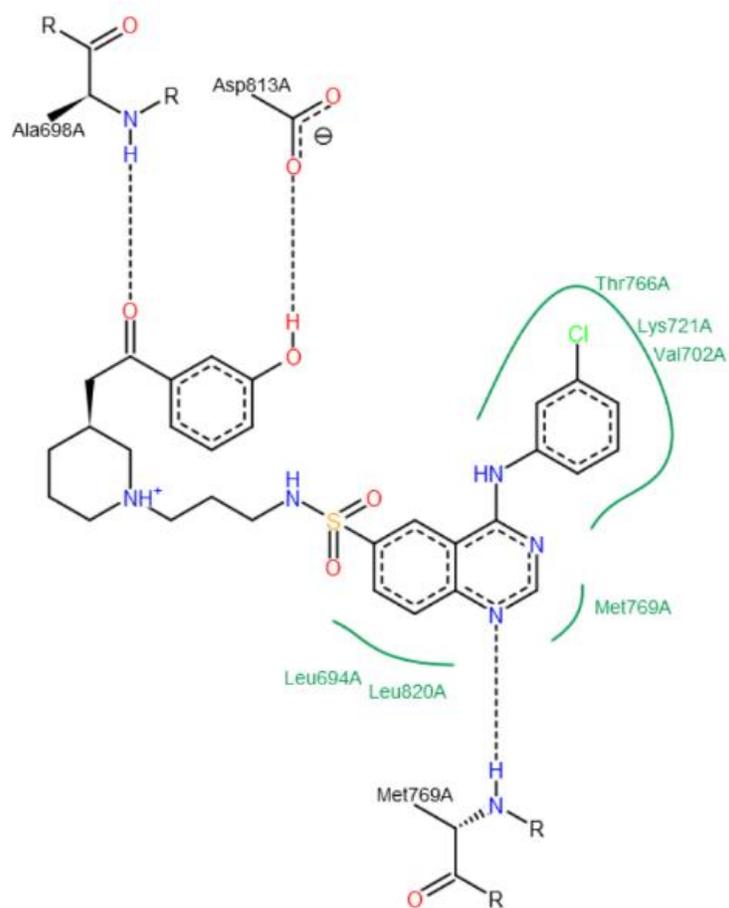


Figura A36. Modo de unión e interacciones de AUMO-17 en 2gs7

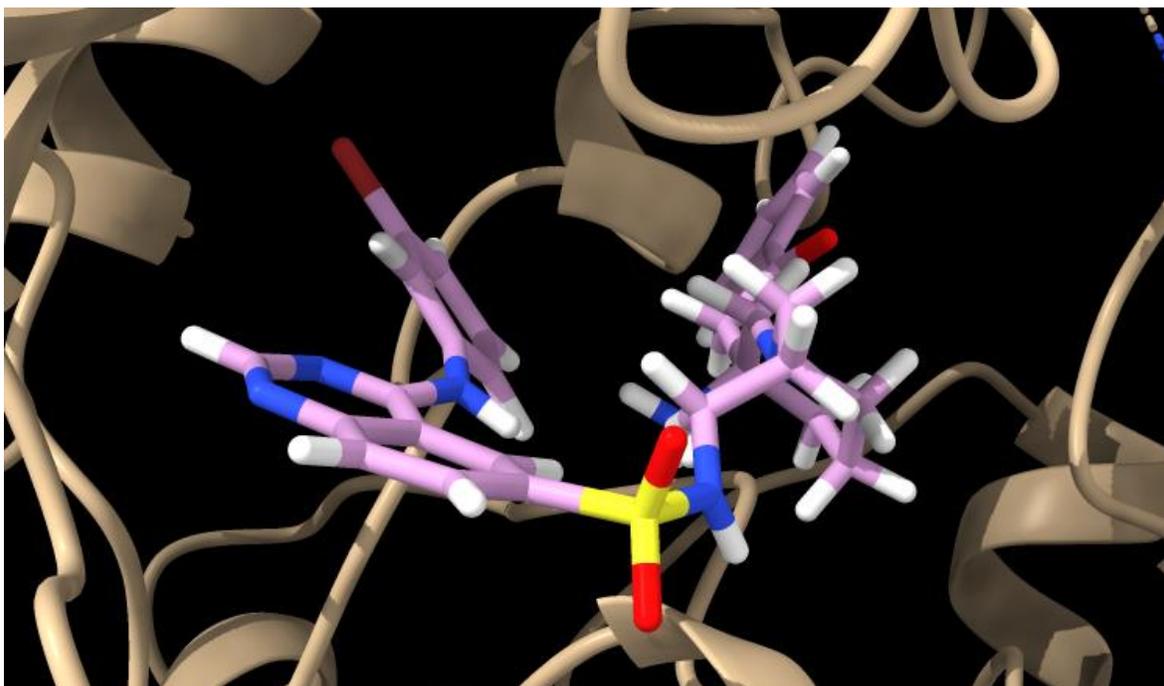
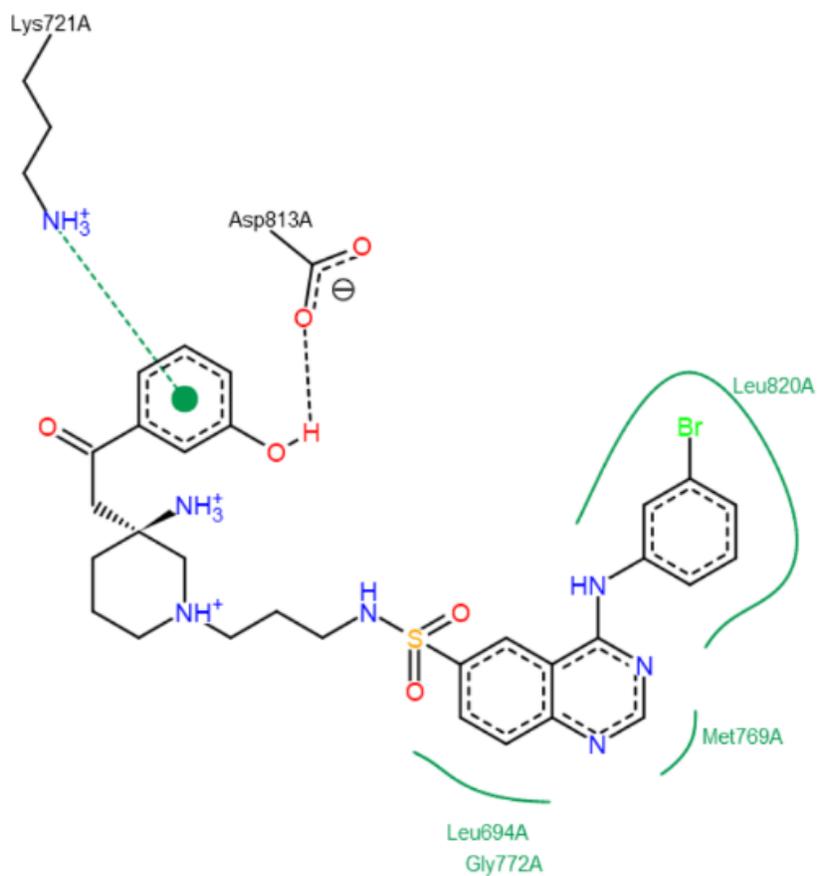


Figura A37. Modo de unión e interacciones de AUMO-18 en 2gs7

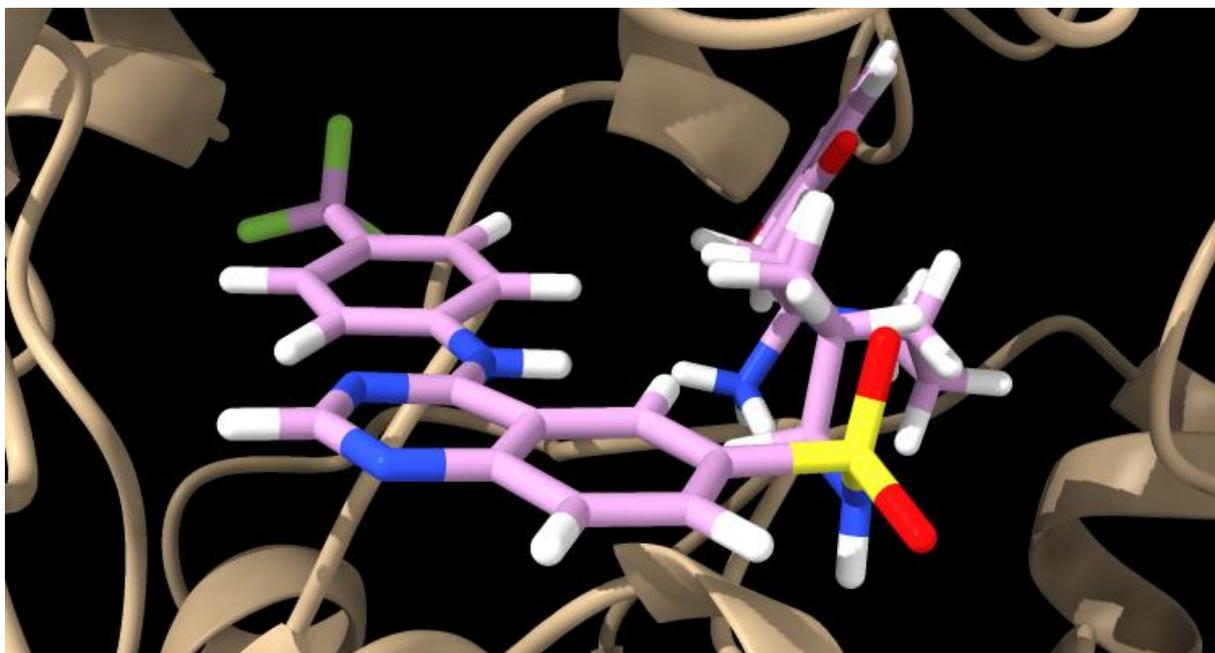
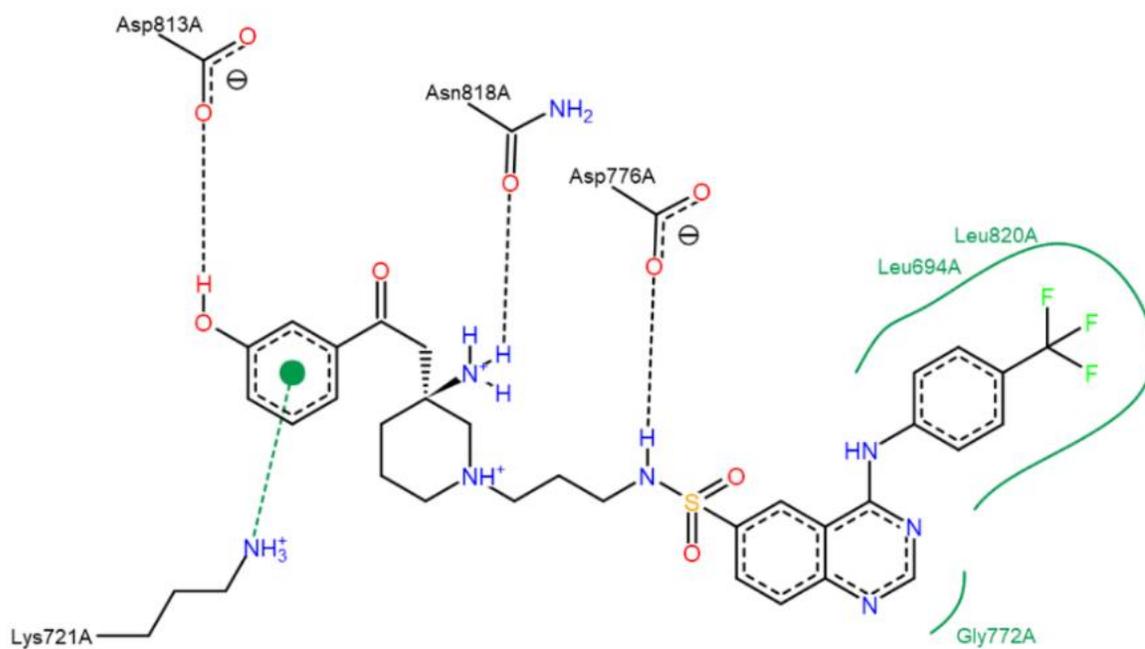


Figura A38. Modo de unión e interacciones de AUMO-19 en 2gs7

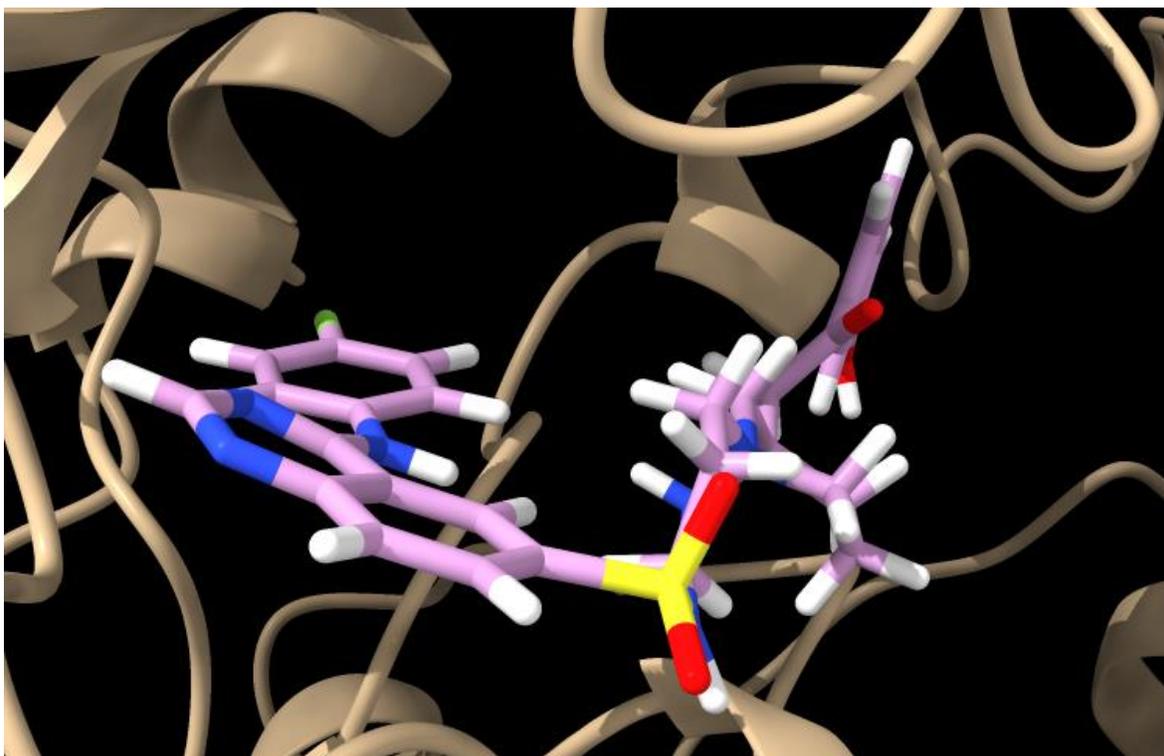
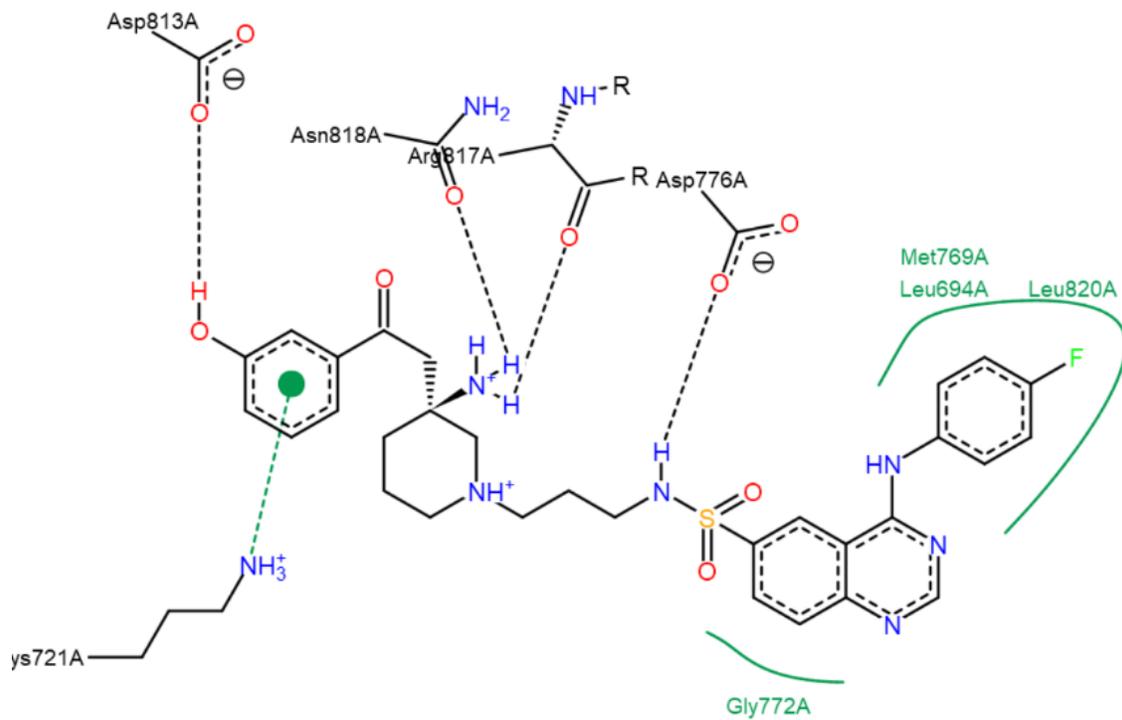


Figura A39. Modo de unión e interacciones de AUMO-20 en 2gs7

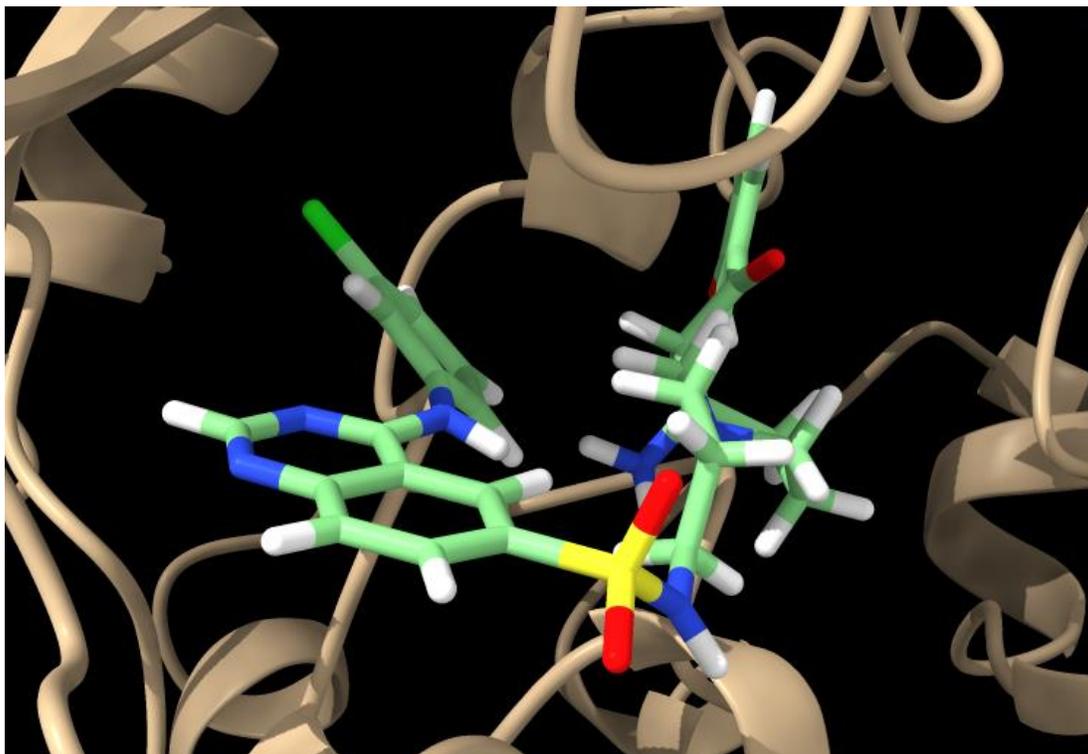
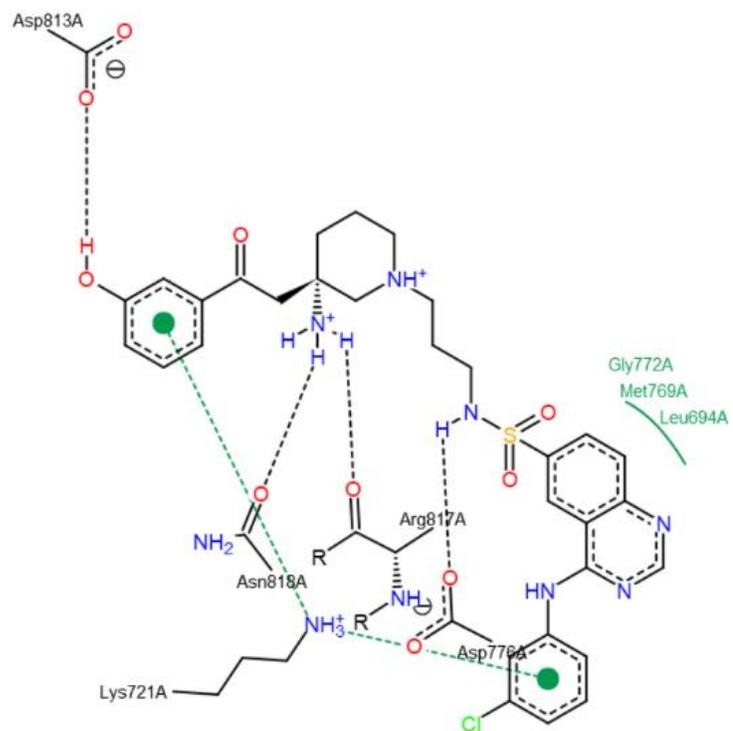


Figura A40. Modo de unión e interacciones de AUMO-21 en 2gs7

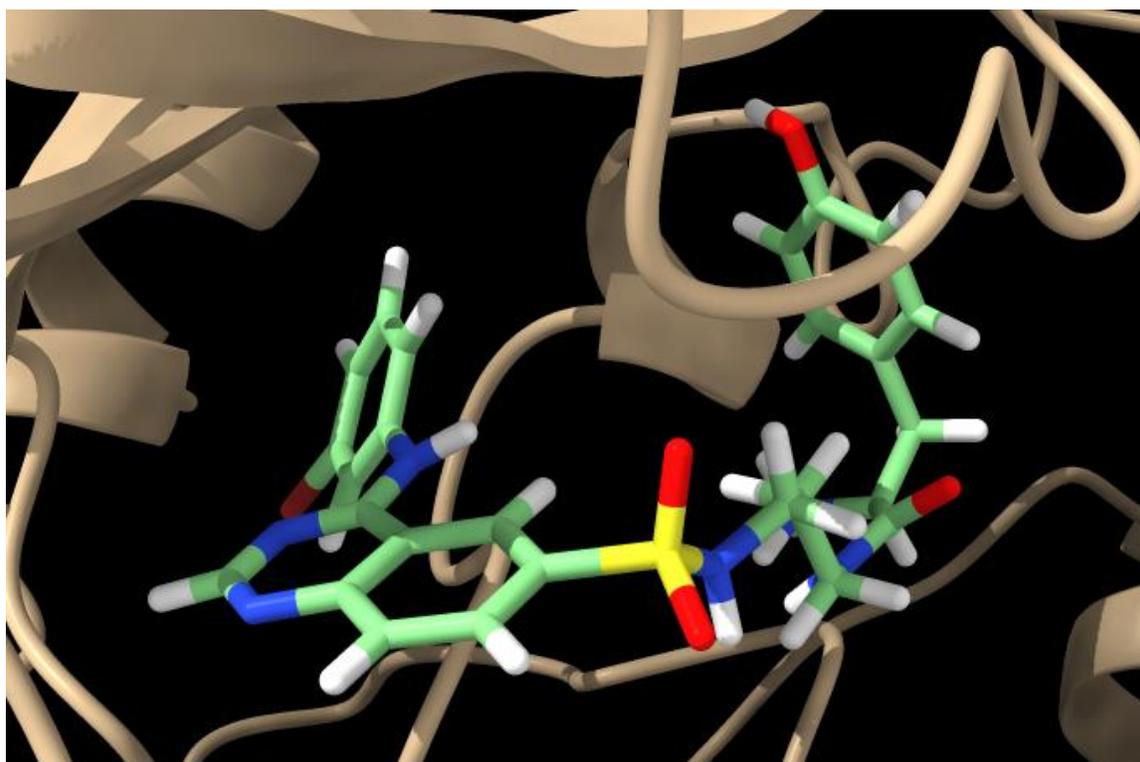
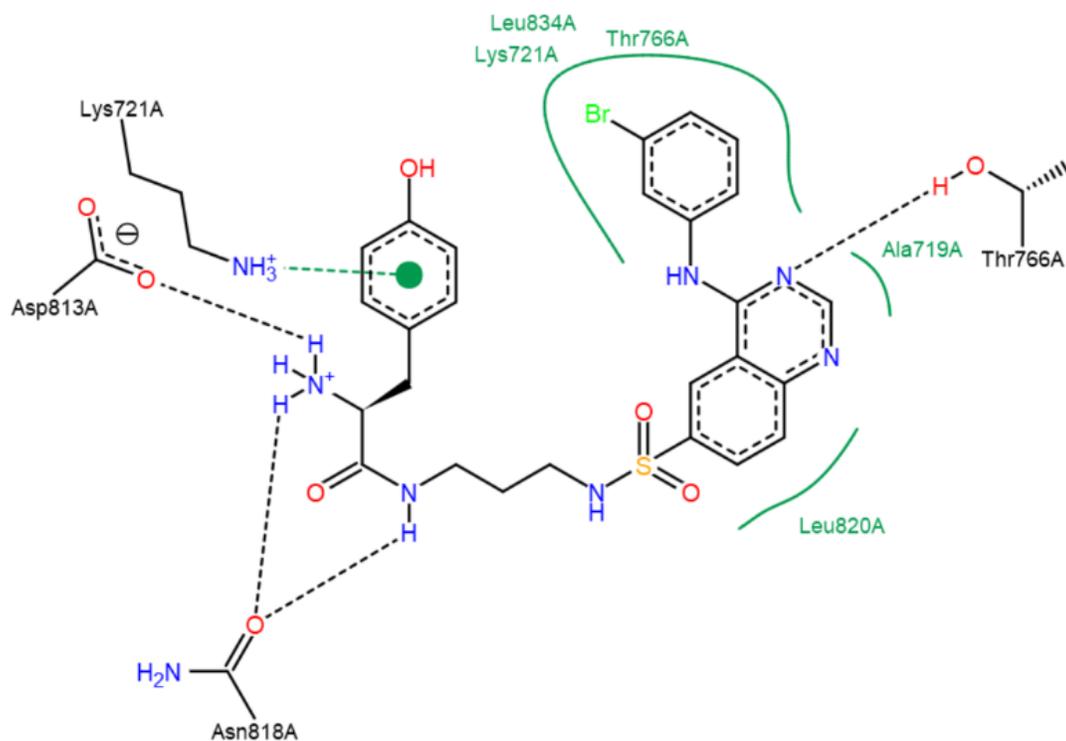


Figura A41. Modo de unión e interacciones de AUMO-22 en 2gs7

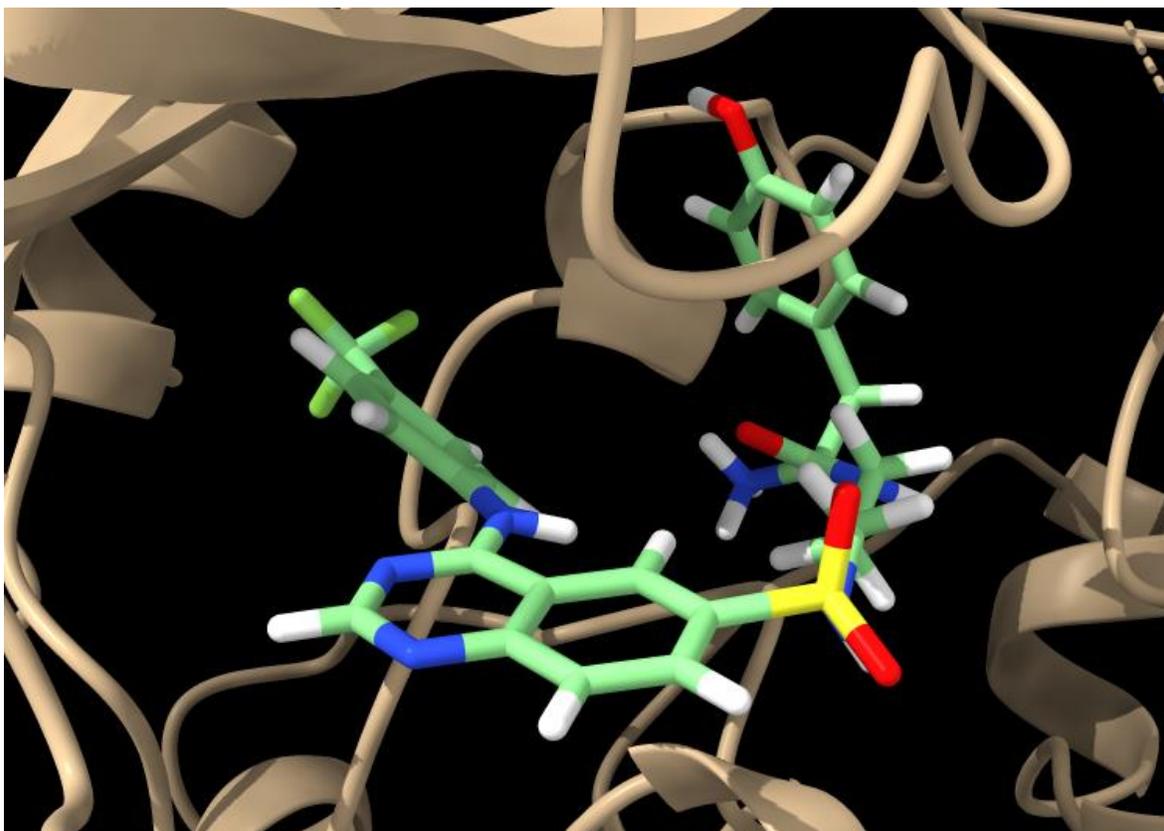
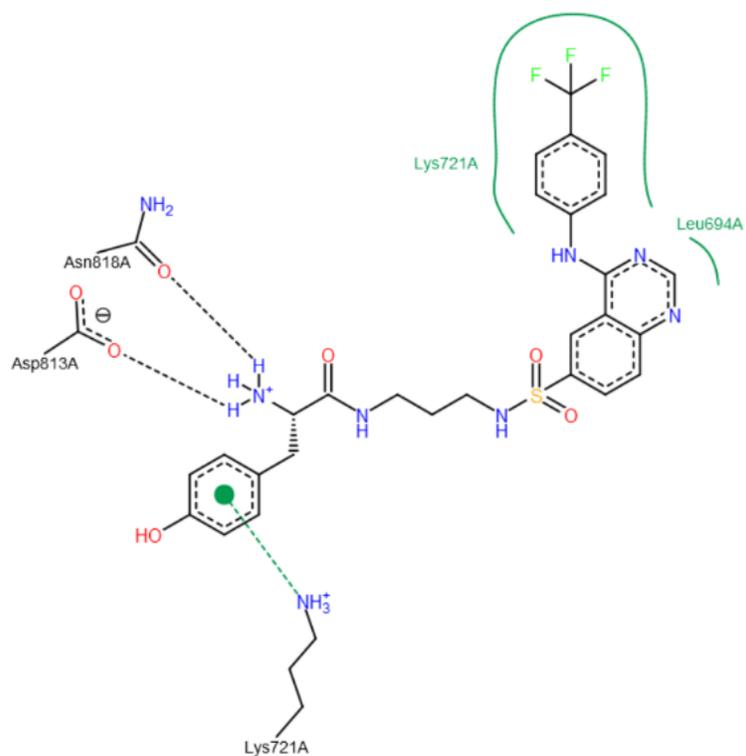


Figura A42. Modo de unión e interacciones de AUMO-23 en 2gs7

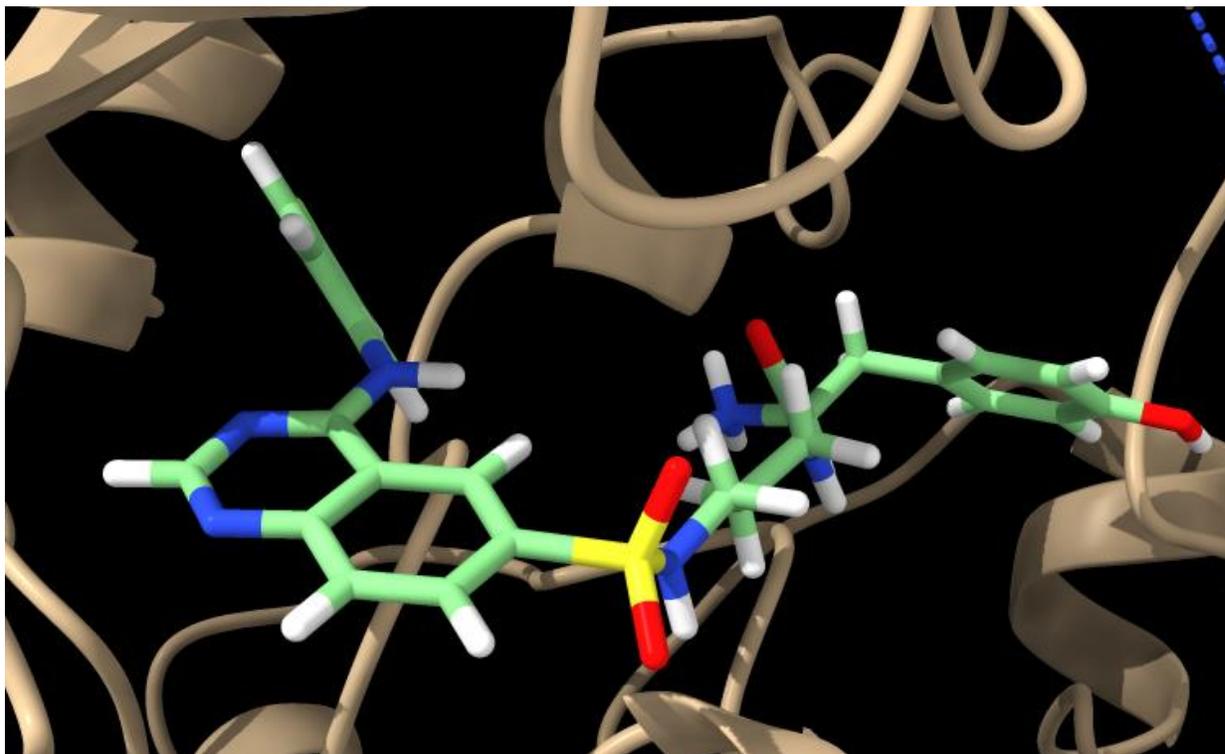
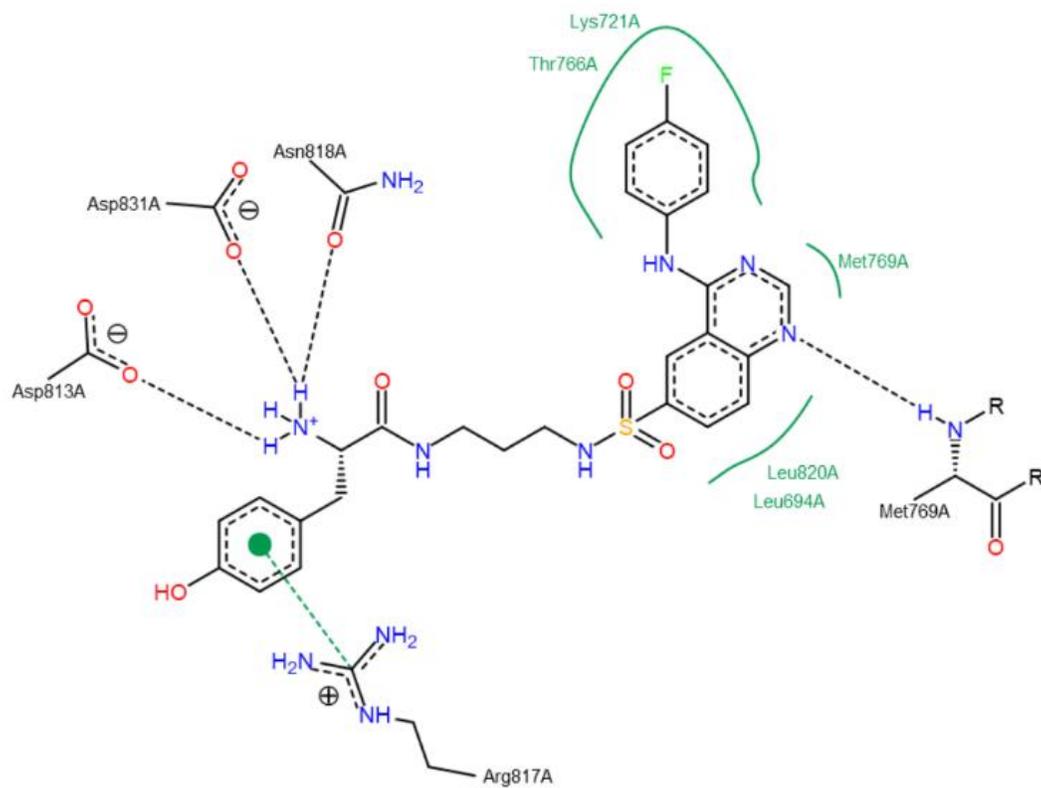


Figura A43. Modo de unión e interacciones de AUMO-24 en 2gs7

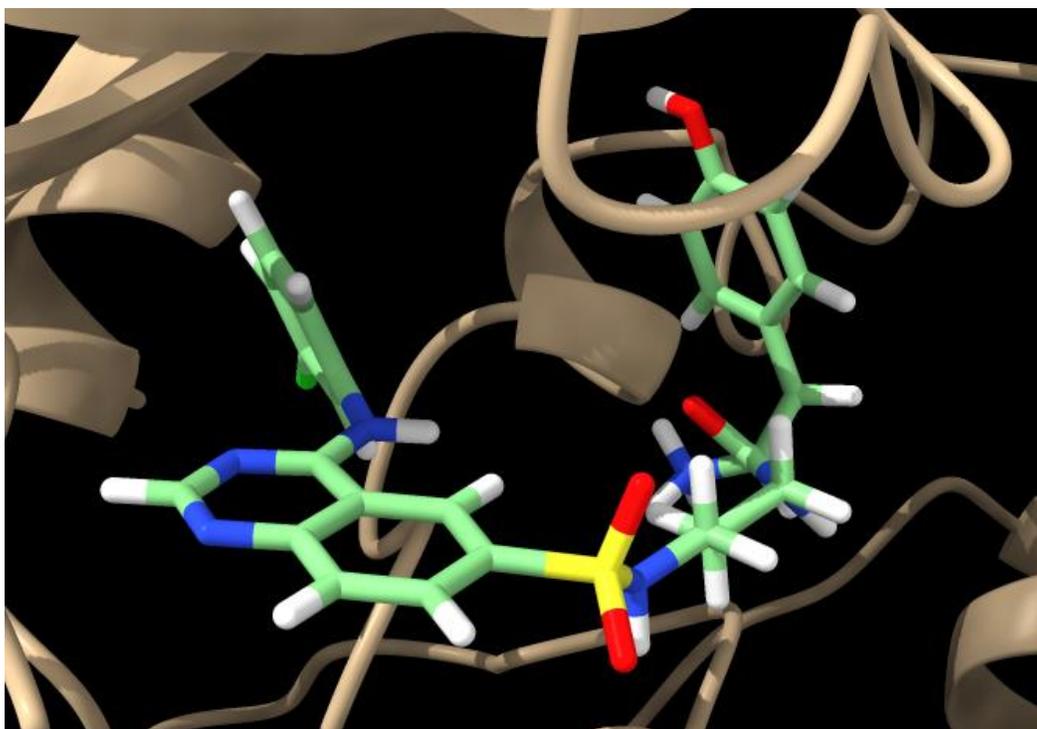
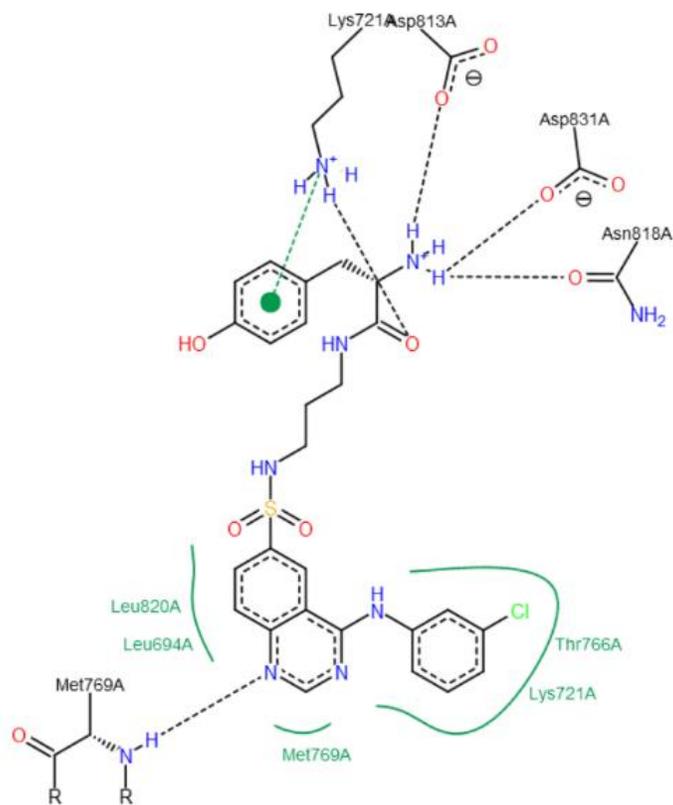


Figura A44. Modo de unión e interacciones de AUMO-25 en 2gs7

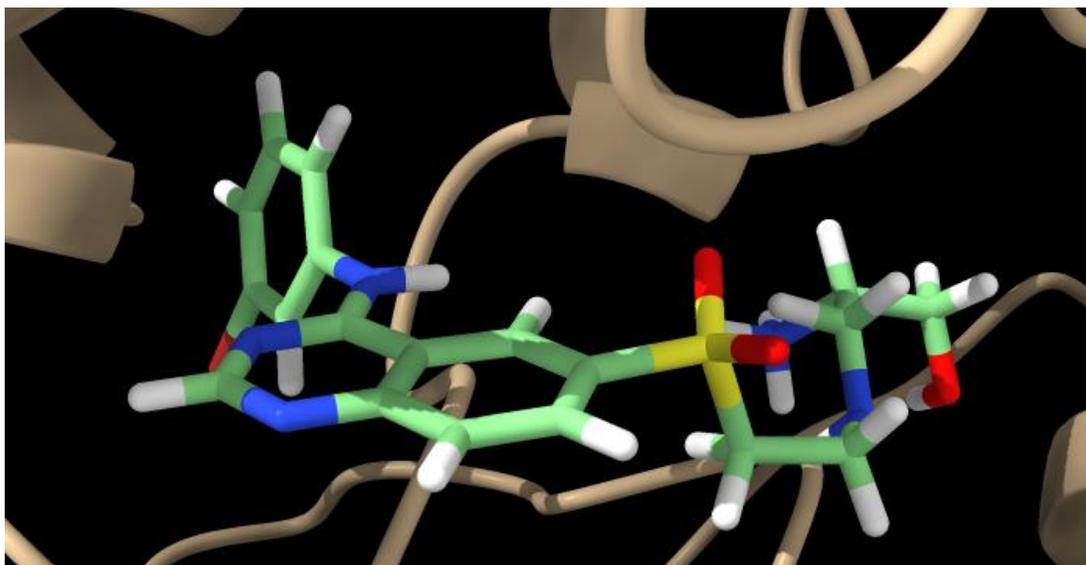
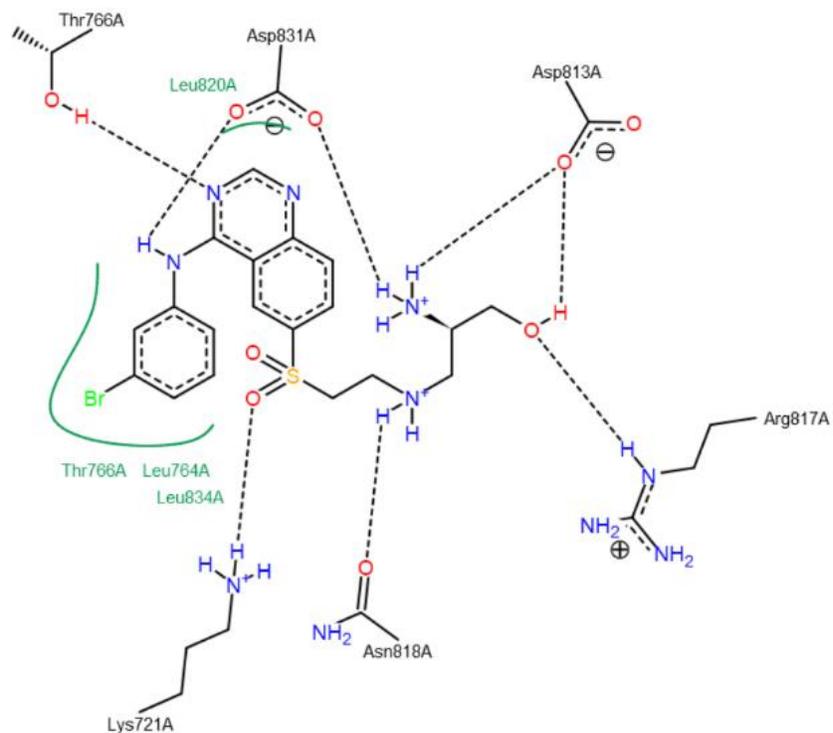


Figura A45. Modo de unión e interacciones de AUMO-26 en 2gs7

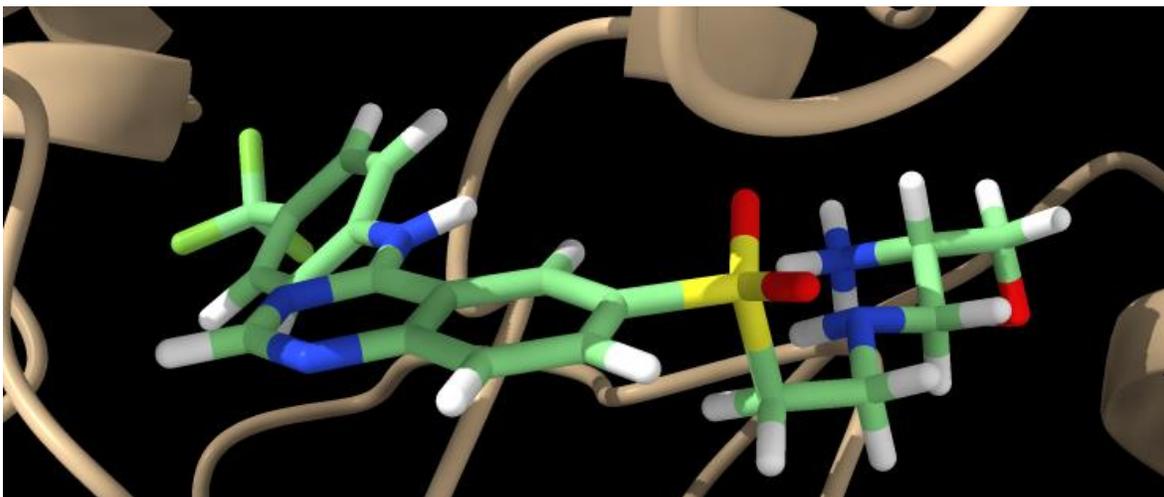
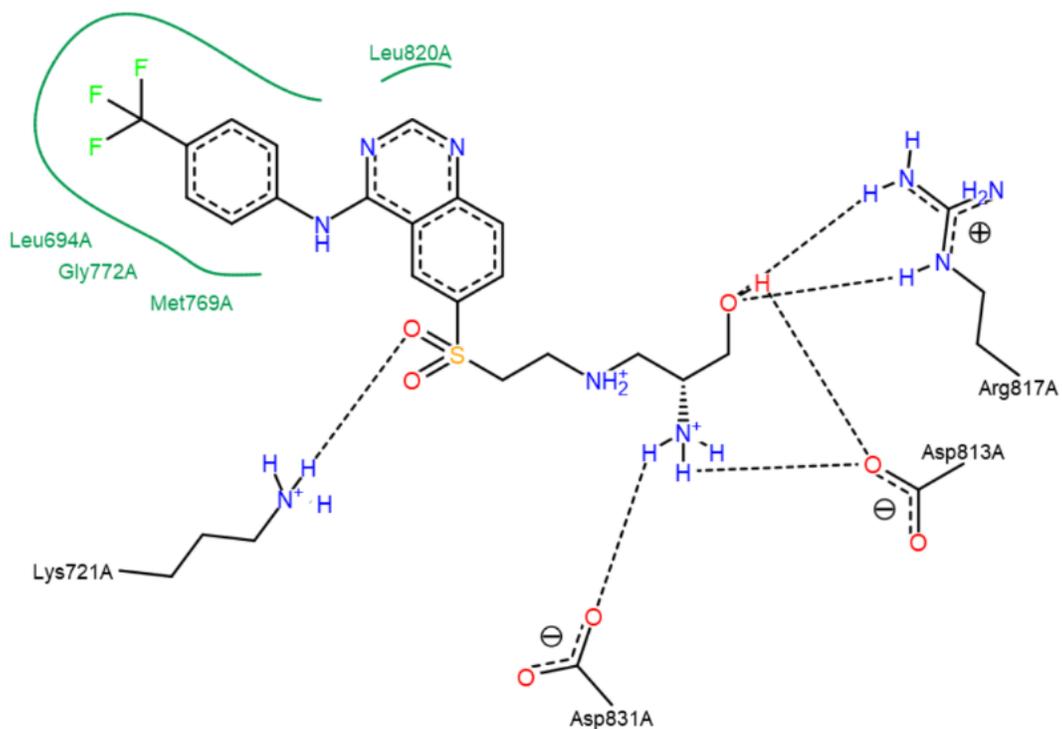


Figura A46. Modo de unión e interacciones de AUMO-27 en 2gs7

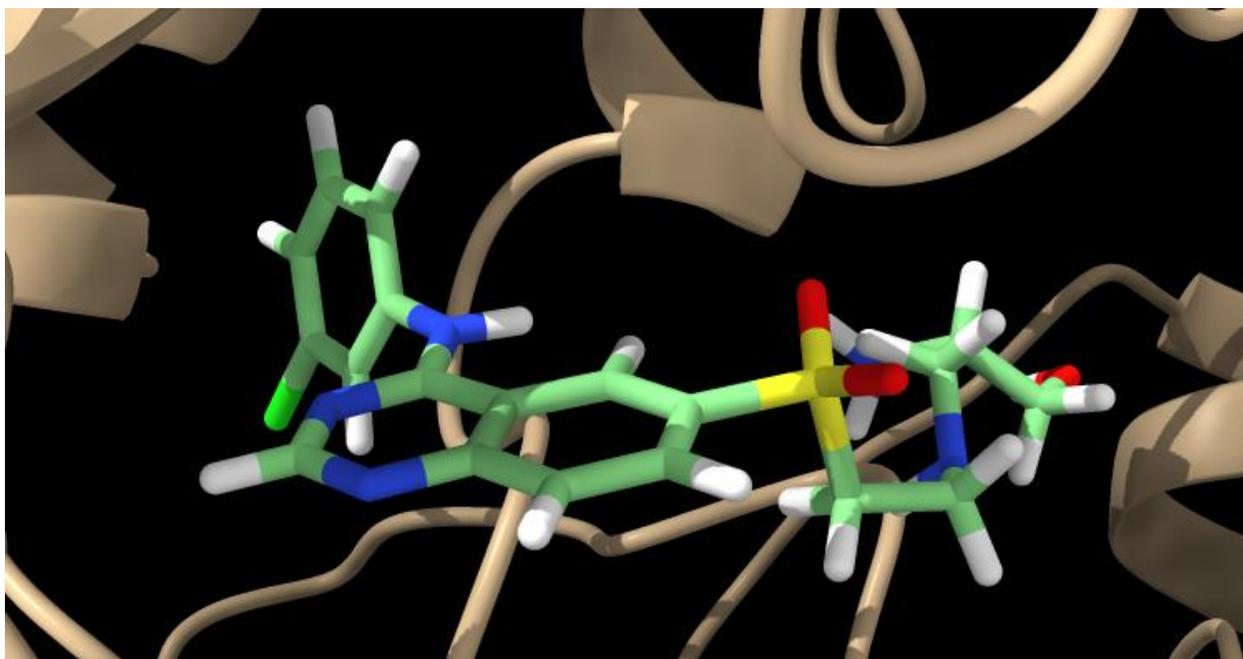
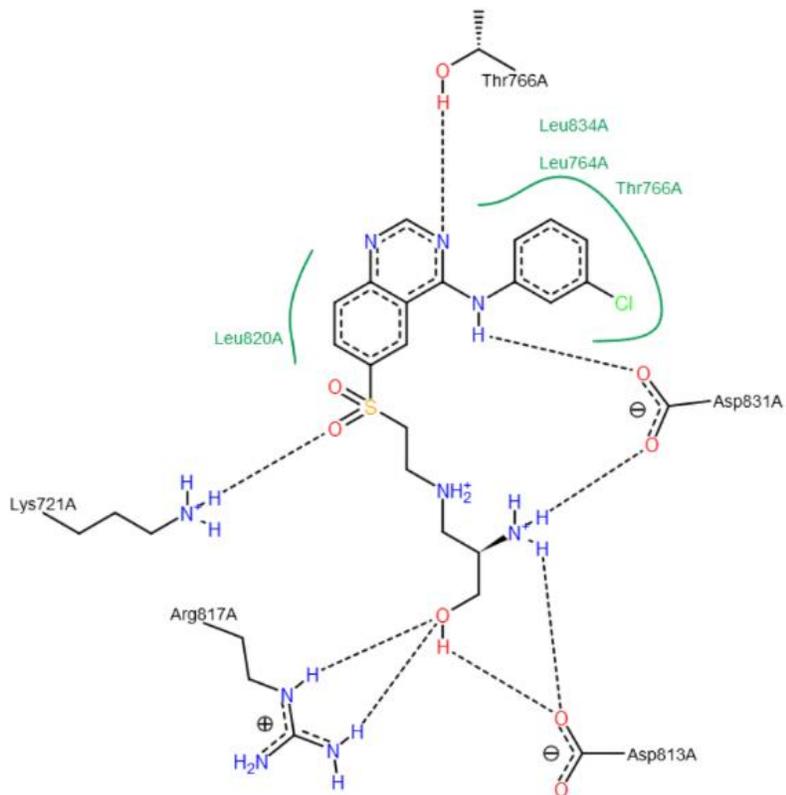


Figura A47. Modo de unión e interacciones de AUMO-29 en 2gs7

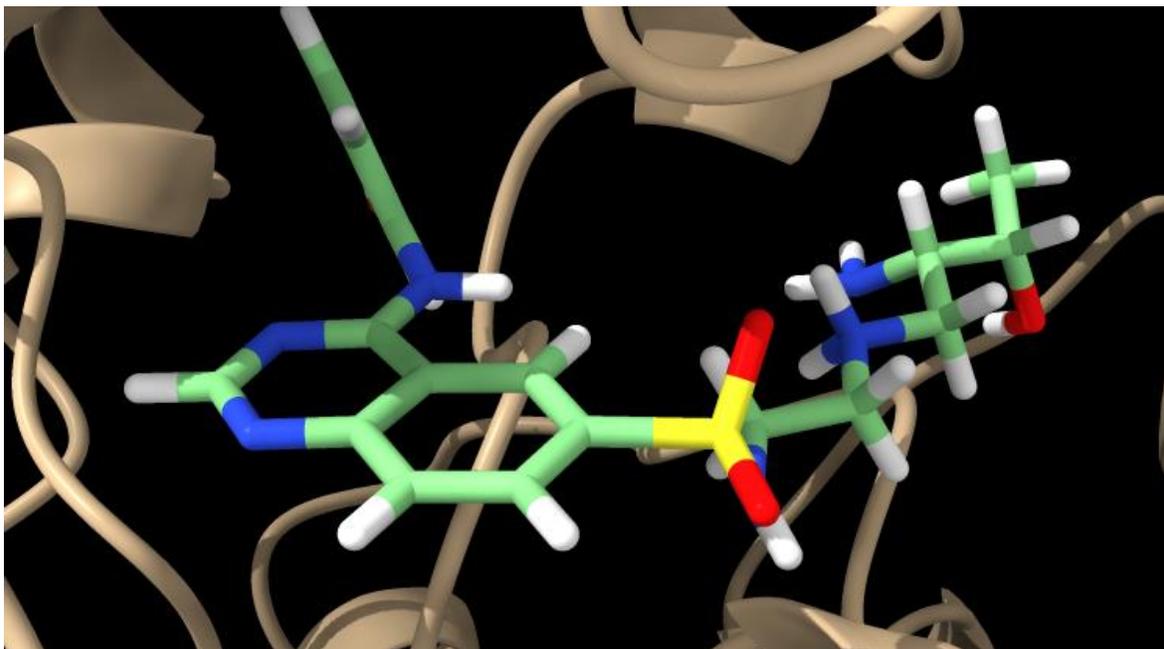
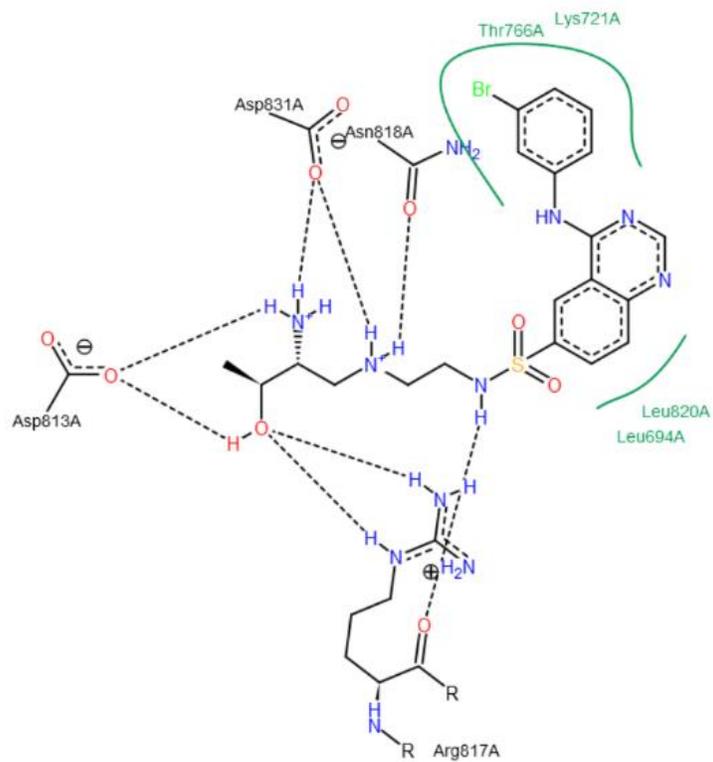


Figura A48 Modo de unión e interacciones de AUMO-30 en 2gs7

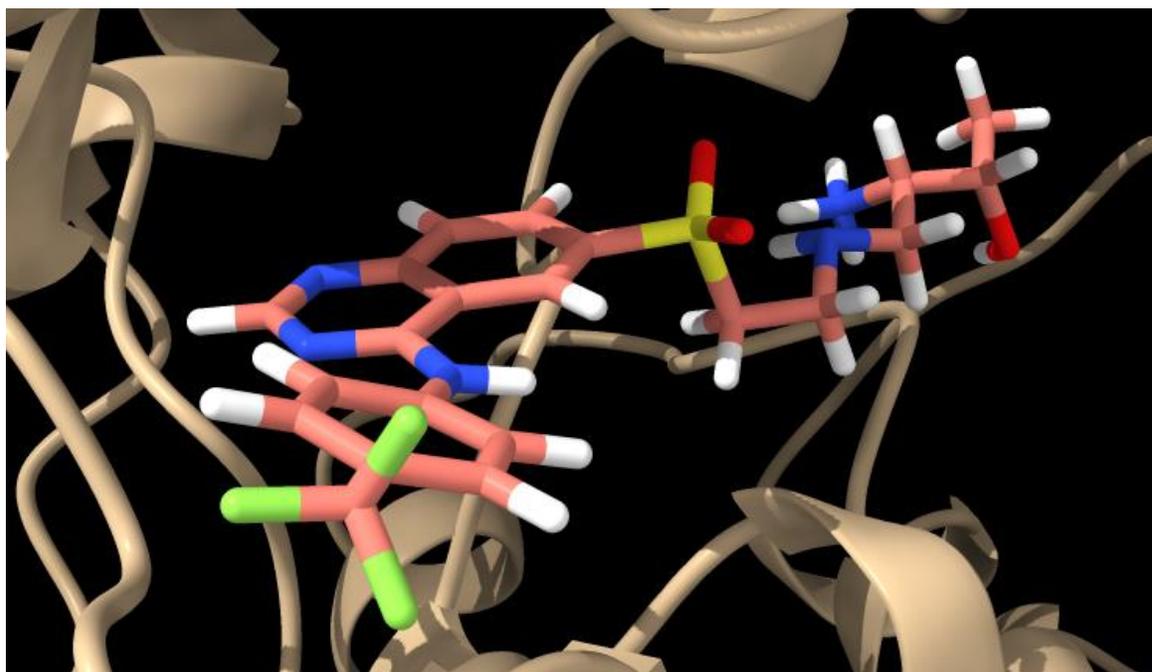
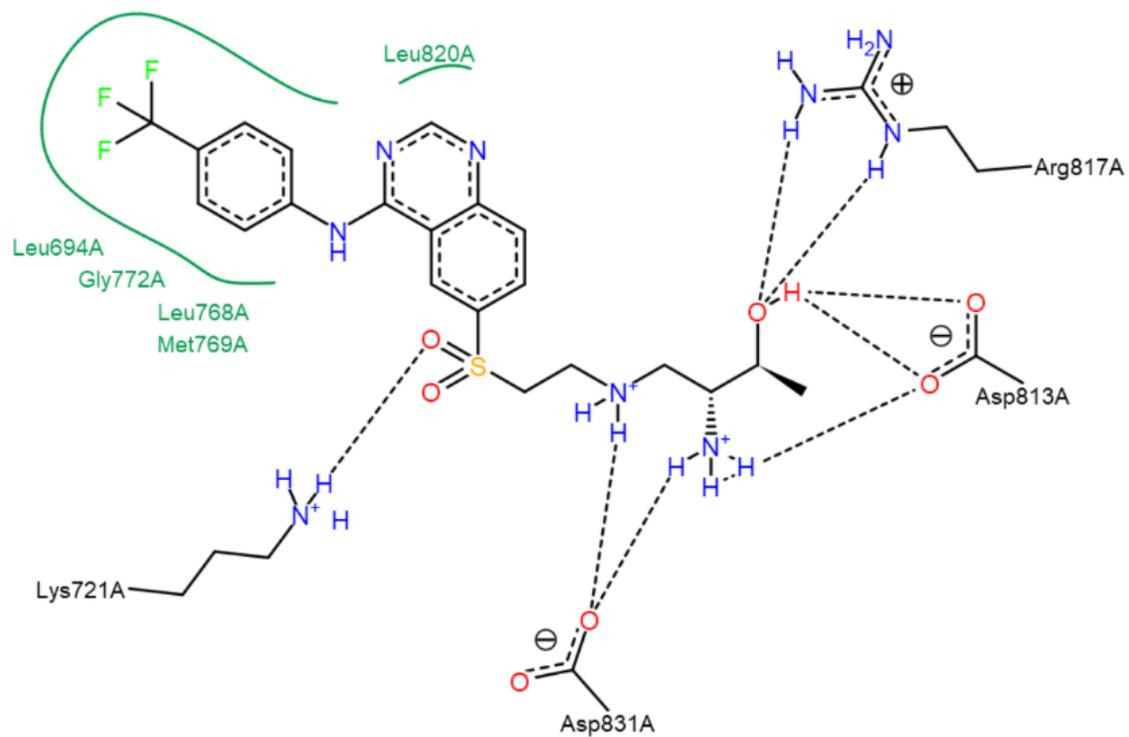


Figura A49. Modo de unión e interacciones de AUMO-31 en 2gs7

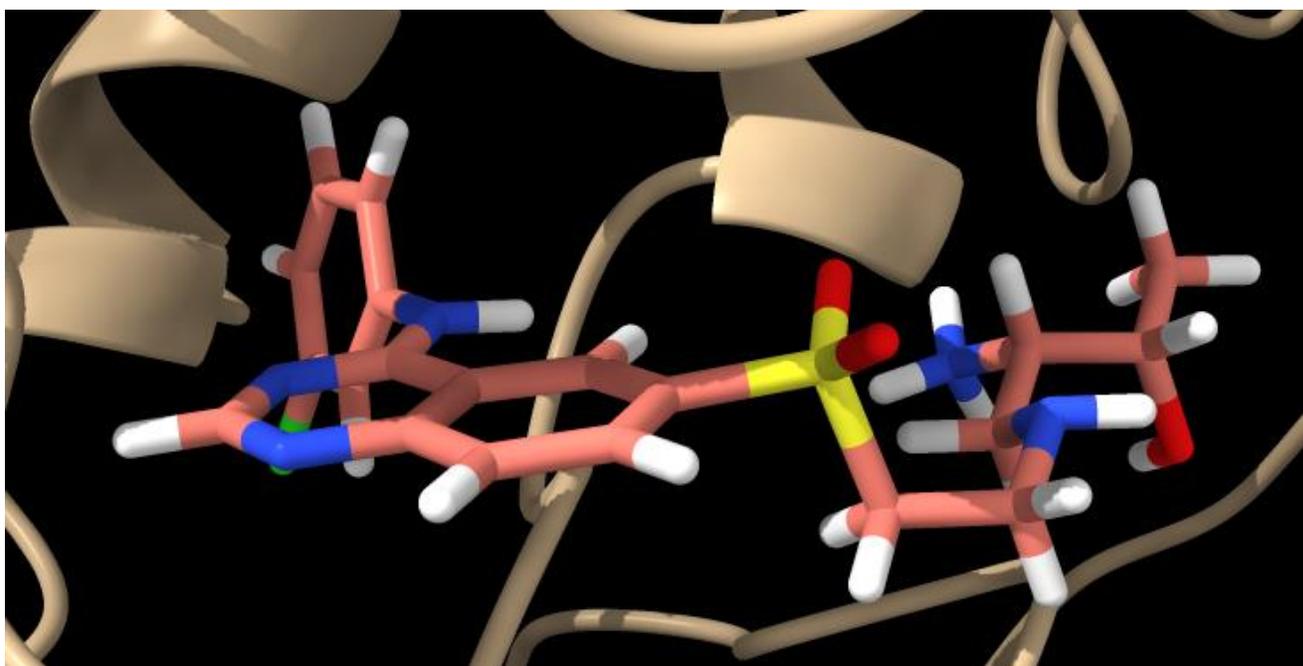
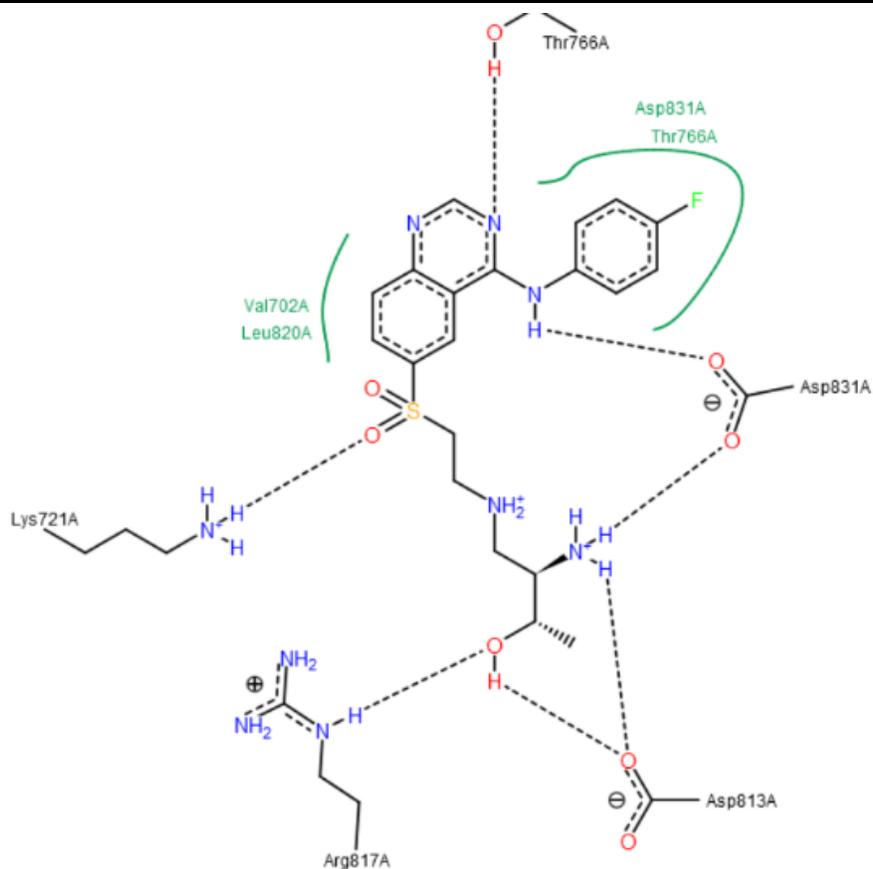


Figura A50. Modo de unión e interacciones de AUMO-32 en 2gs7

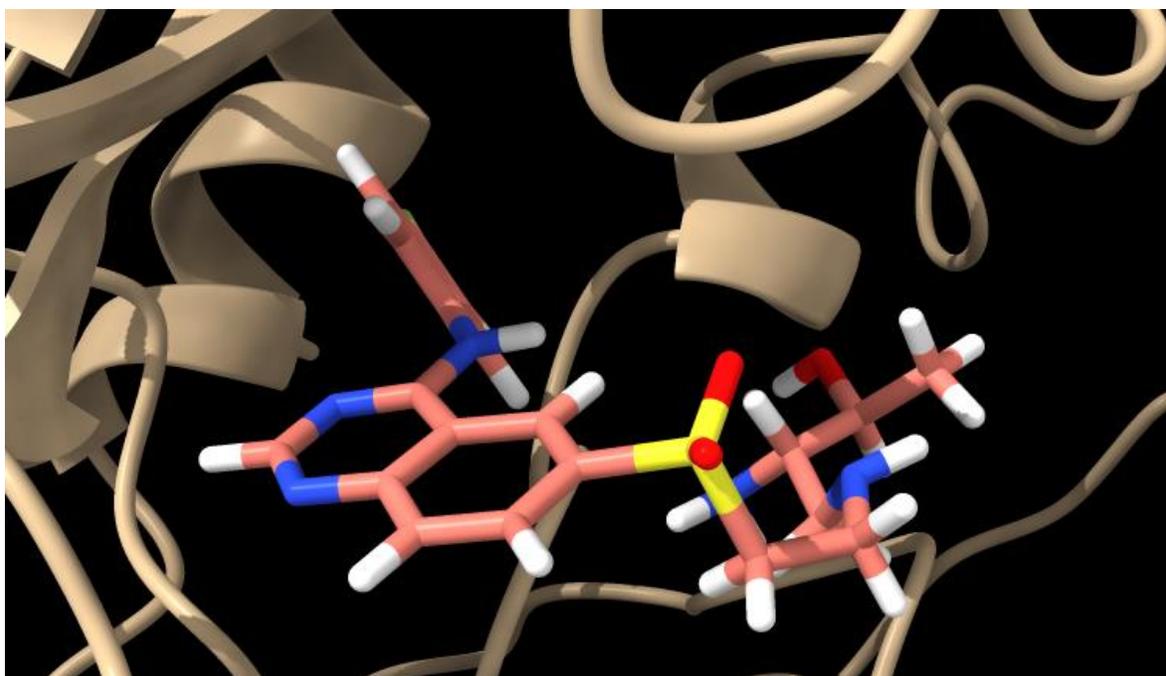
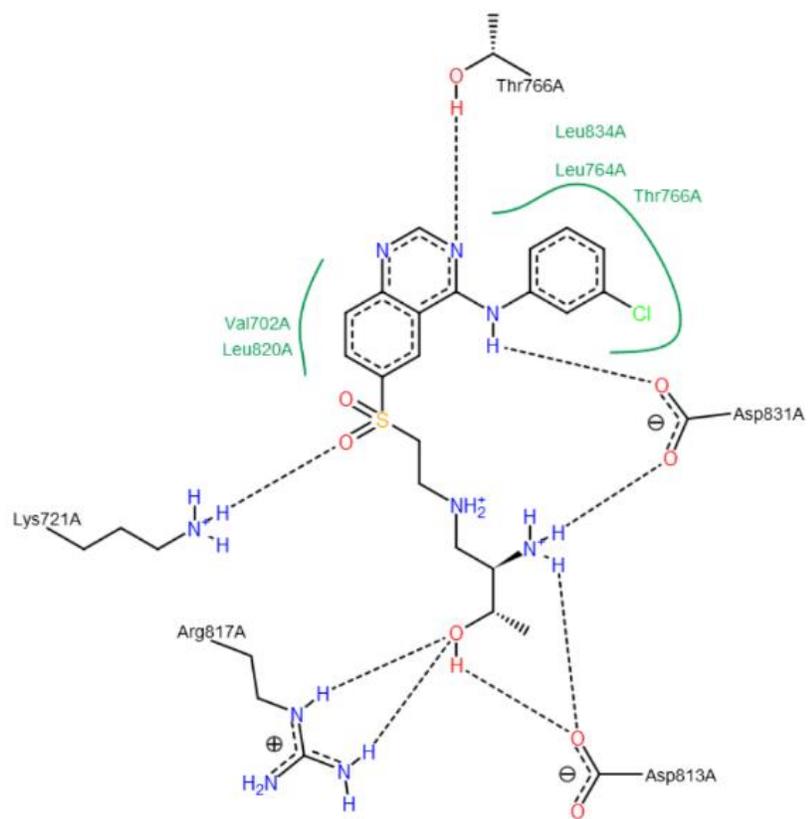


Figura A51. Modo de unión e interacciones de AUMO-33 en 2gs7

A 4.4 Acoplamientos de serie AUMO en AKT2

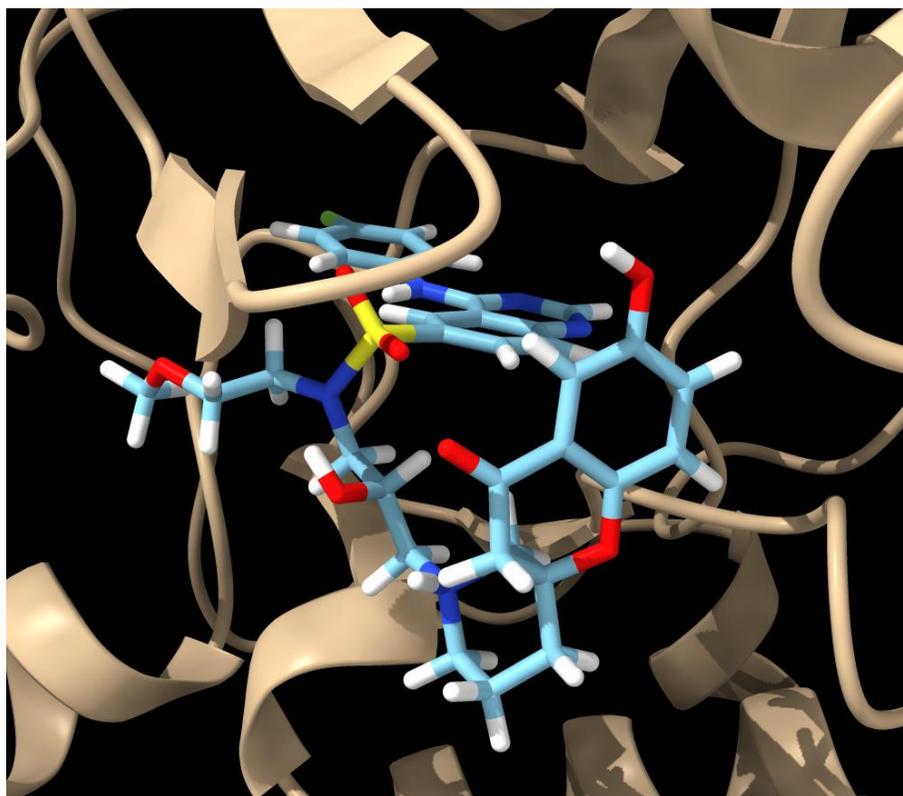
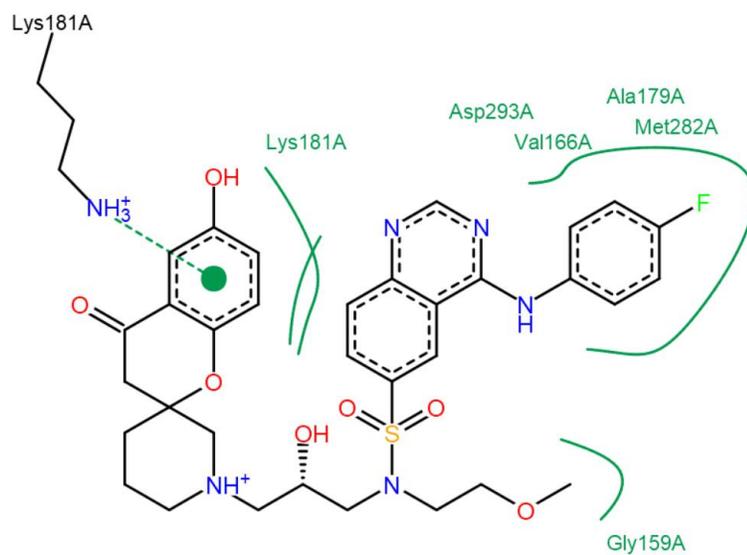


Figura A52. Modo de unión e interacciones de AUMO-2 en 2jdo

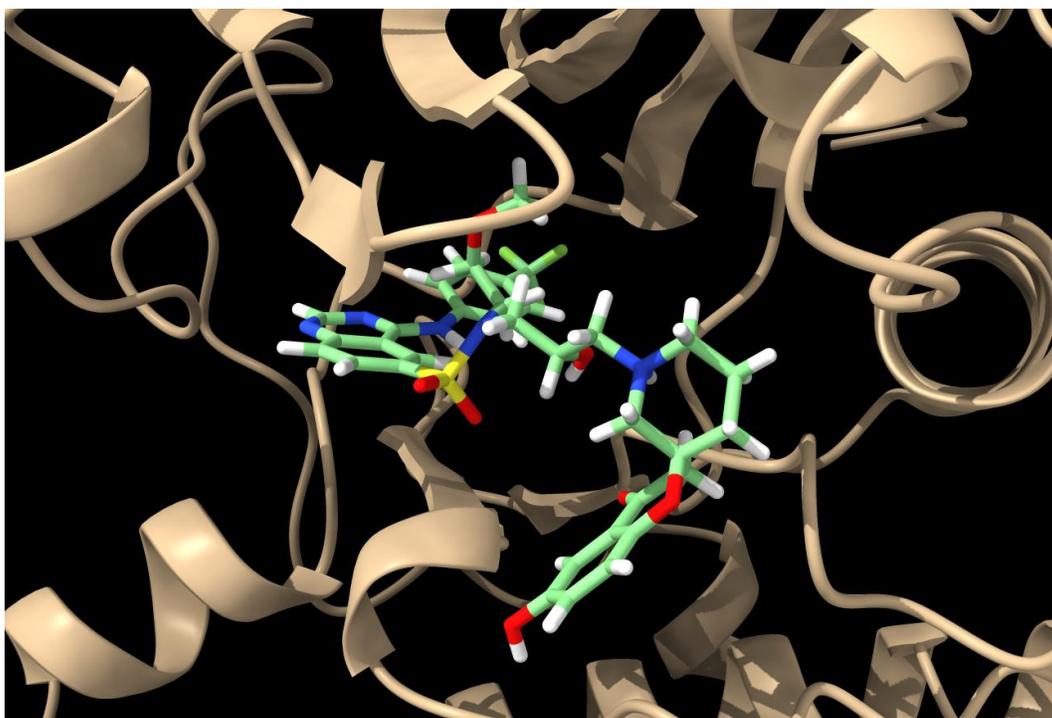
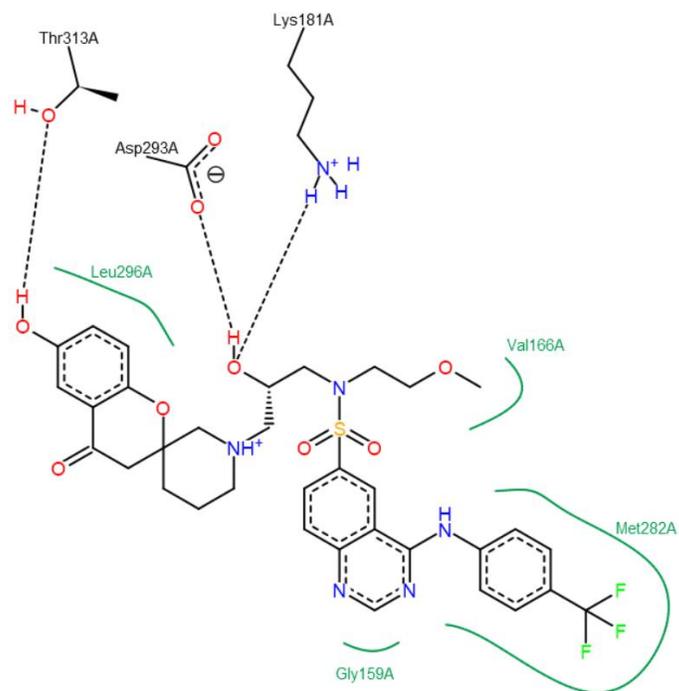


Figura A53. Modo de unión e interacciones de AUMO-3 en 2jdo

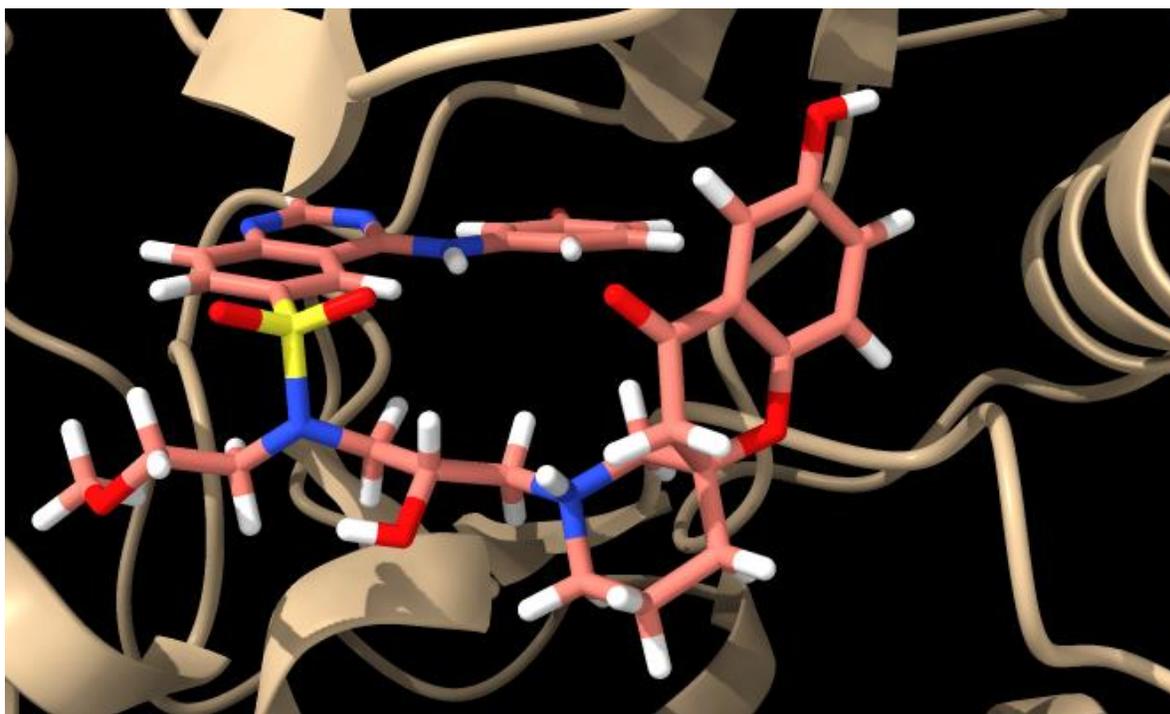
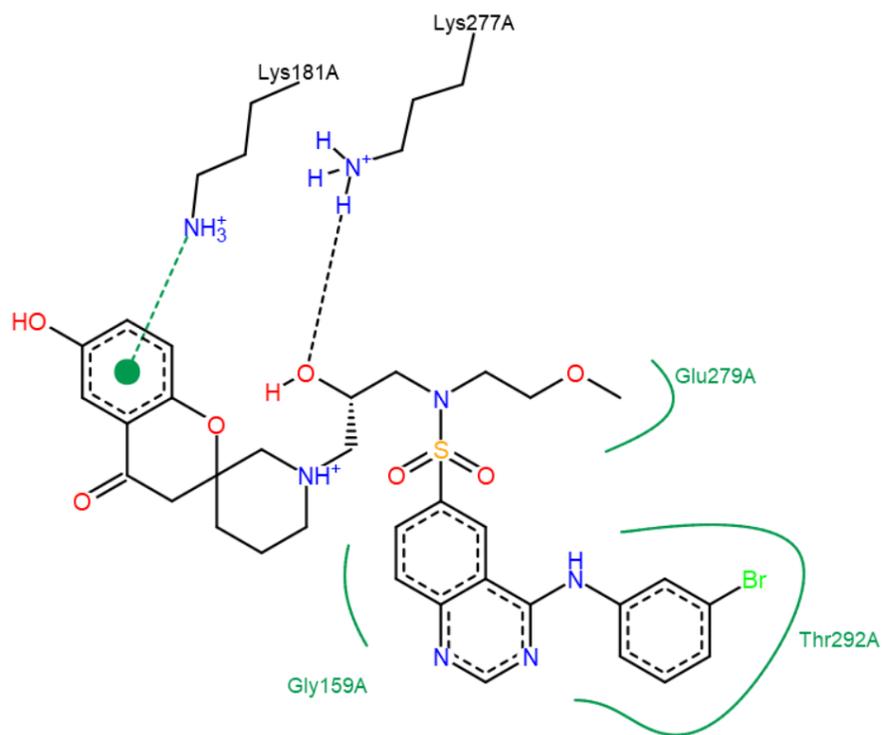


Figura A54. Modo de unión e interacciones de AUMO-4 en 2jdo

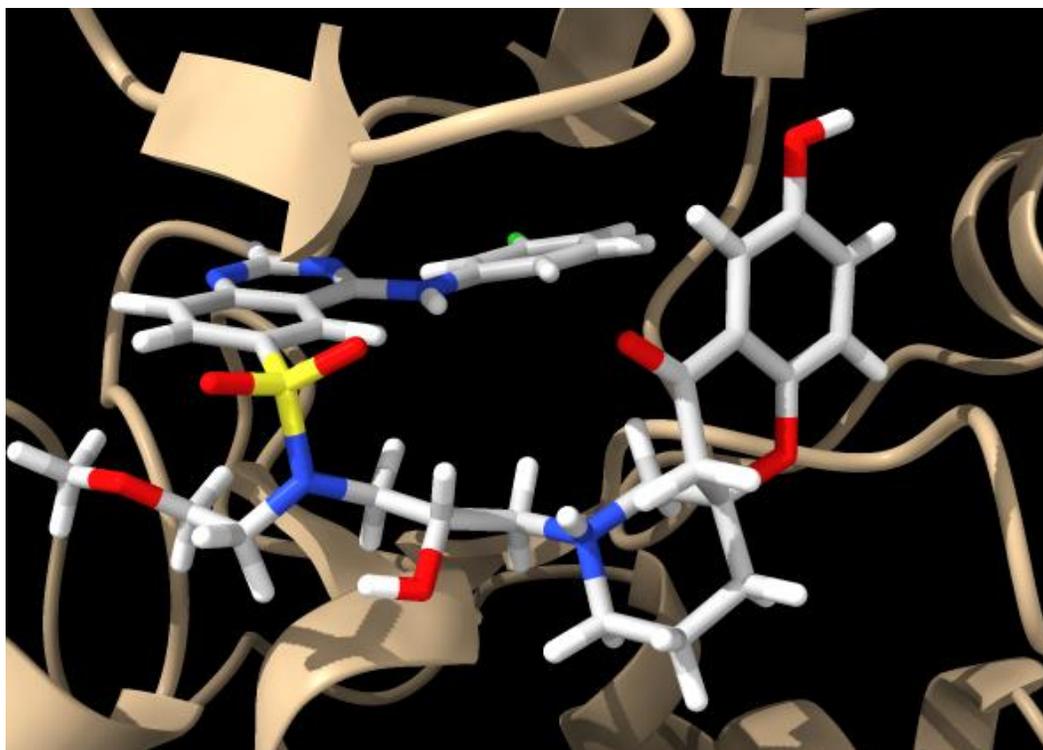
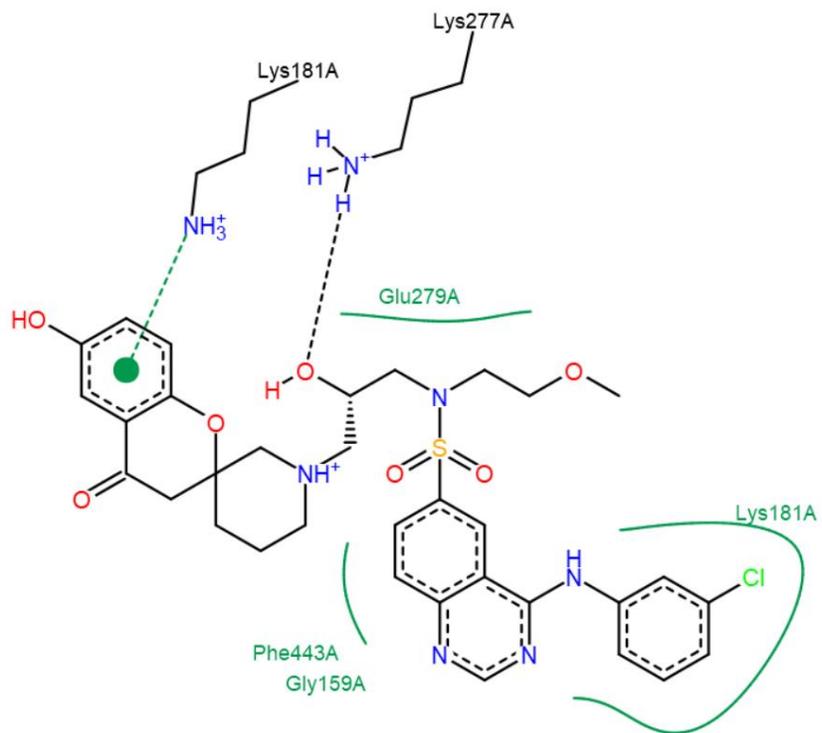


Figura A55. Modo de unión e interacciones de AUMO-5 en 2jdo

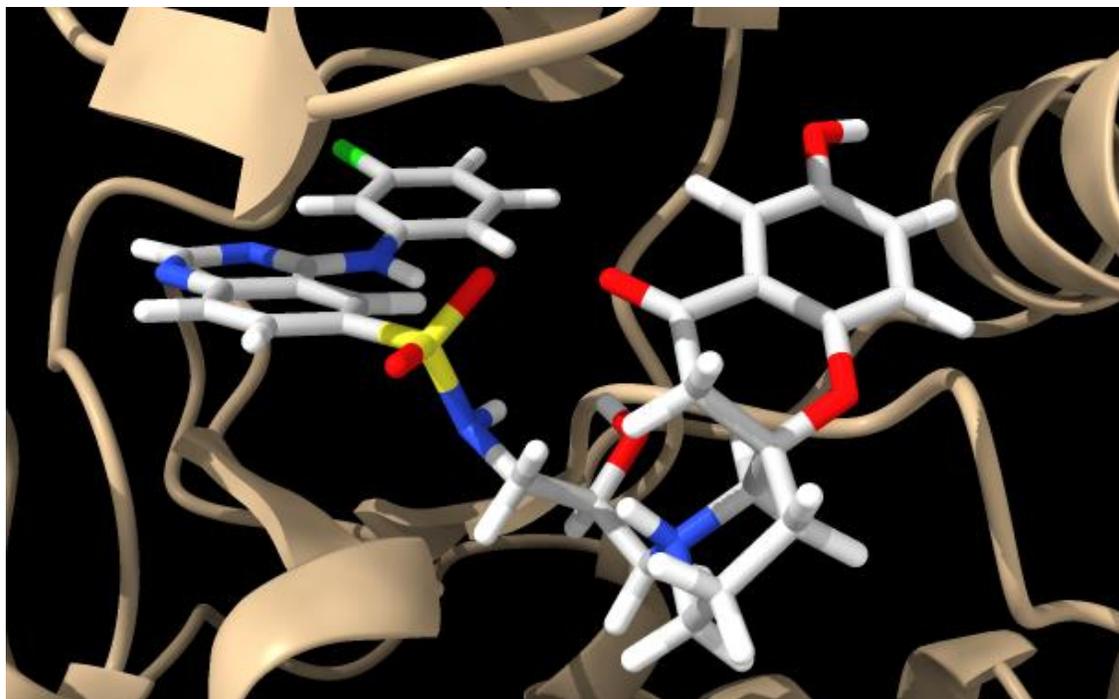
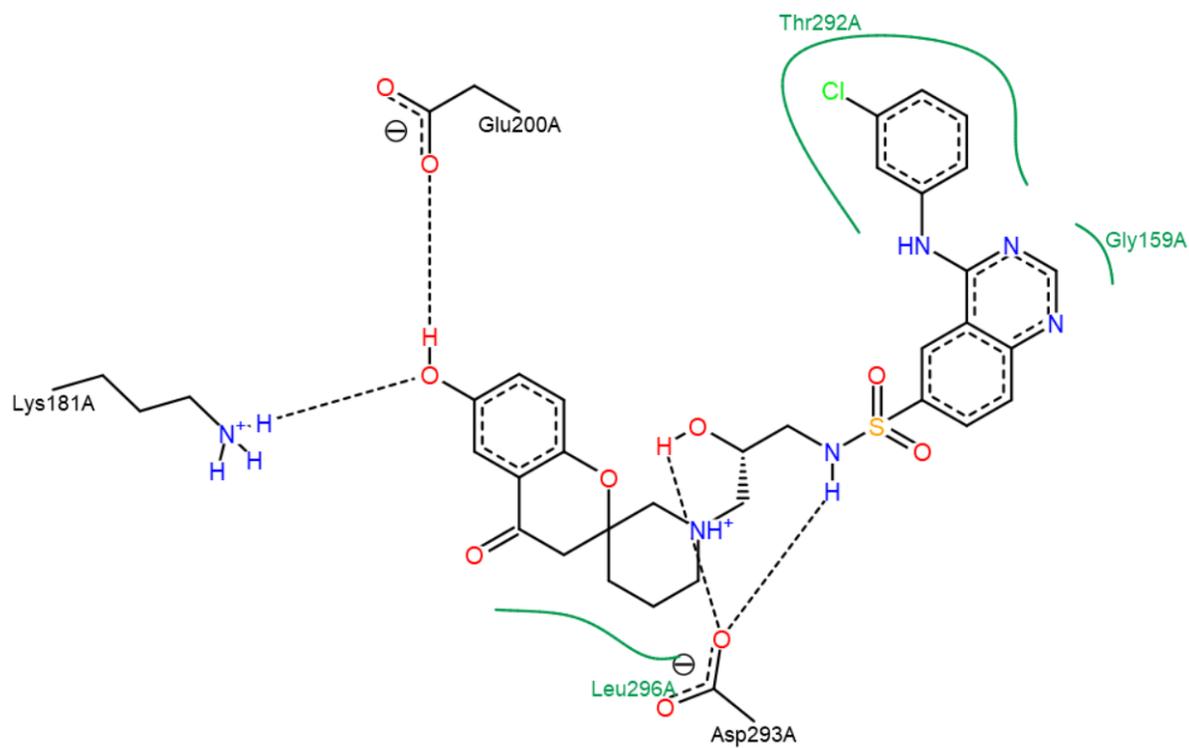


Figura A56. Modo de unión e interacciones de AUMO-6 en 2jdo

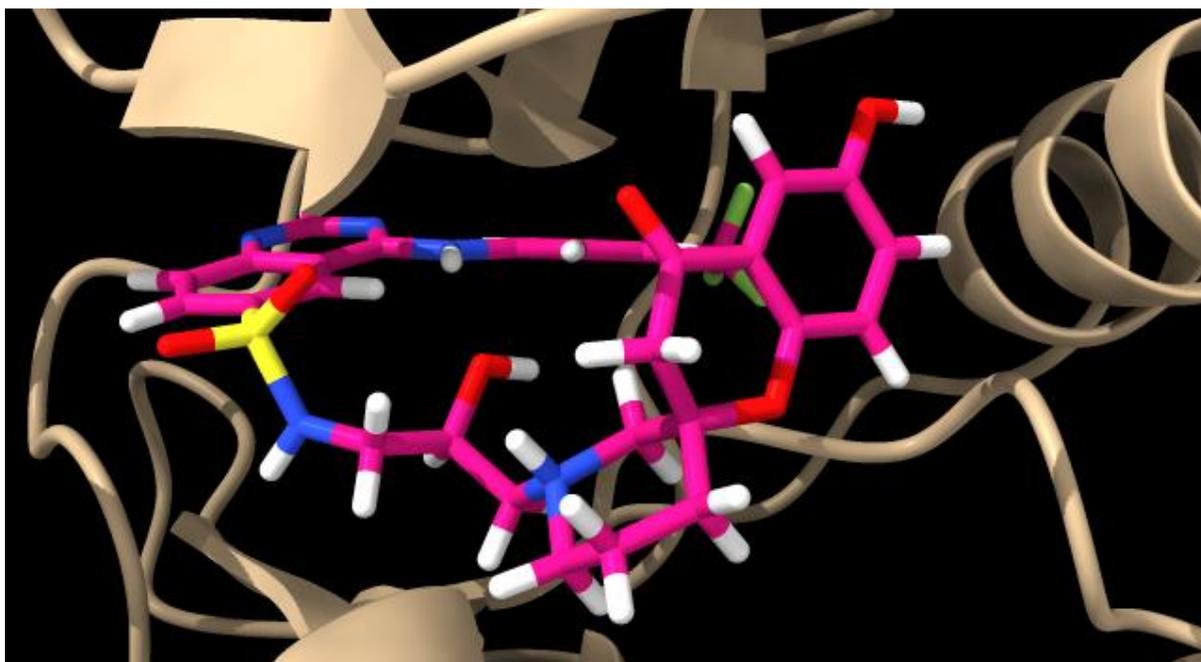
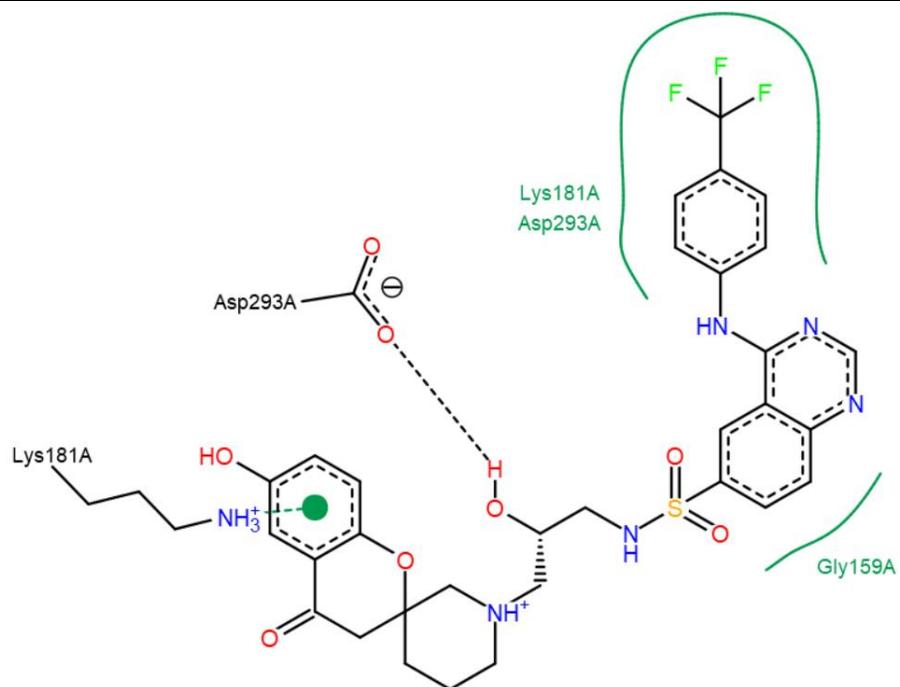


Figura A57. Modo de unión e interacciones de AUMO-7 en 2jdo

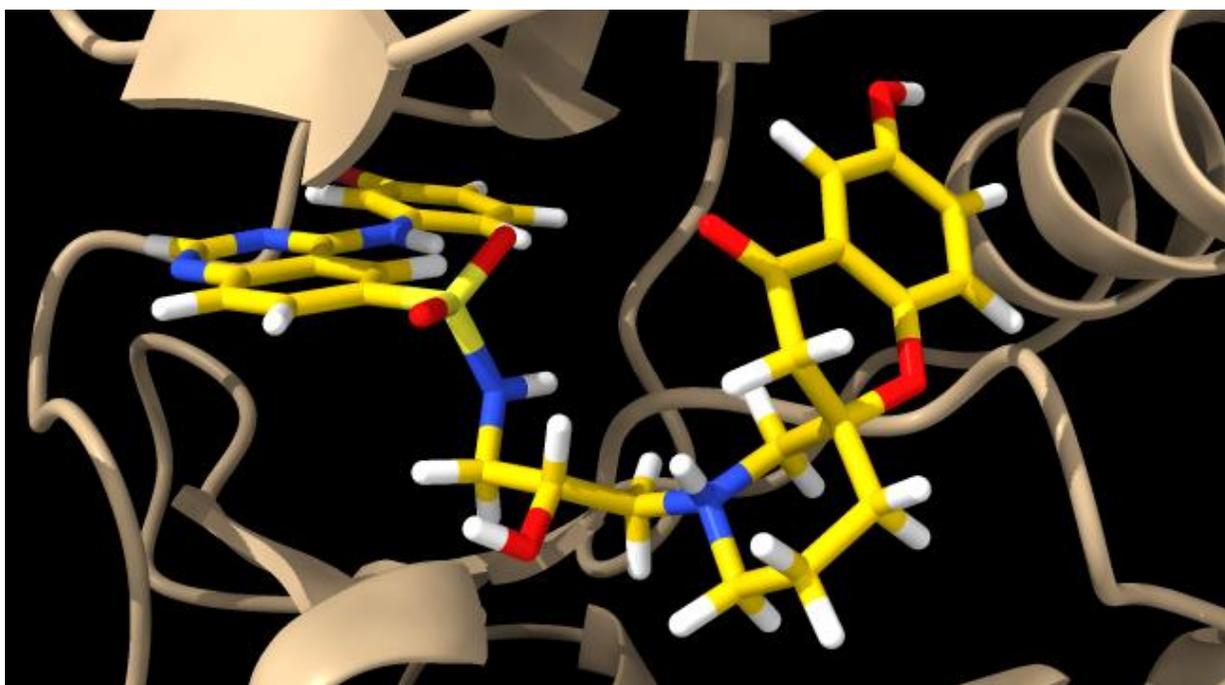
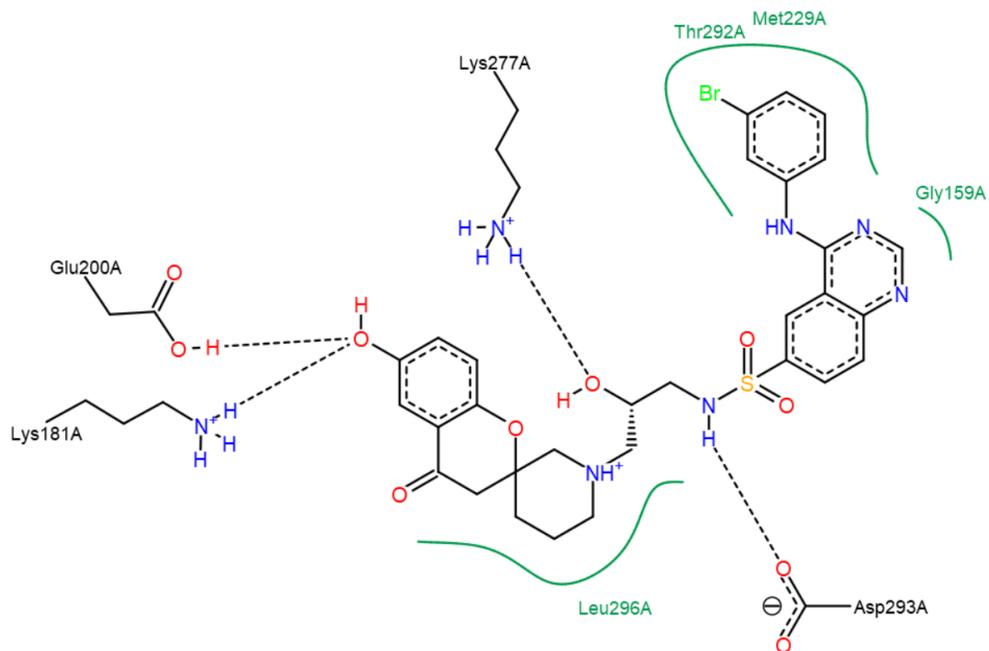


Figura A58. Modo de unión e interacciones de AUMO-8 en 2jdo

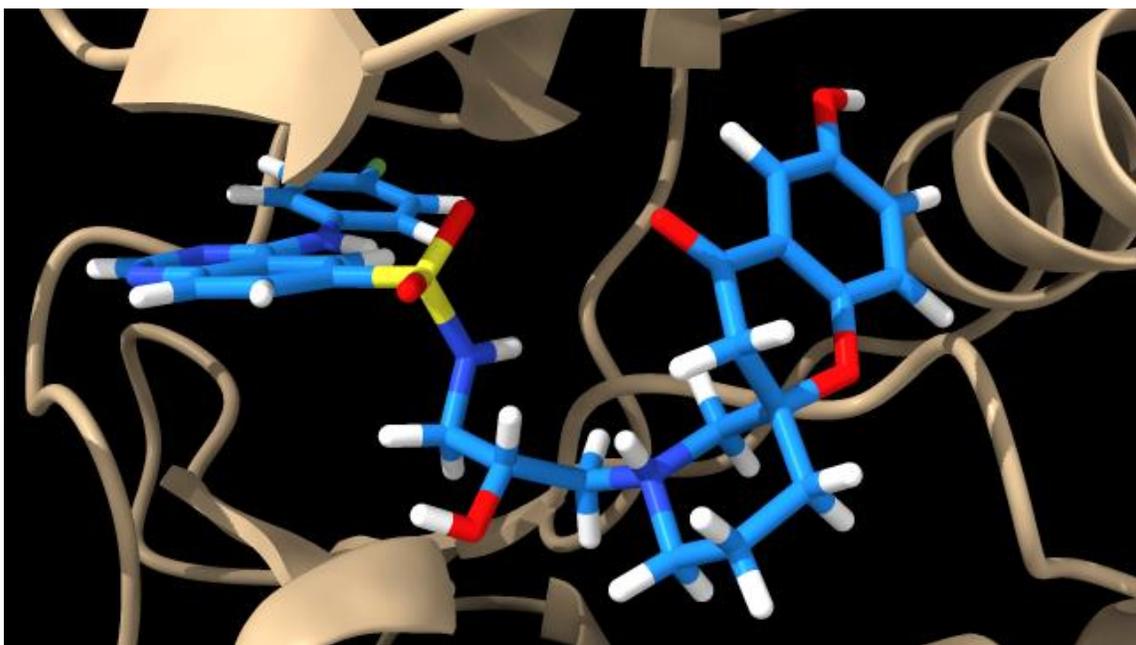
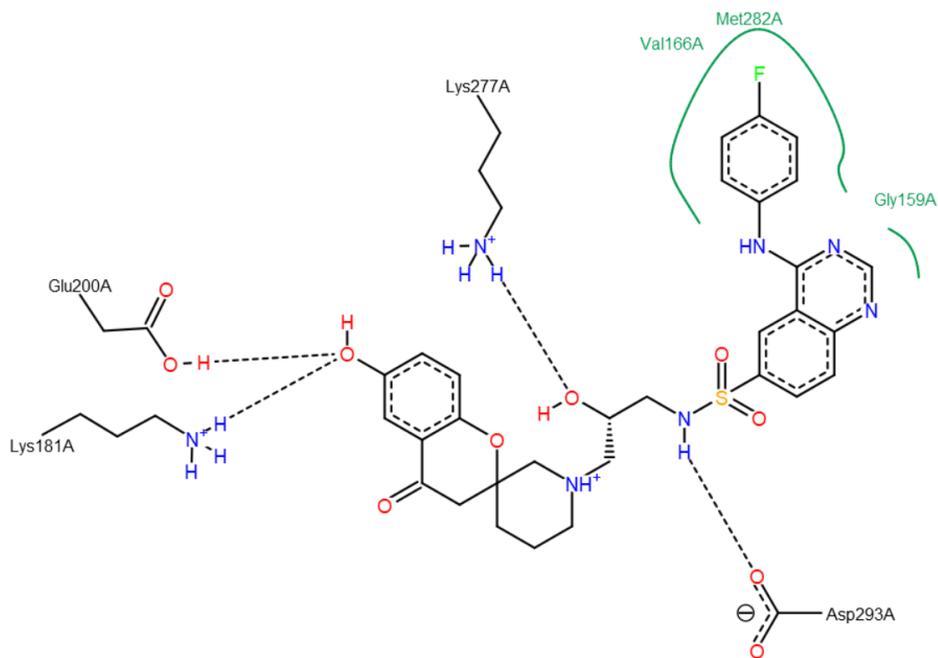


Figura A59. Modo de unión e interacciones de AUMO-9 en 2jdo

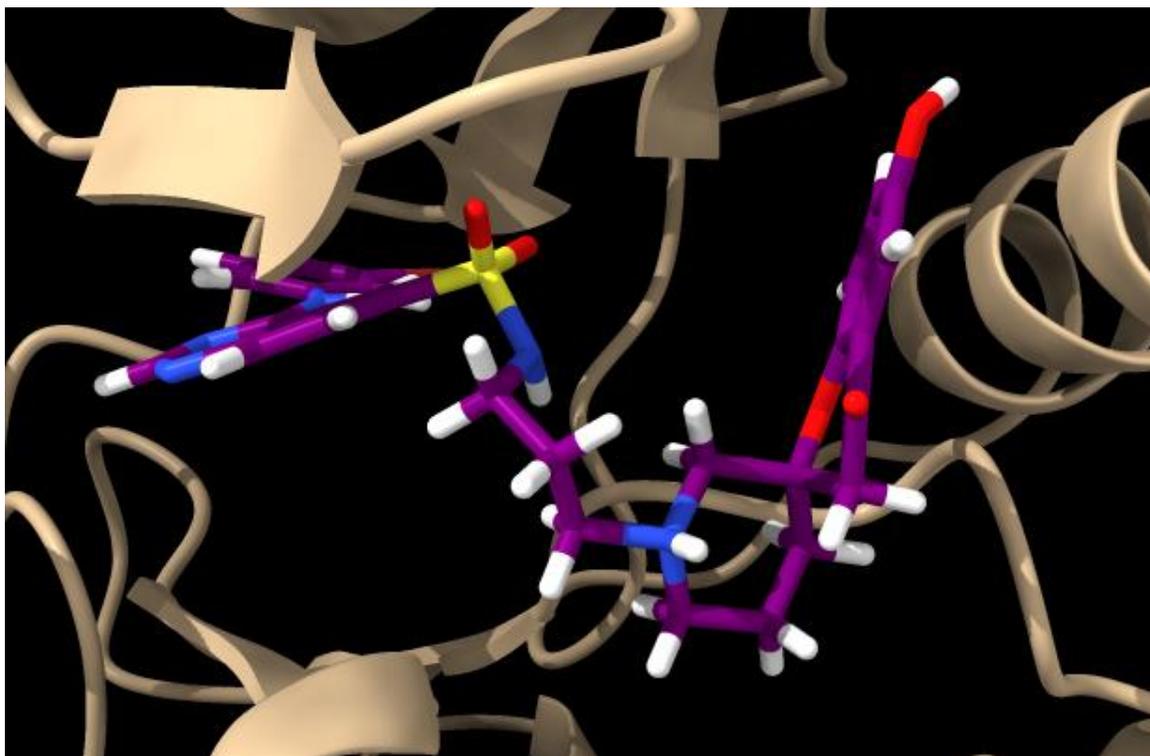
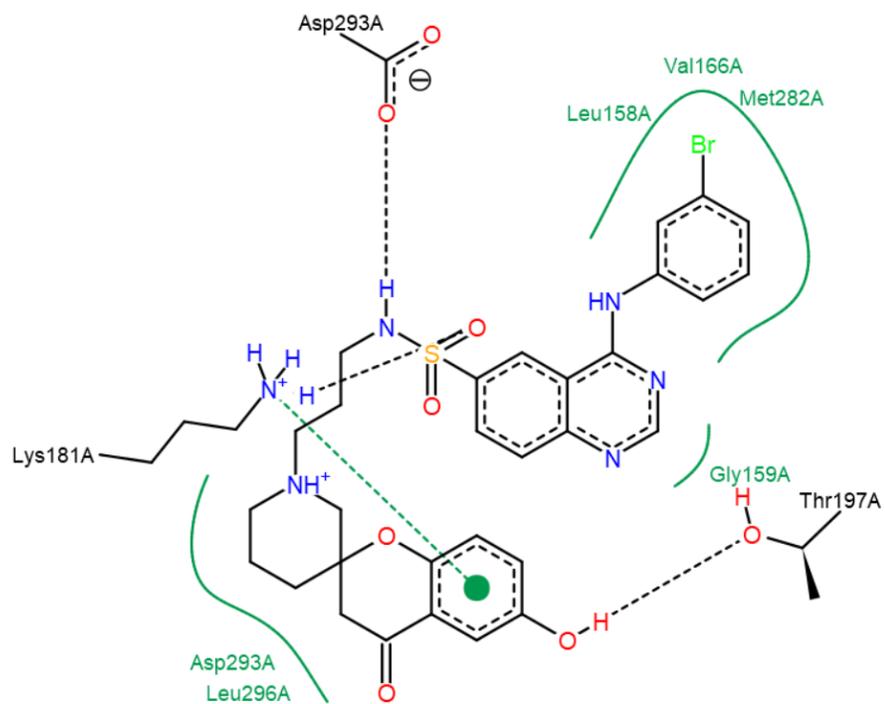


Figura A60. Modo de unión e interacciones de AUMO-10 en 2jdo

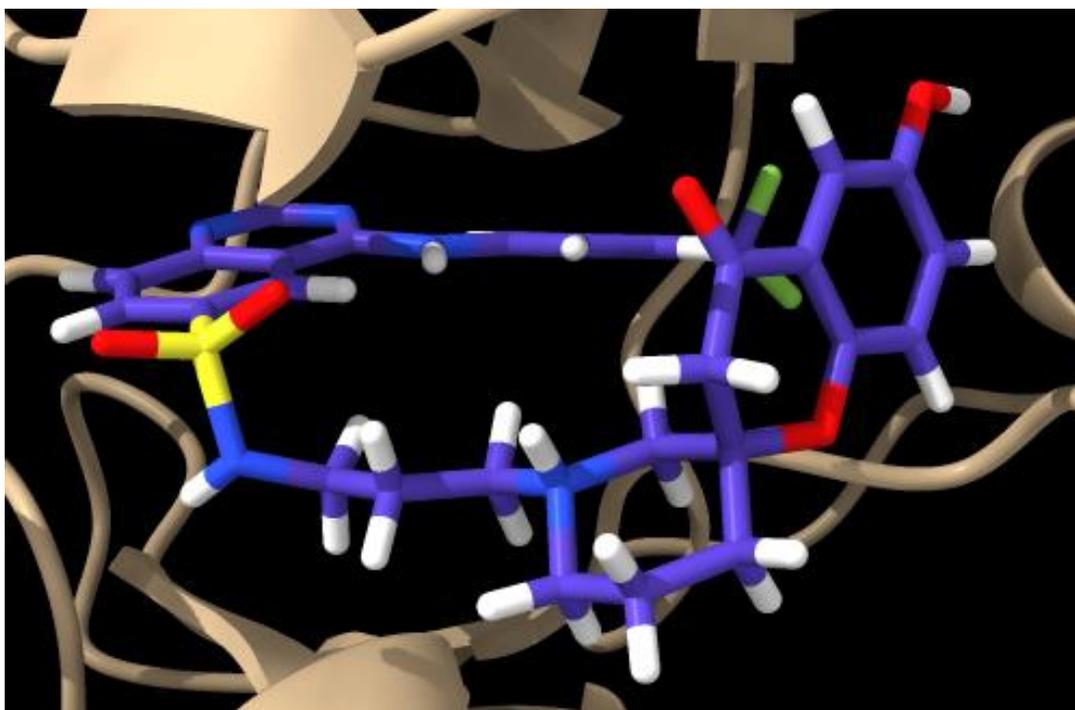
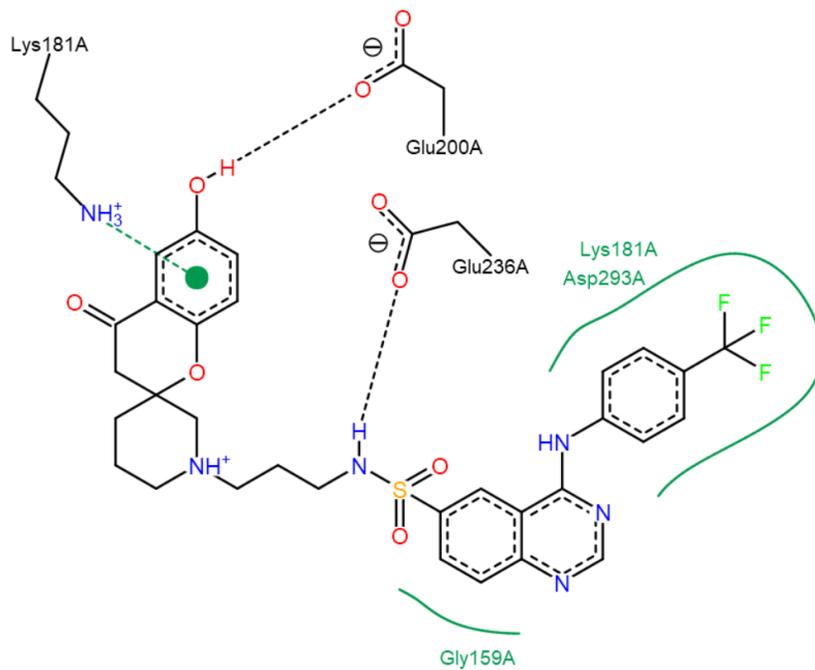


Figura A61. Modo de unión e interacciones de AUMO-11 en 2jdo

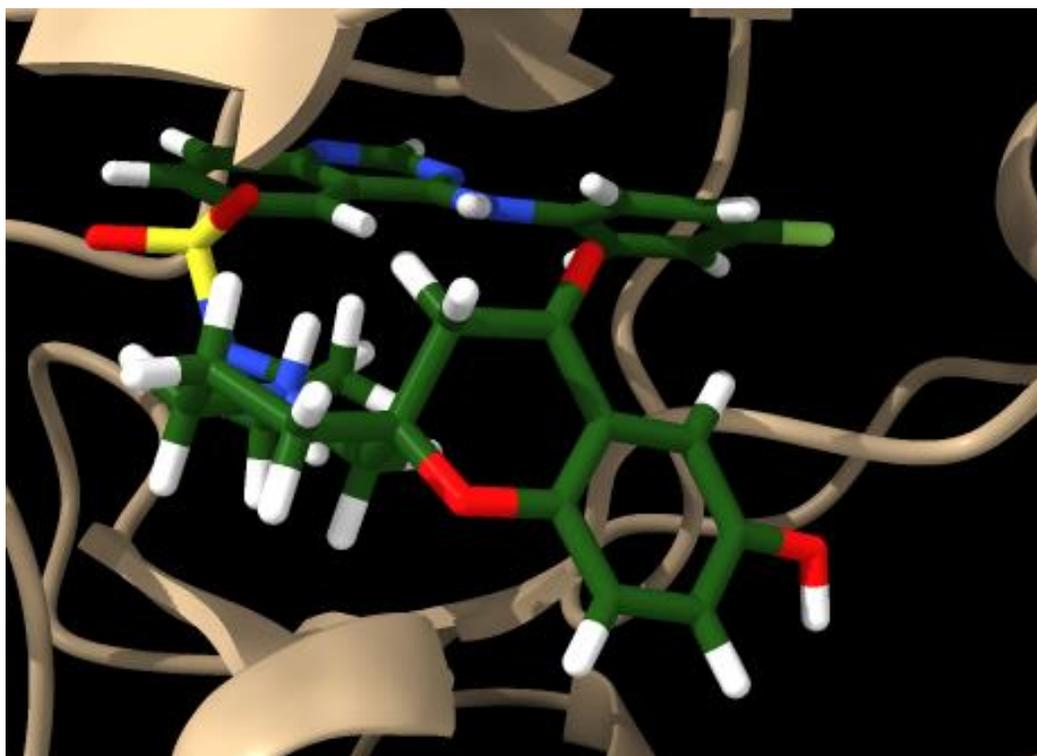
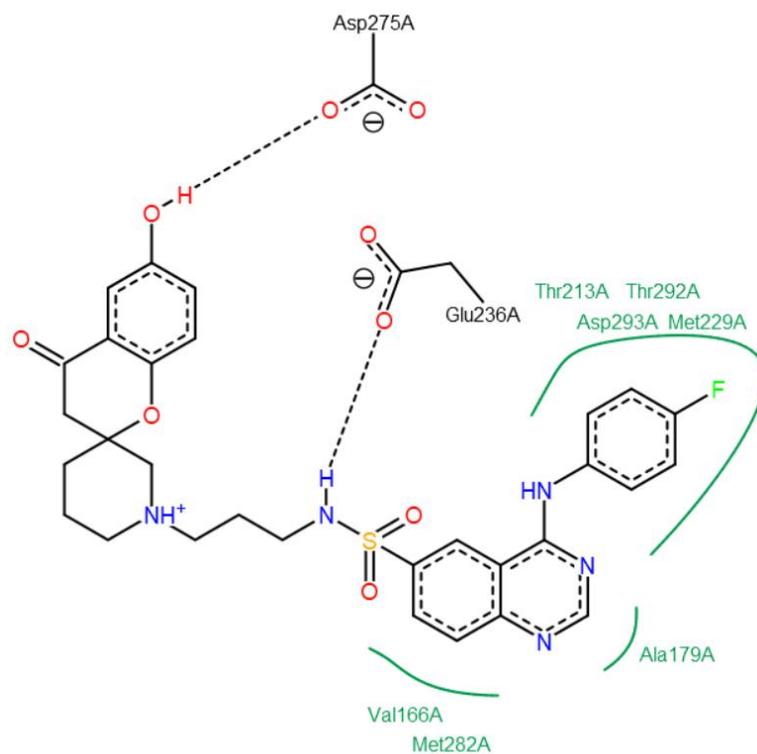


Figura A62. Modo de unión e interacciones de AUMO-12 en 2jdo

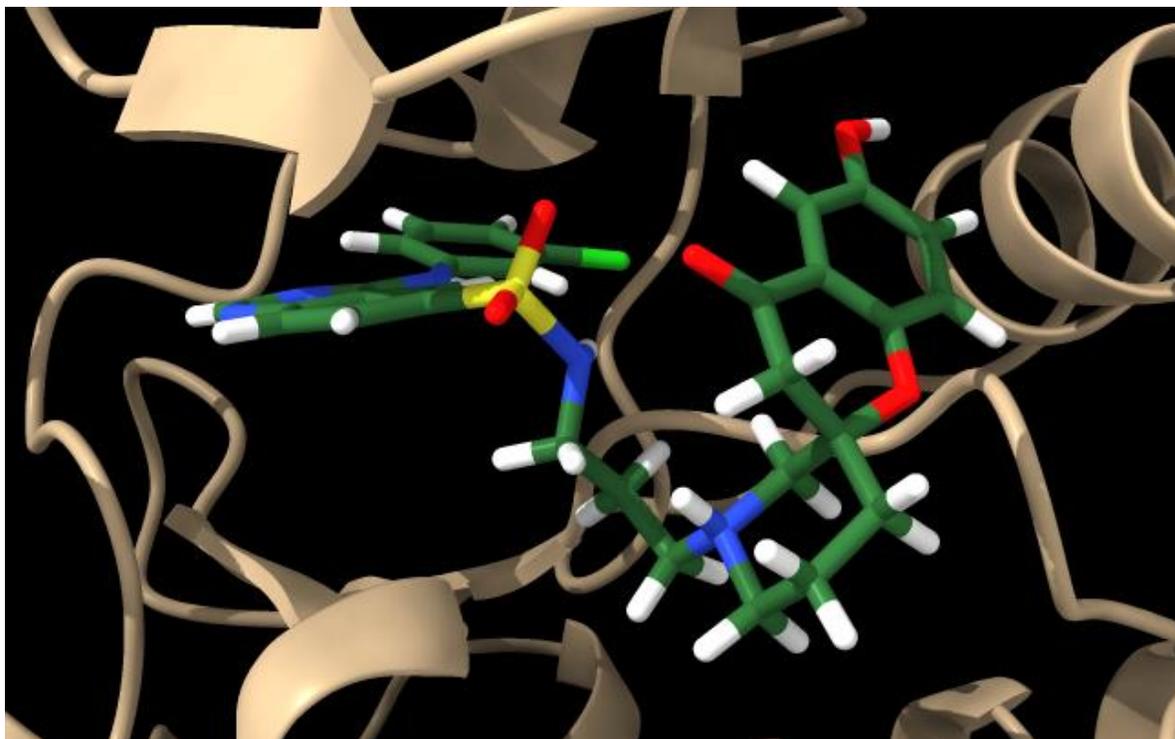
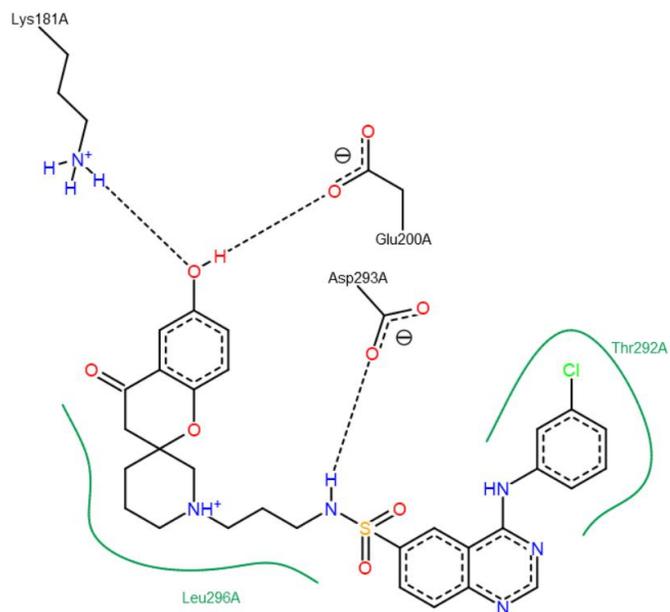


Figura A63. Modo de unión e interacciones de AUMO-13 en 2jdo

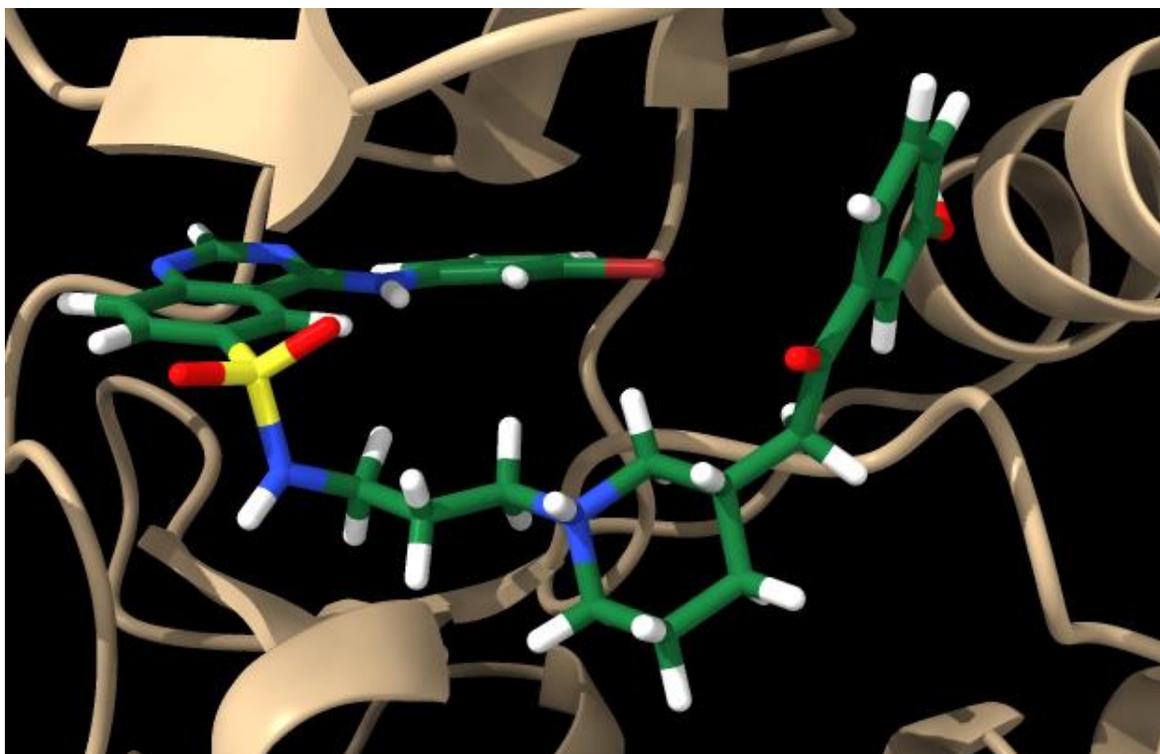
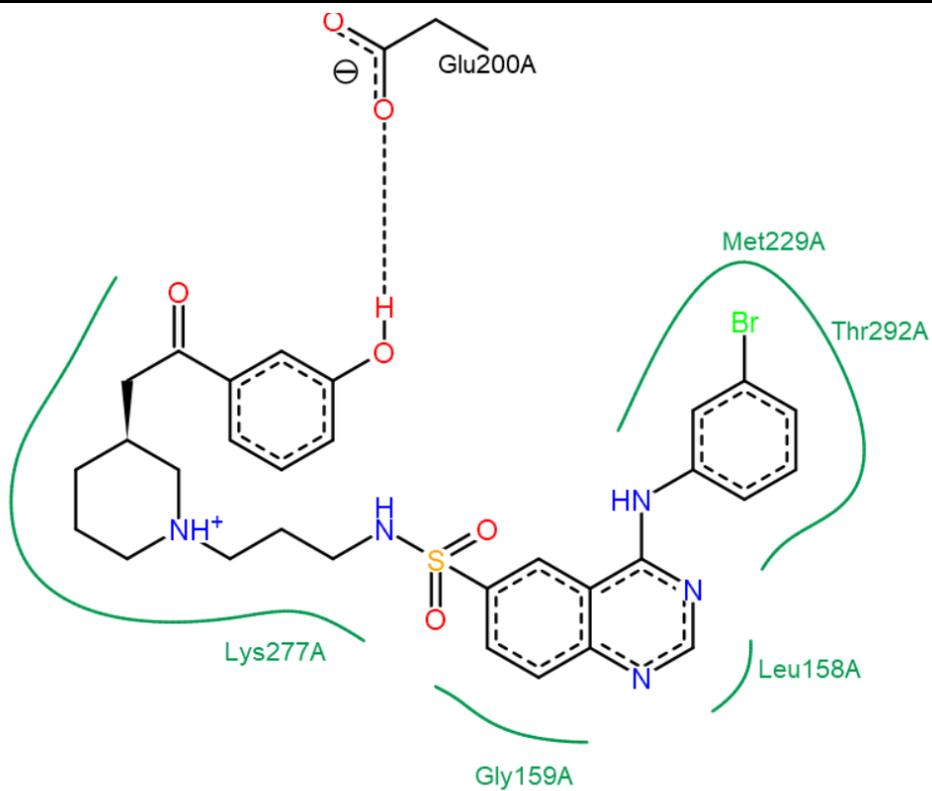


Figura A64. Modo de unión e interacciones de AUMO-14 en 2jdo

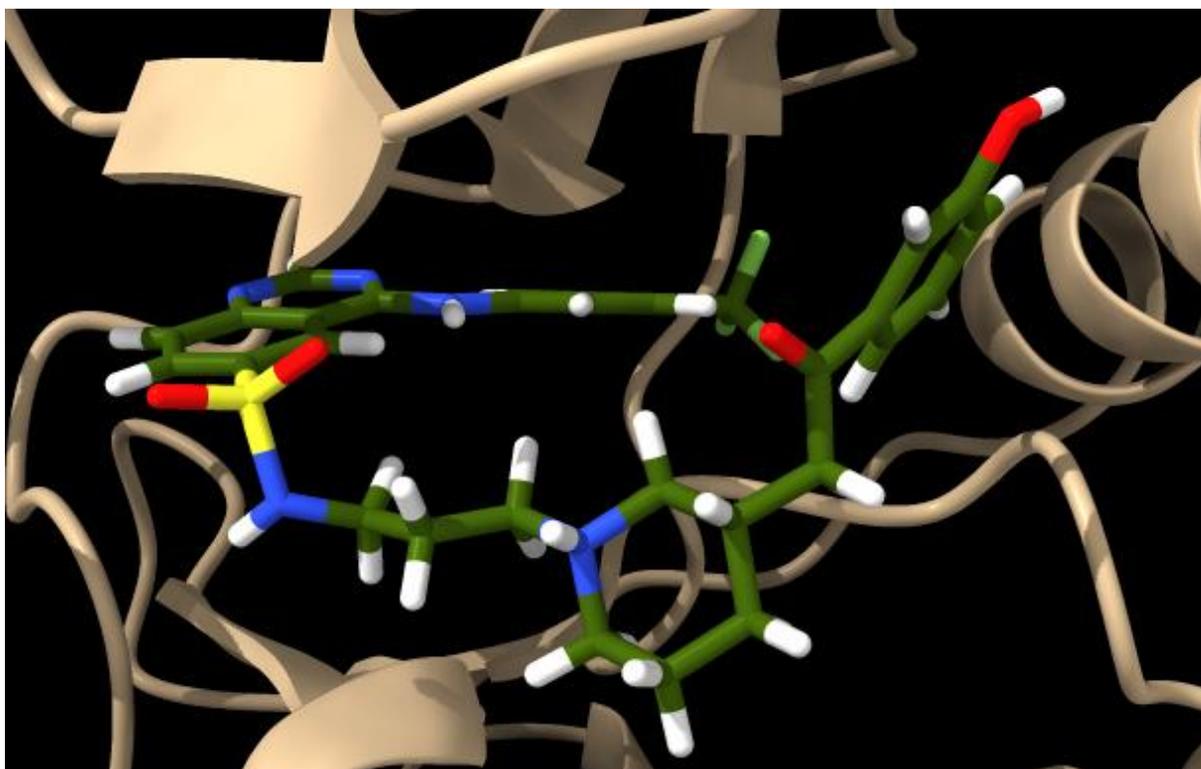
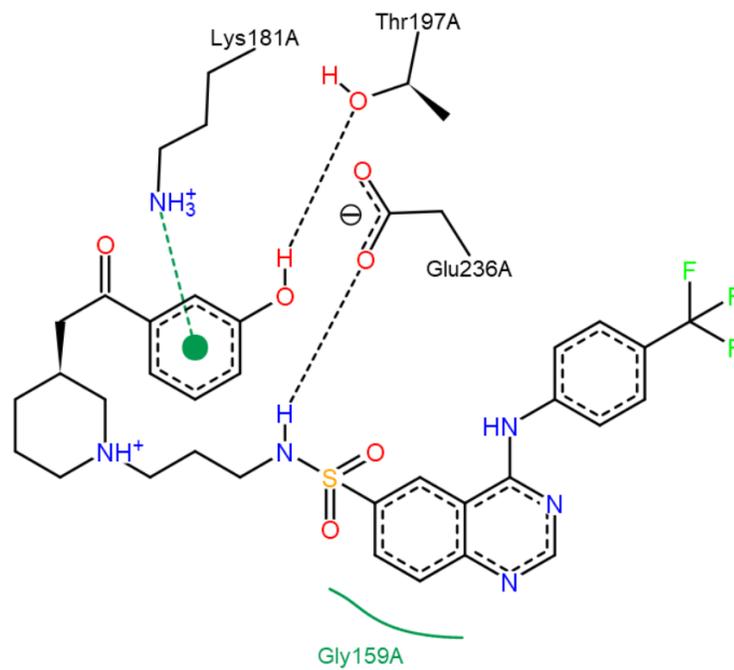


Figura A65. Modo de unión e interacciones de AUMO-15 en 2jdo

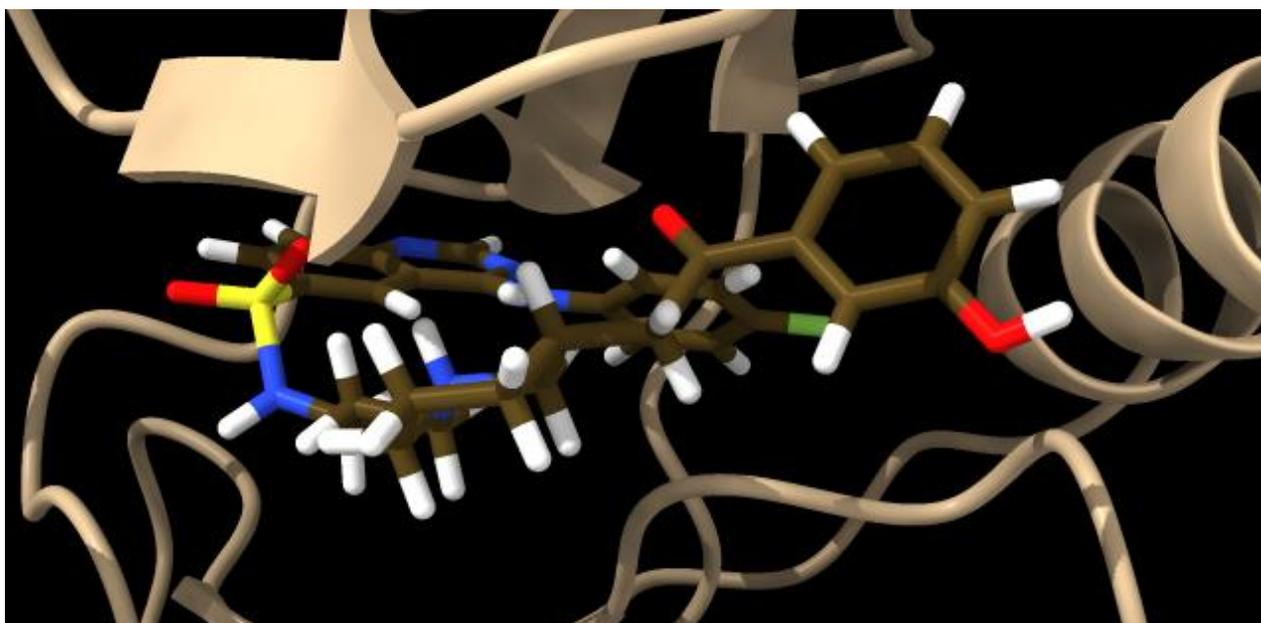
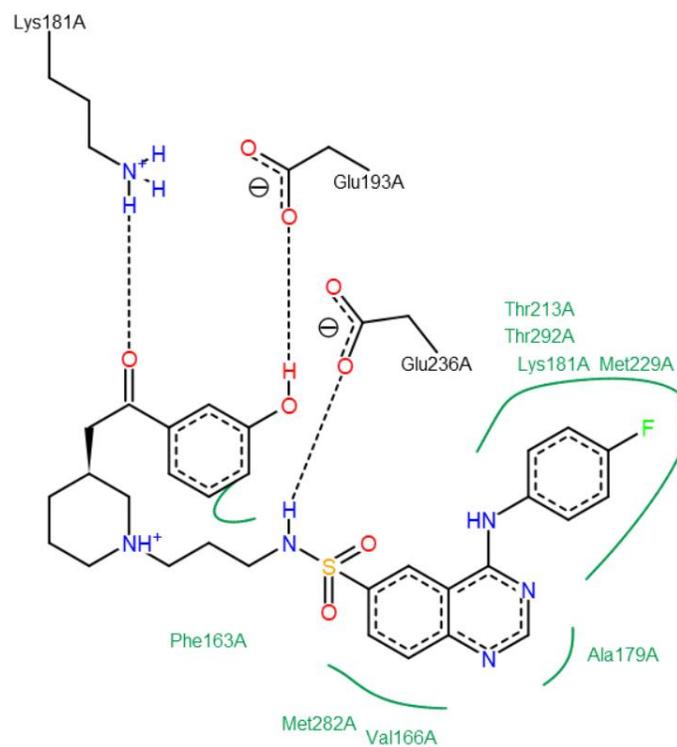


Figura A66. Modo de unión e interacciones de AUMO-16 en 2jdo

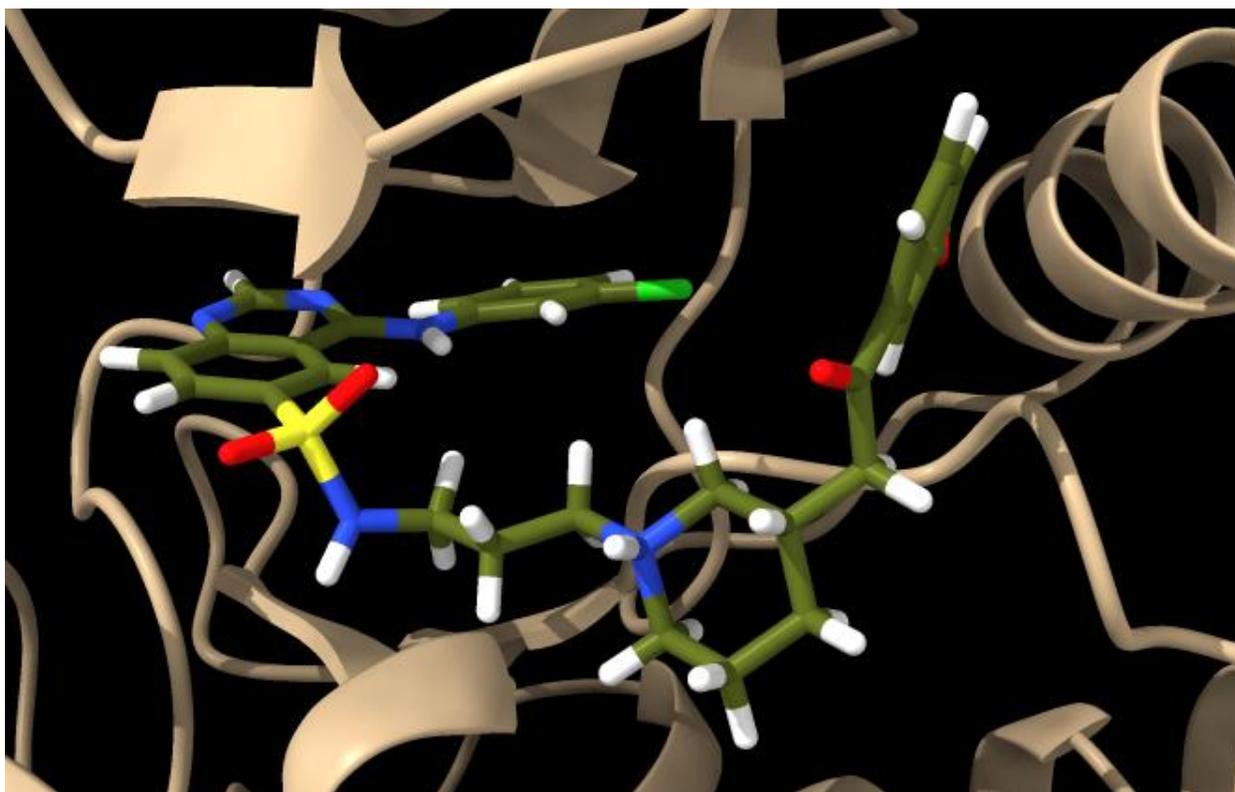
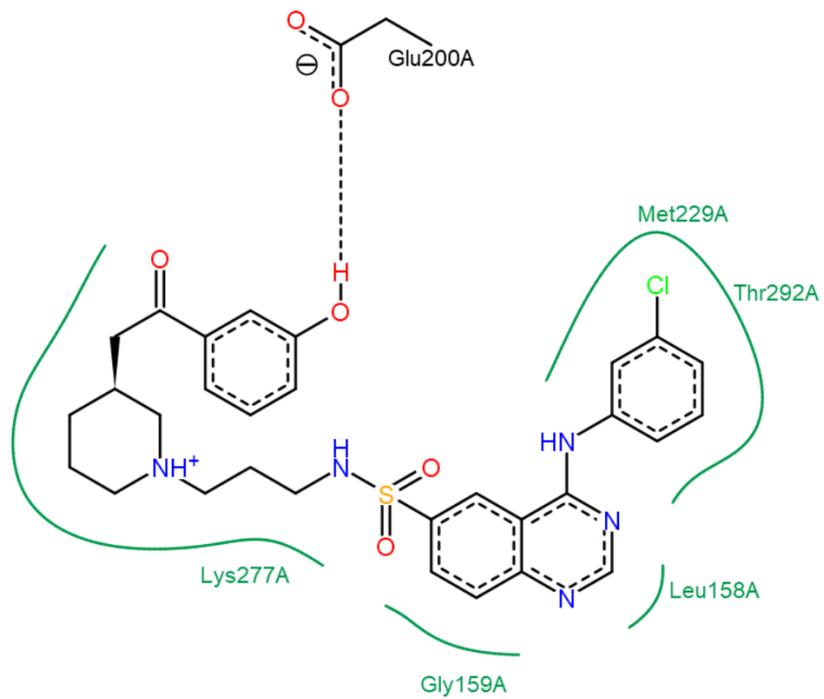


Figura A67. Modo de unión e interacciones de AUMO-17 en 2jdo

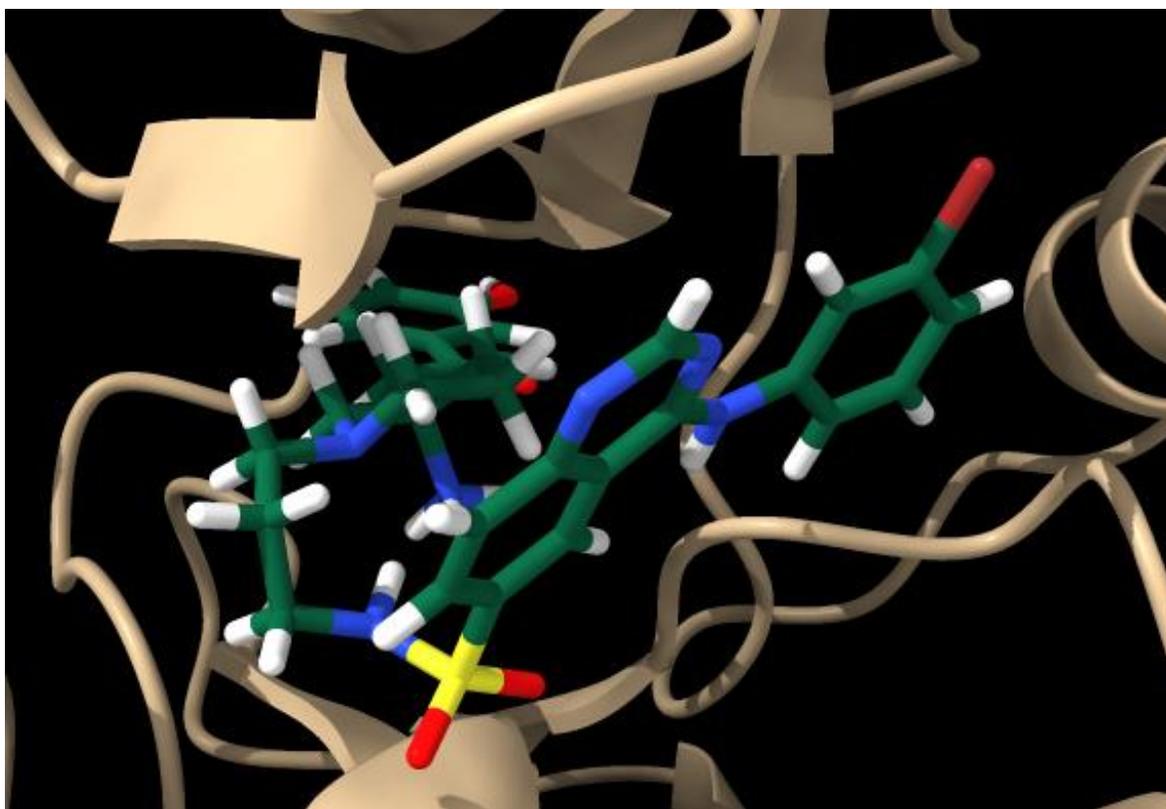
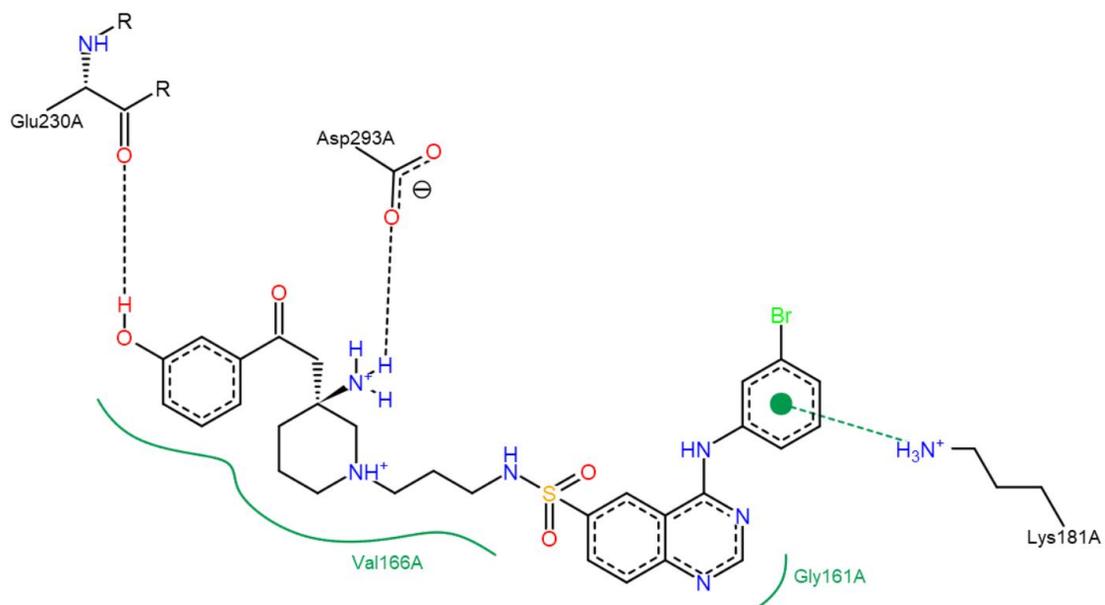


Figura A68. Modo de unión e interacciones de AUMO-18 en 2jdo

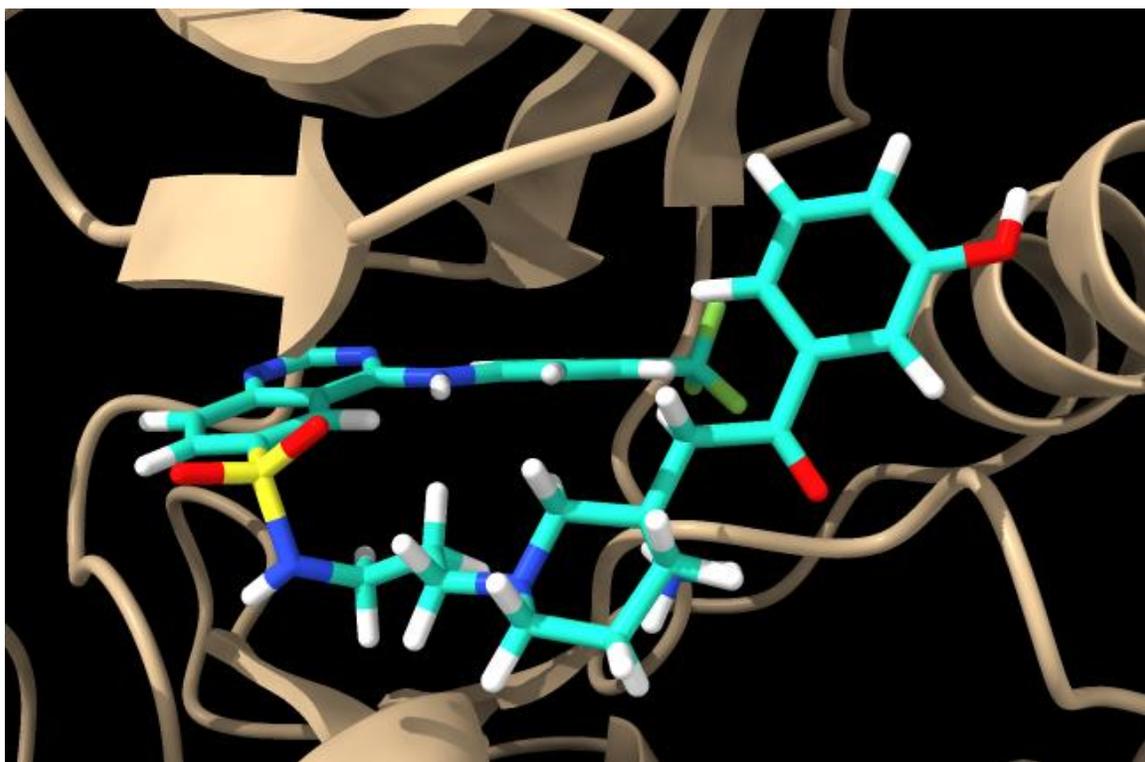
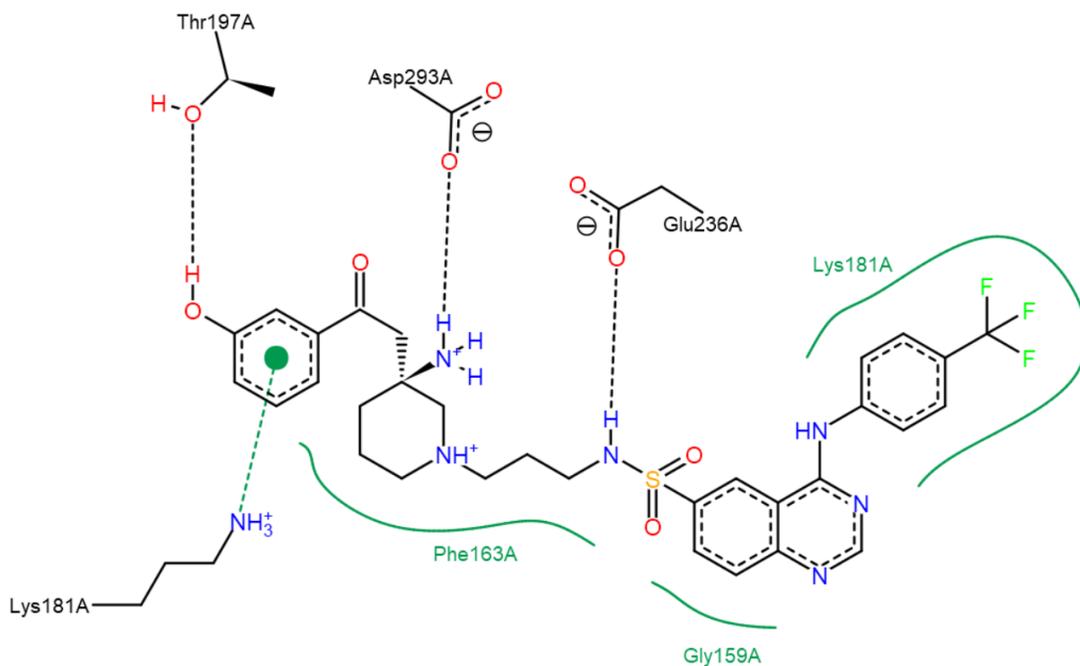


Figura A69. Modo de unión e interacciones de AUMO-19 en 2jdo

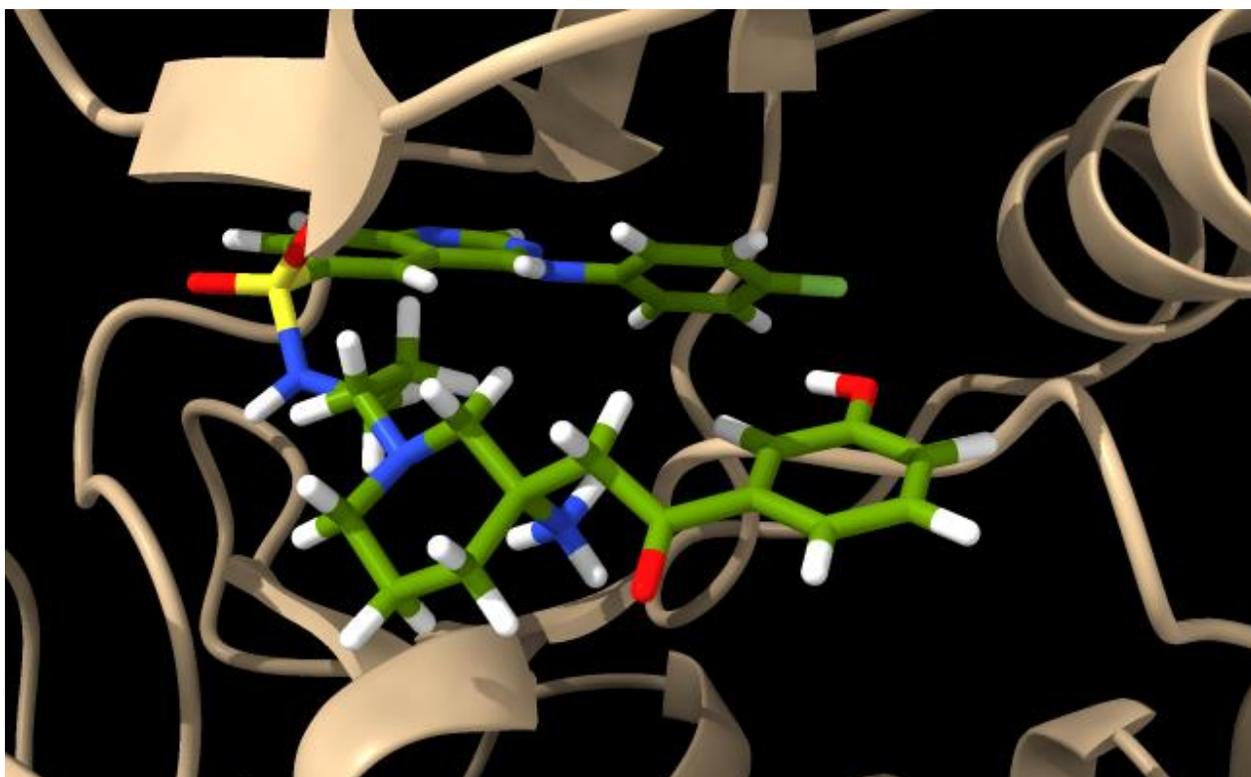
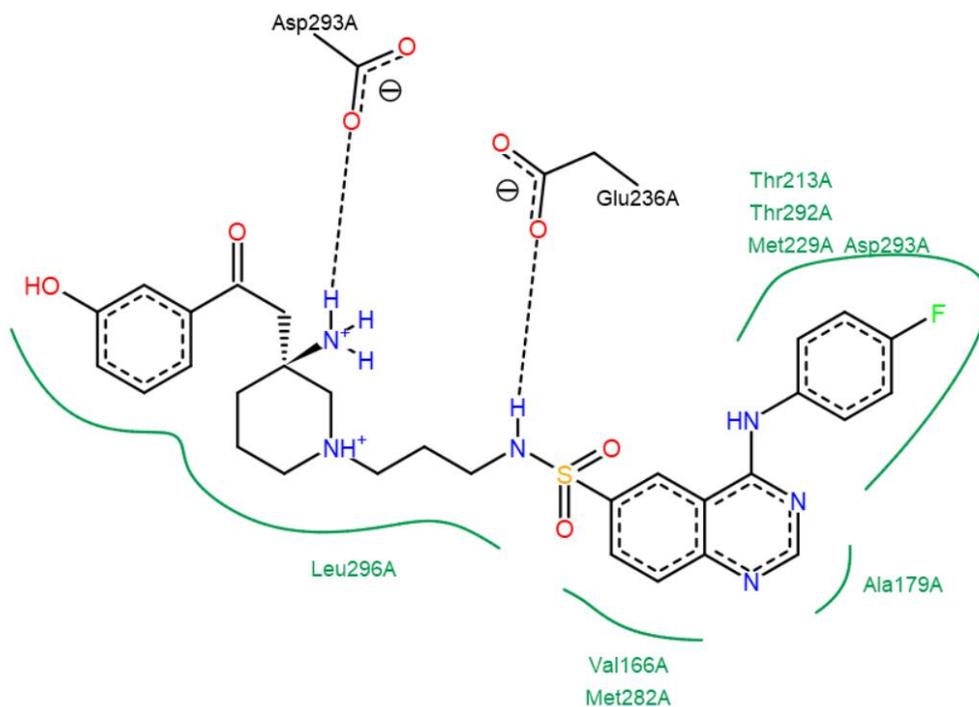


Figura A70. Modo de unión e interacciones de AUMO-20 en 2jdo

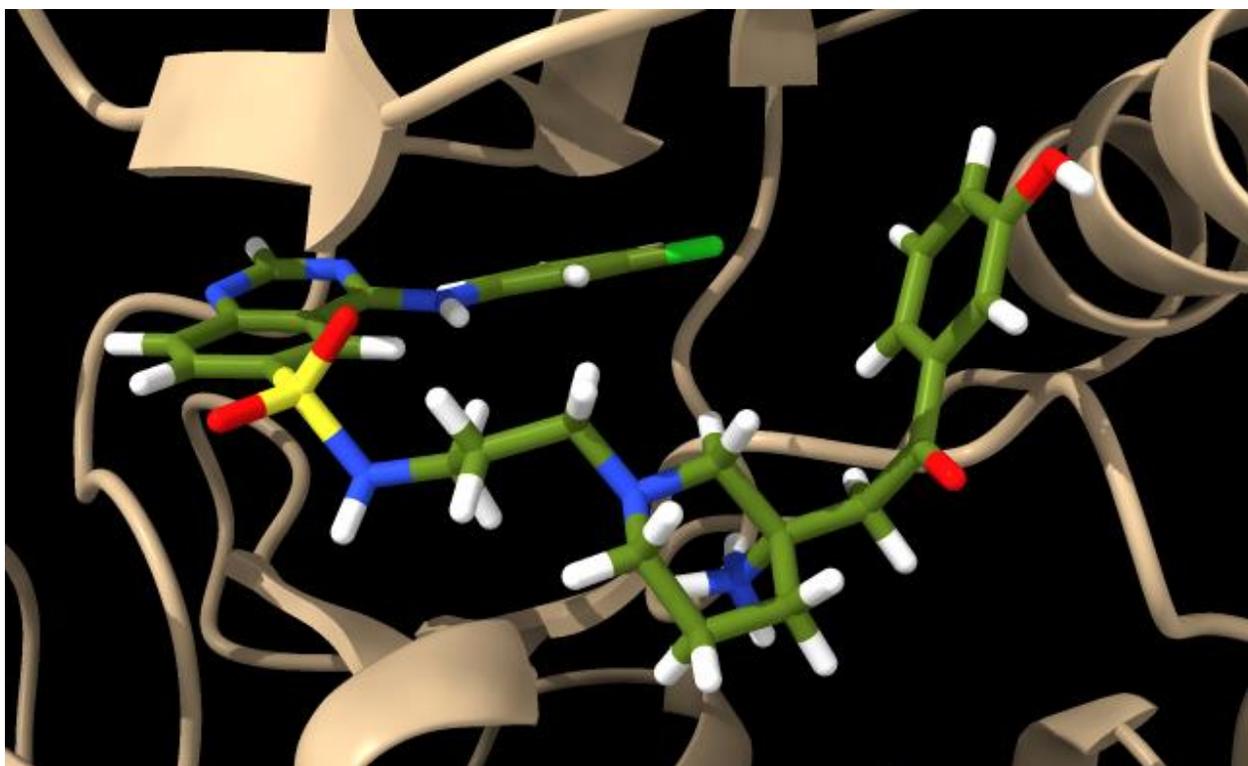
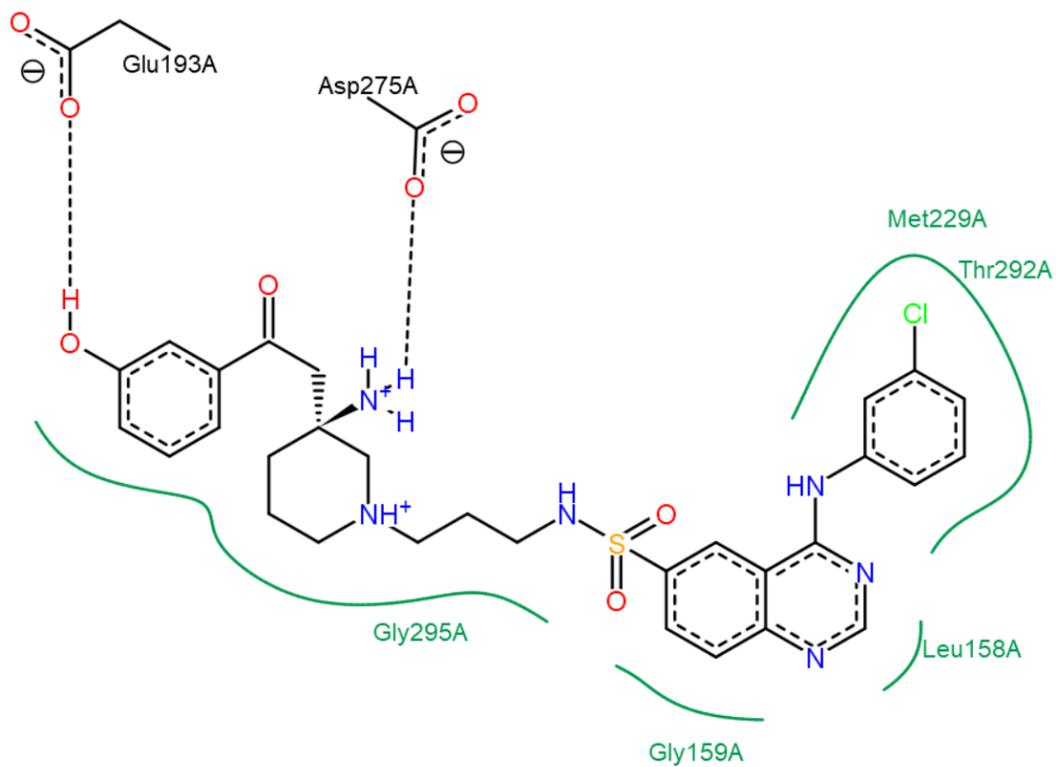


Figura A71. Modo de unión e interacciones de AUMO-21 en 2jdo

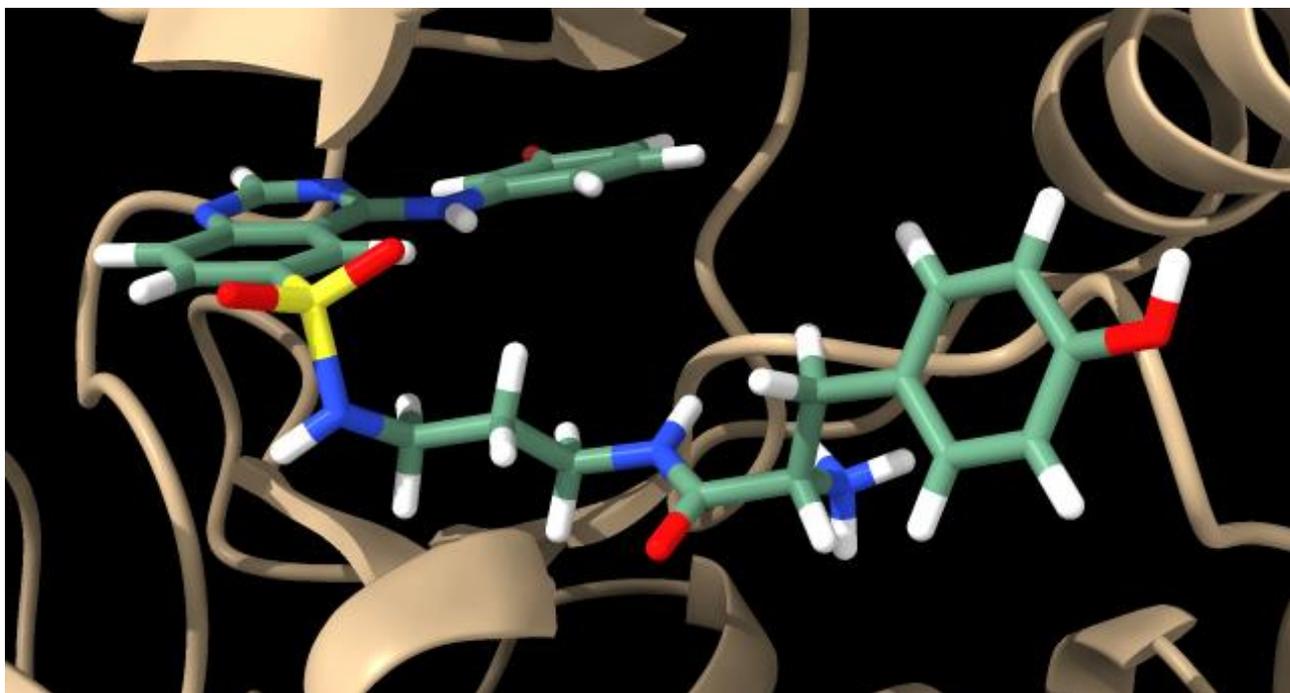
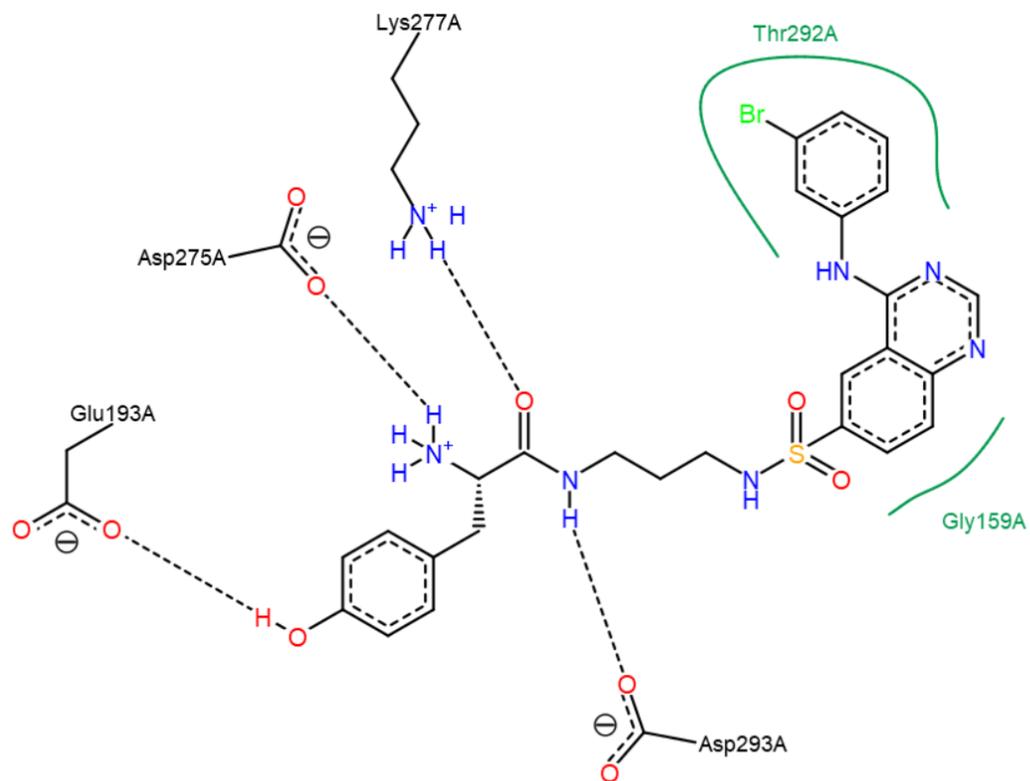


Figura A72. Modo de unión e interacciones de AUMO-22 en 2jdo

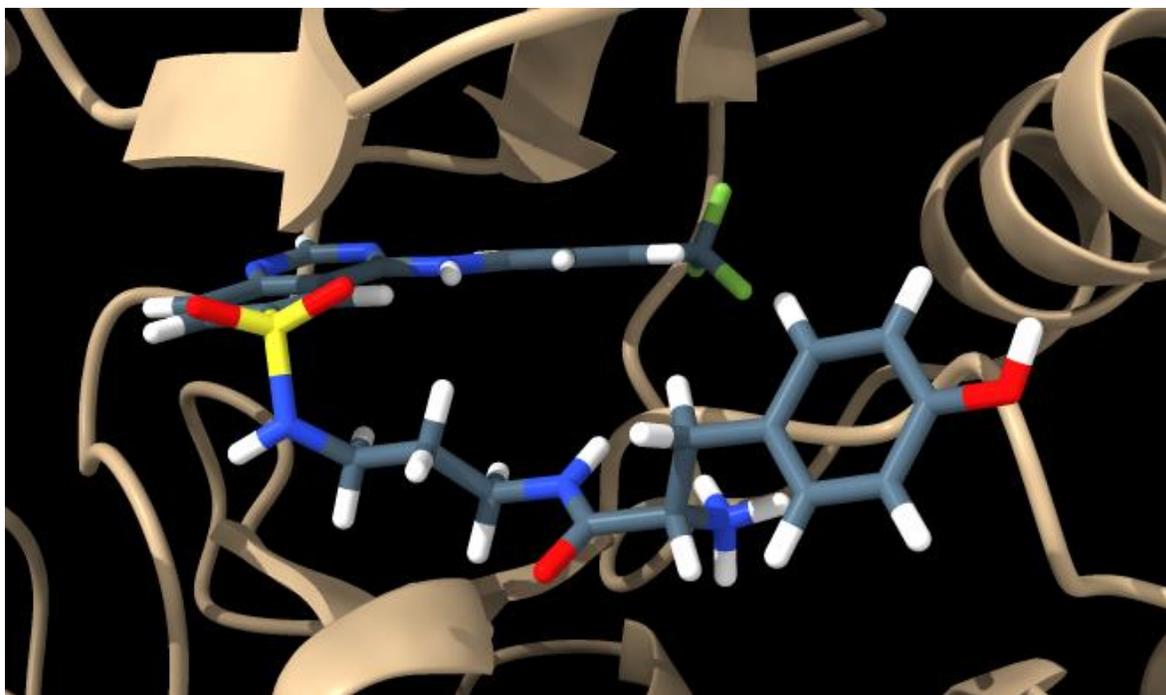
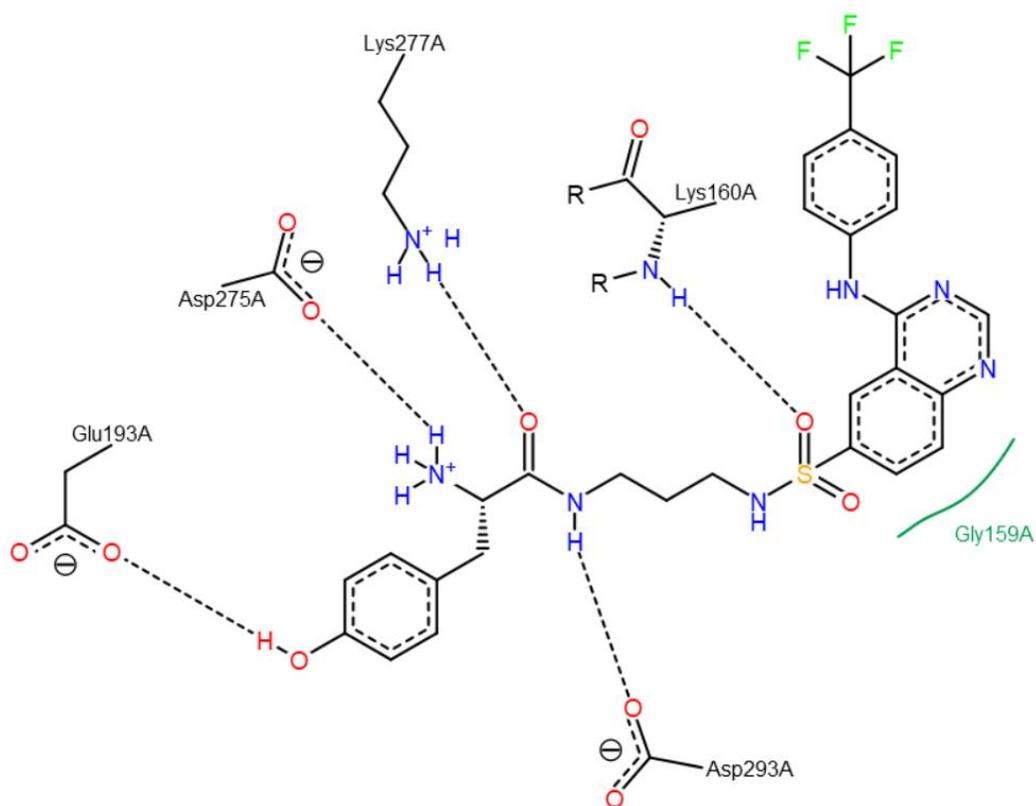


Figura A73. Modo de unión e interacciones de AUMO-23 en 2jdo

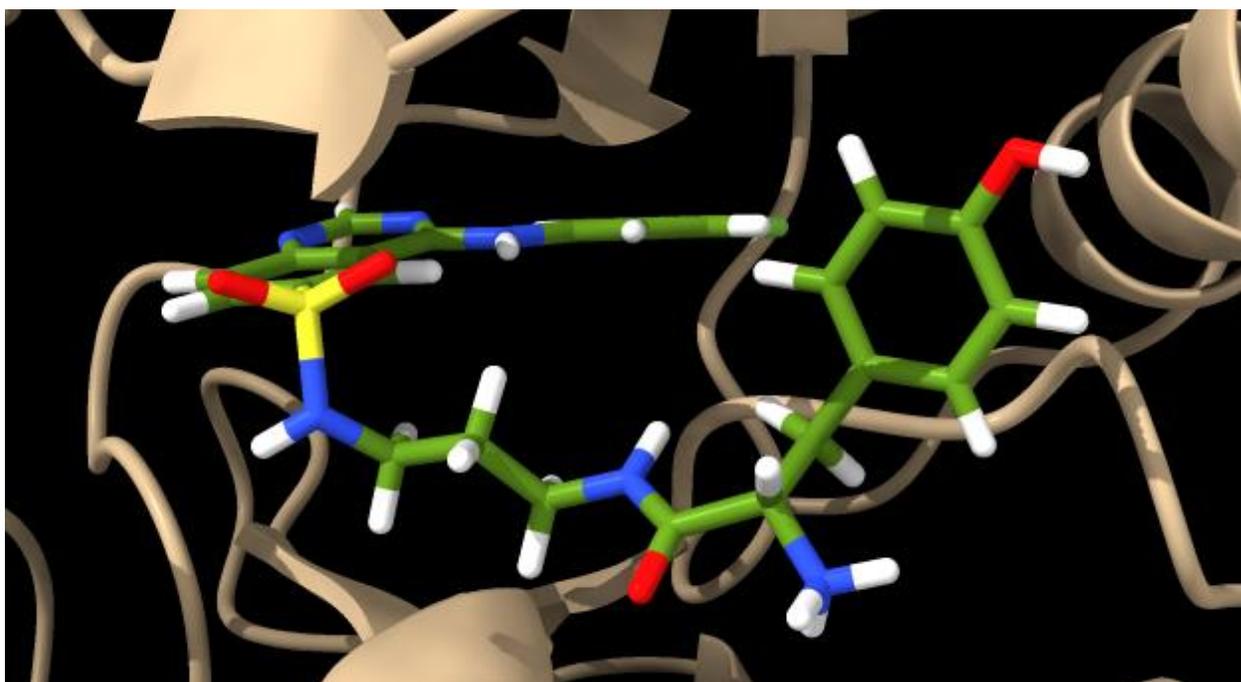
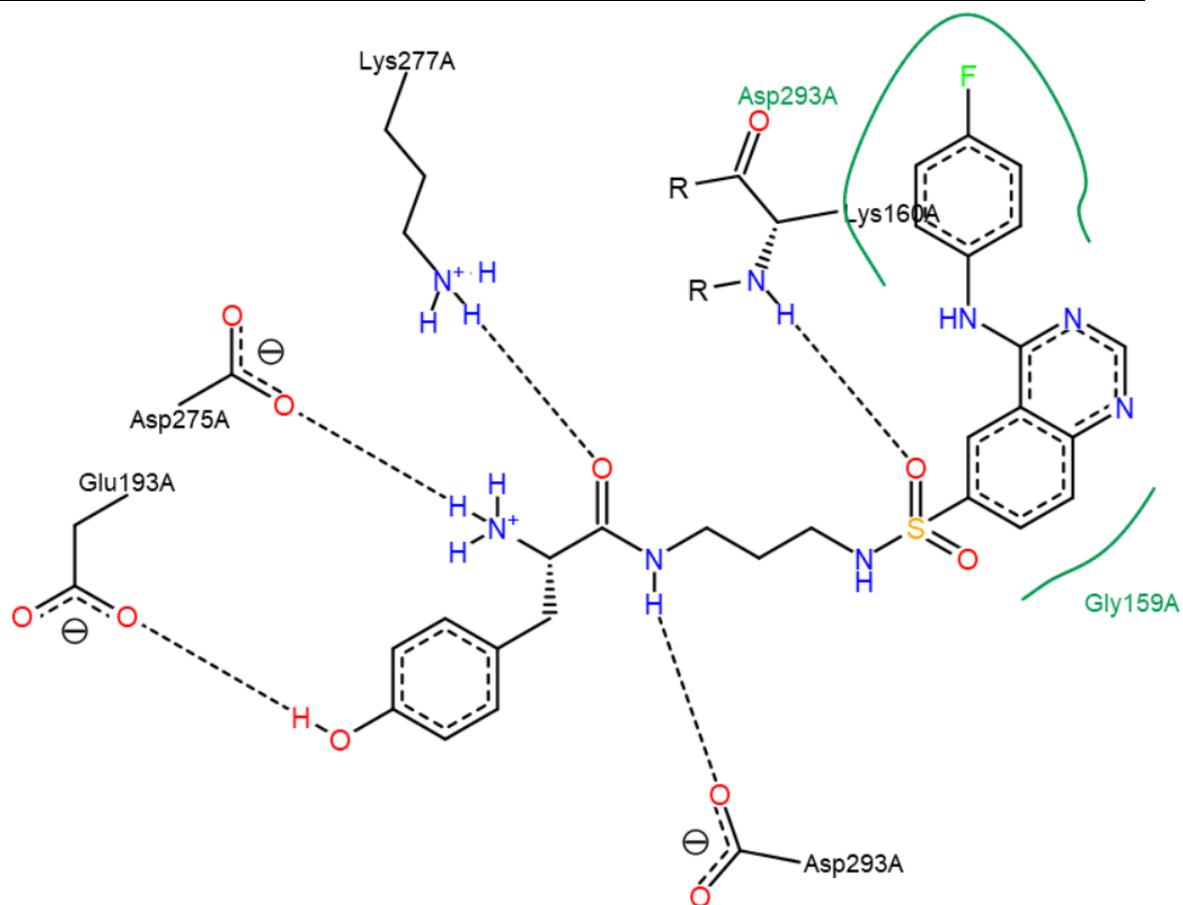


Figura A74. Modo de unión e interacciones de AUMO-24 en 2jdo

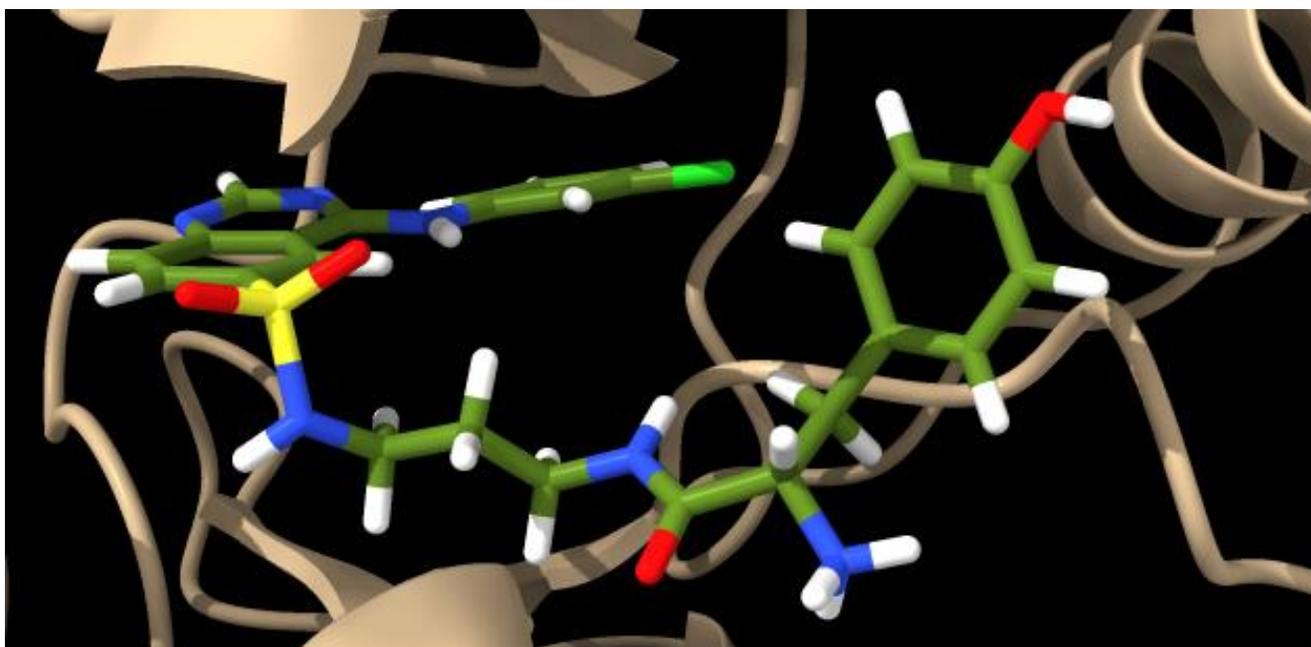
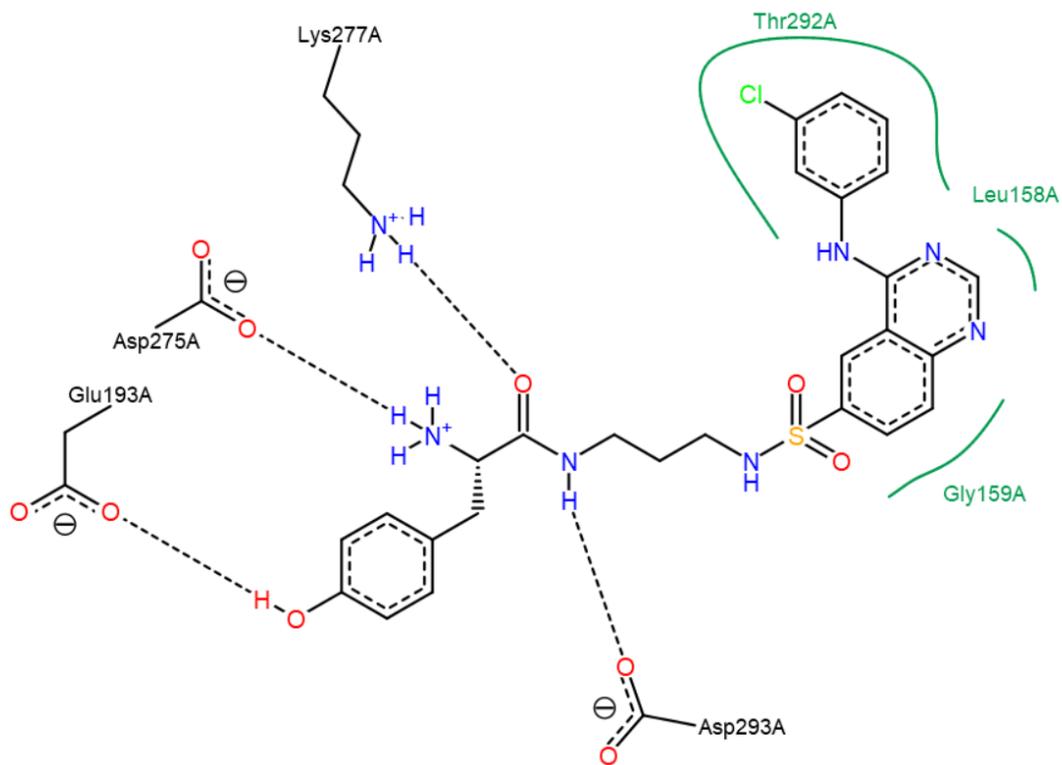


Figura A75. Modo de unión e interacciones de AUMO-25 en 2jdo

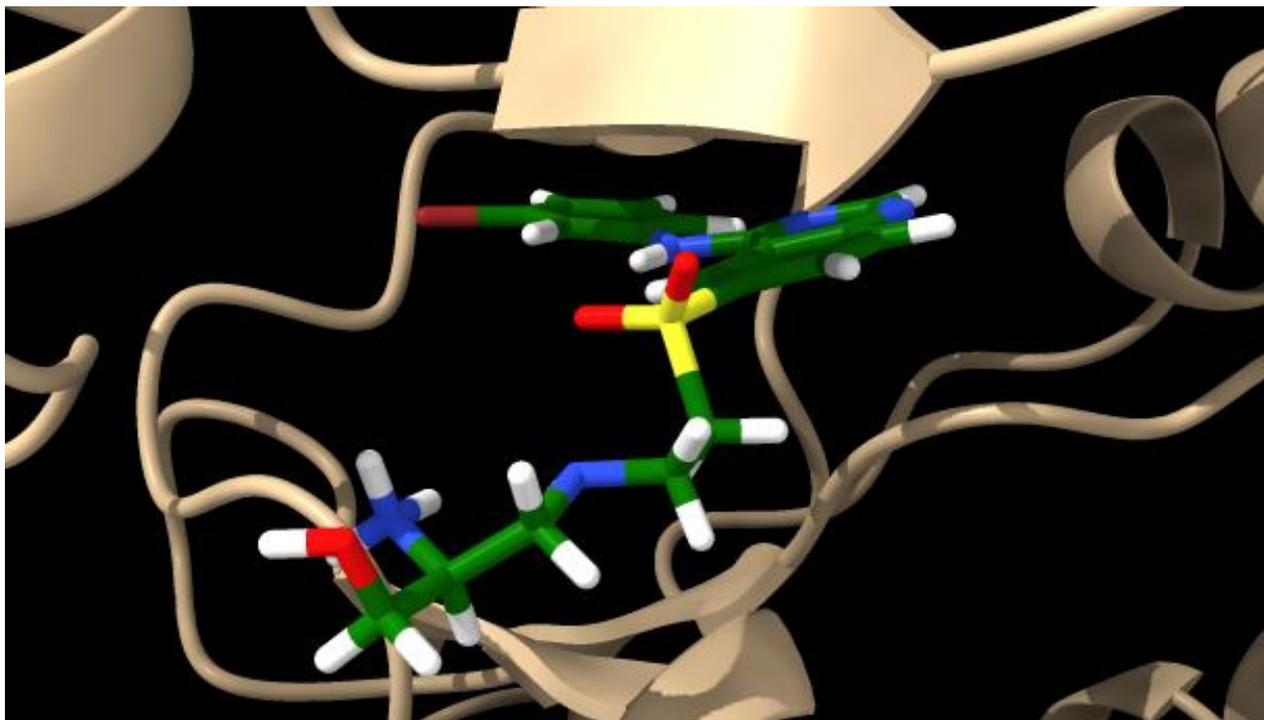
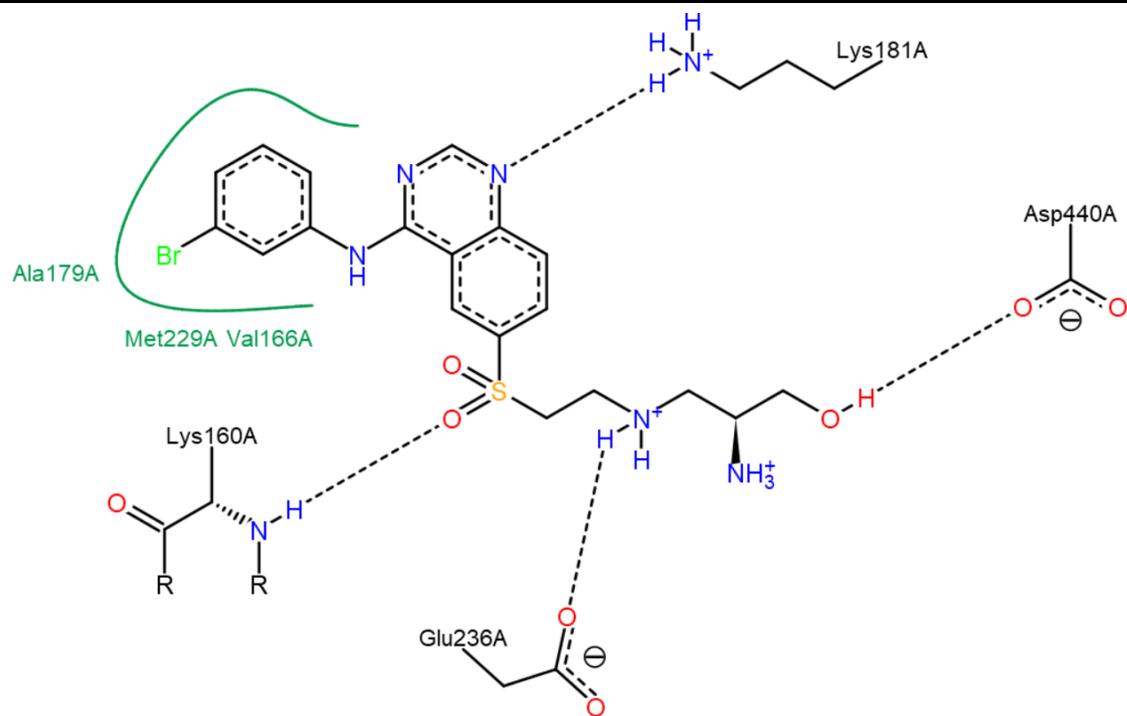


Figura A76. Modo de unión e interacciones de AUMO-26 en 2jdo

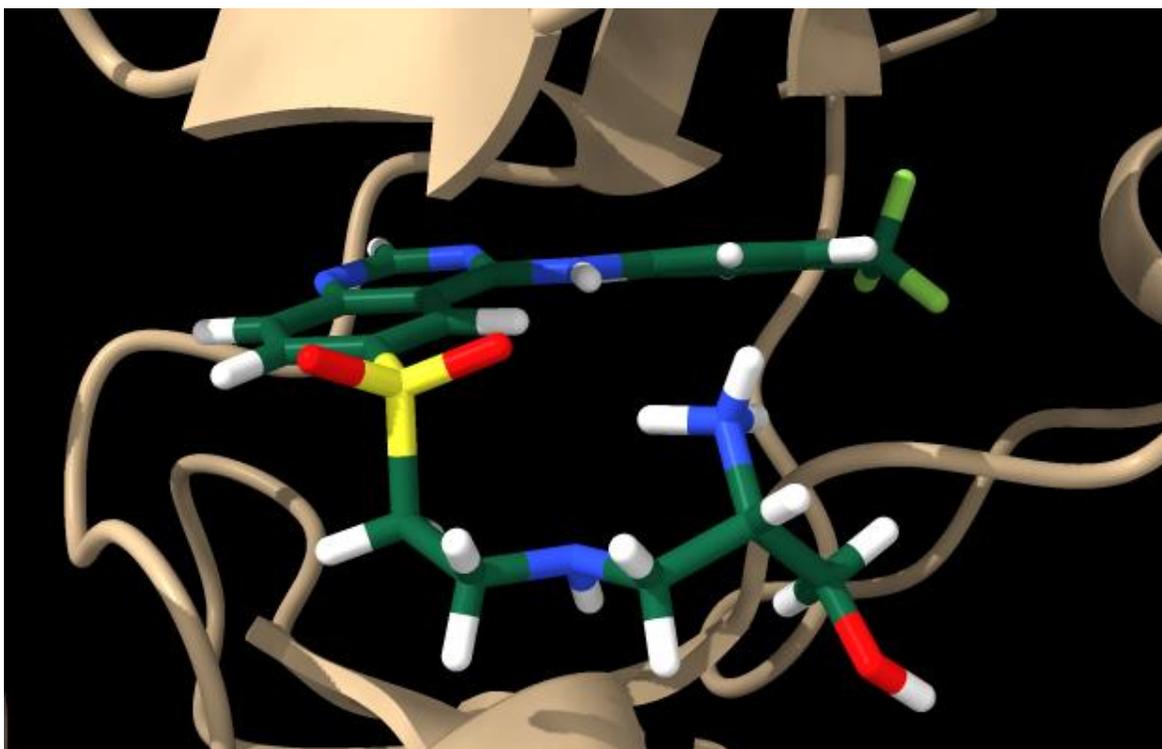
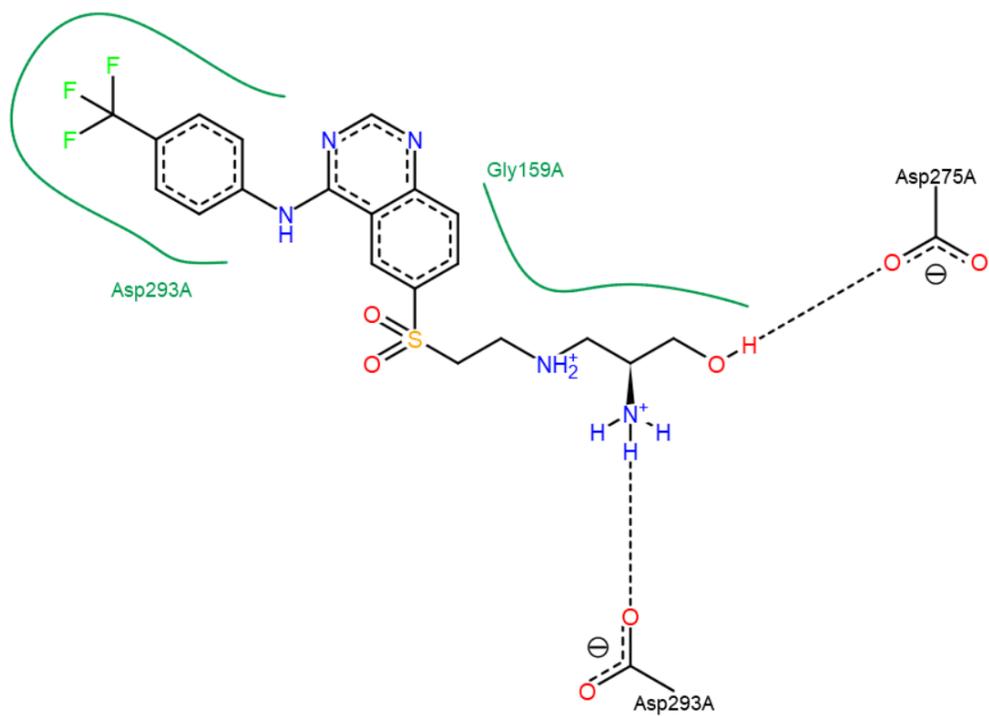


Figura A77. Modo de unión e interacciones de AUMO-27 en 2jdo

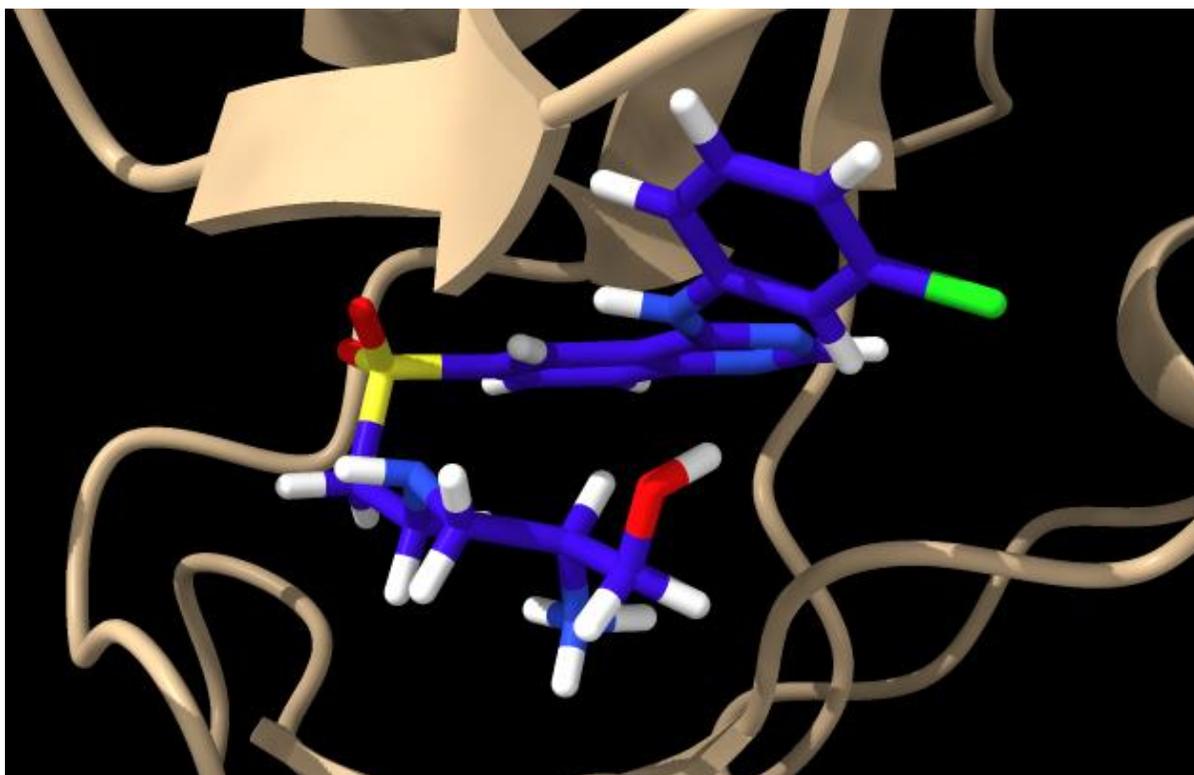
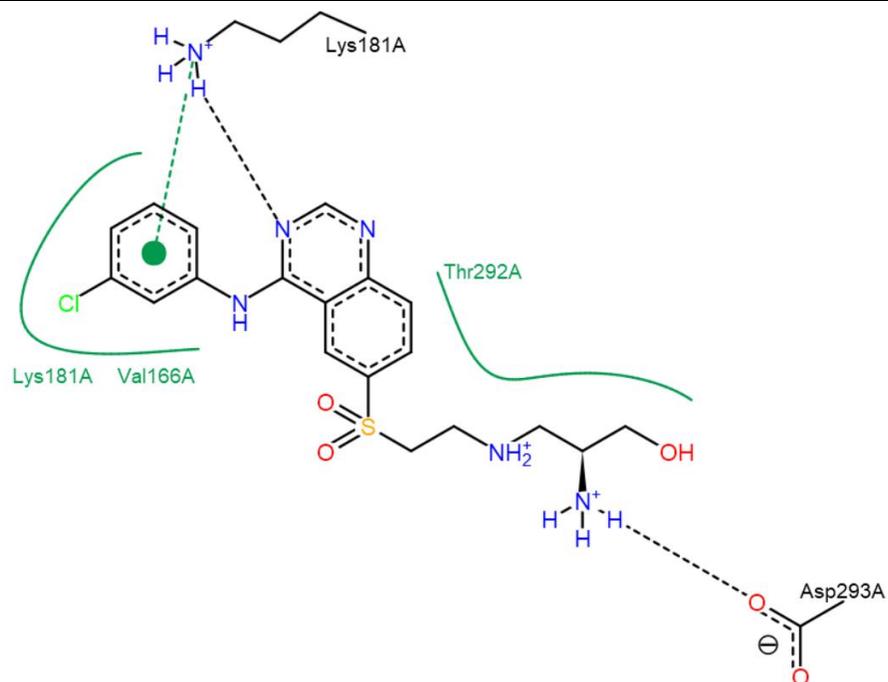


Figura A78. Modo de unión e interacciones de AUMO-29 en 2jdo

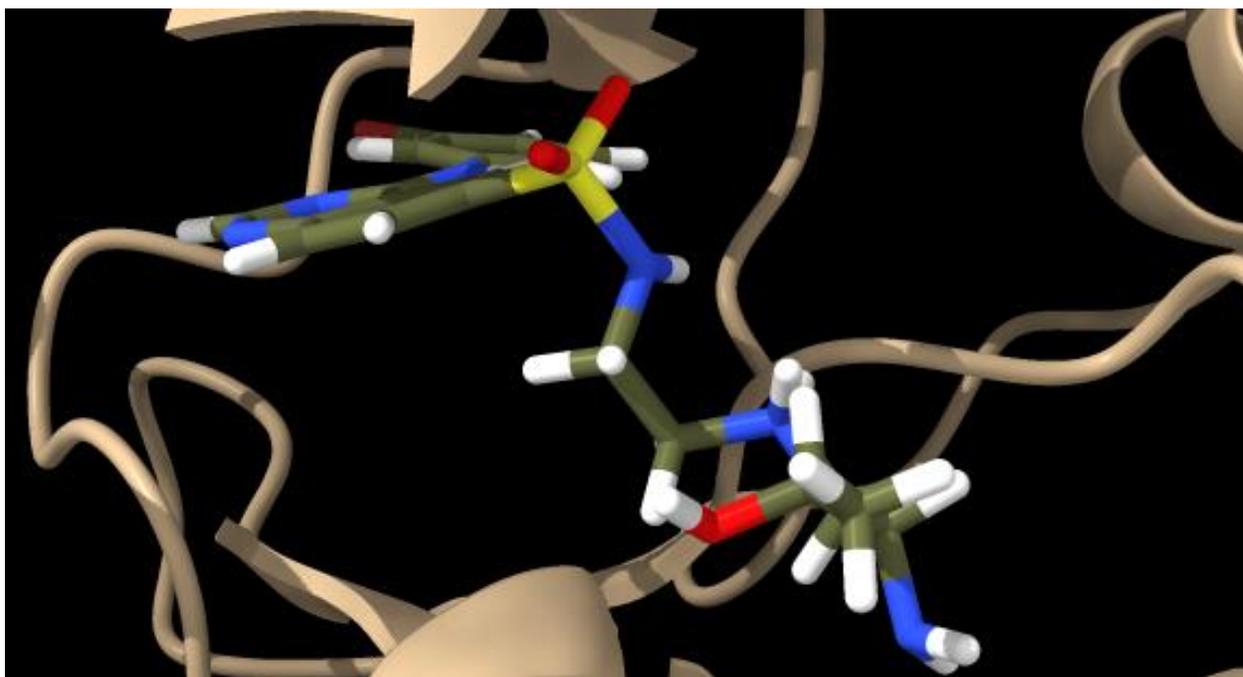
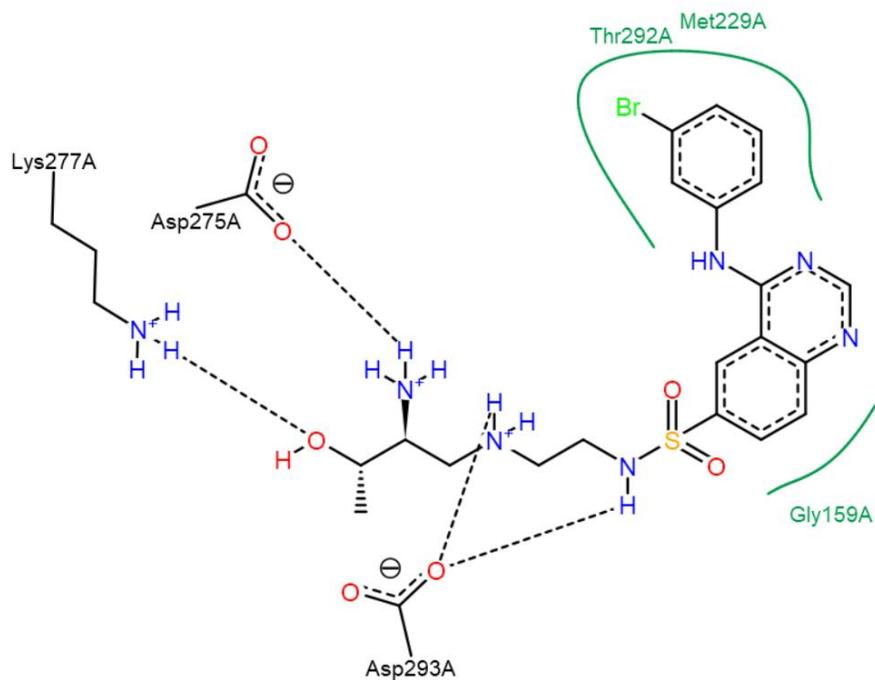


Figura A79. Modo de unión e interacciones de AUMO-30 en 2jdo

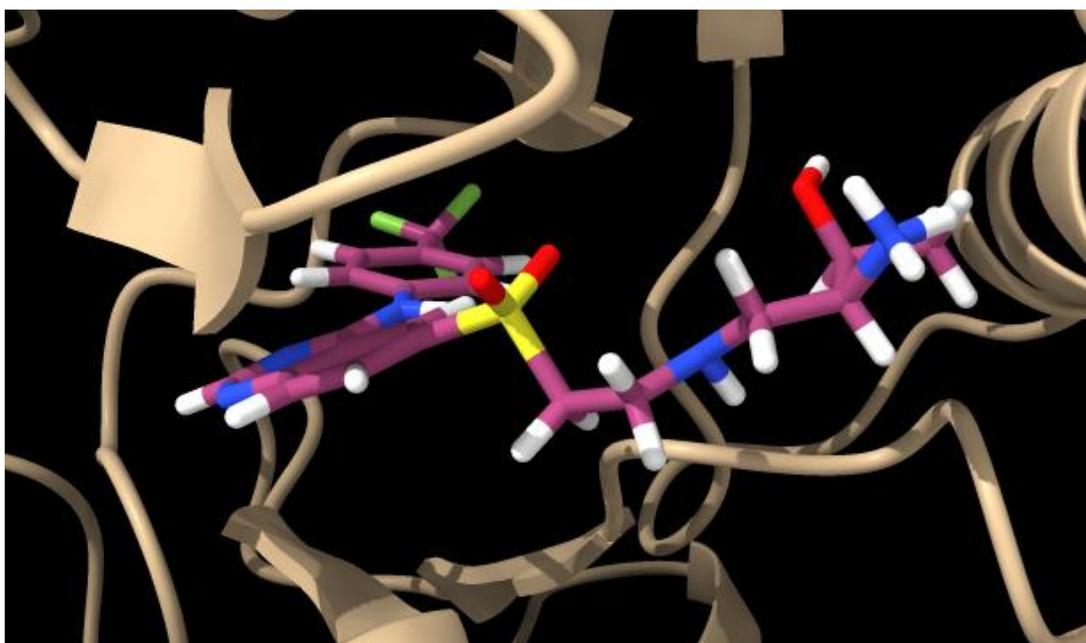
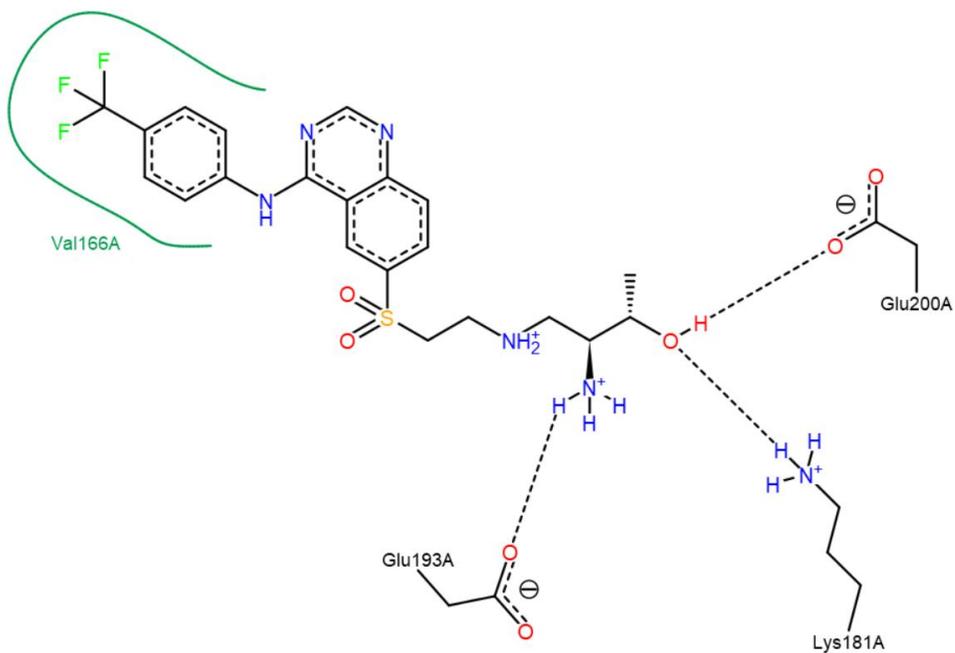


Figura A80. Modo de unión e interacciones de AUMO-31 en 2jdo

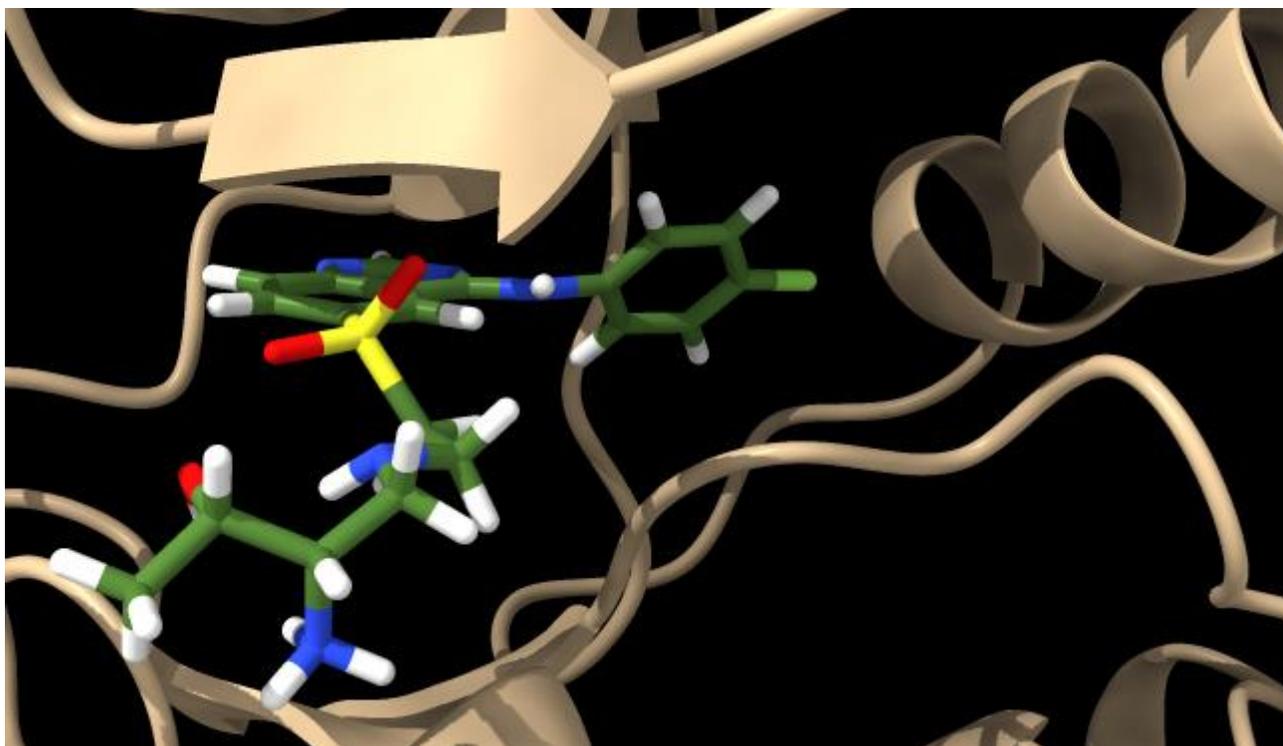
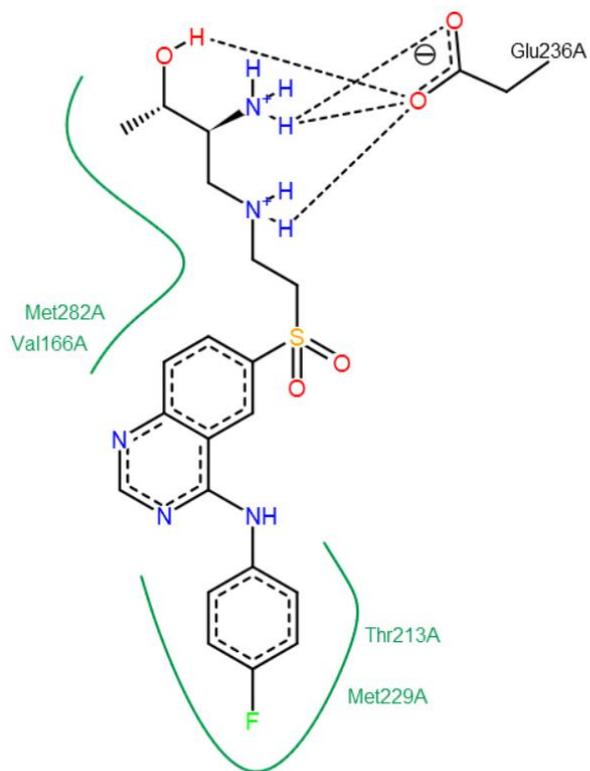


Figura A81. Modo de unión e interacciones de AUMO-32 en 2jdo

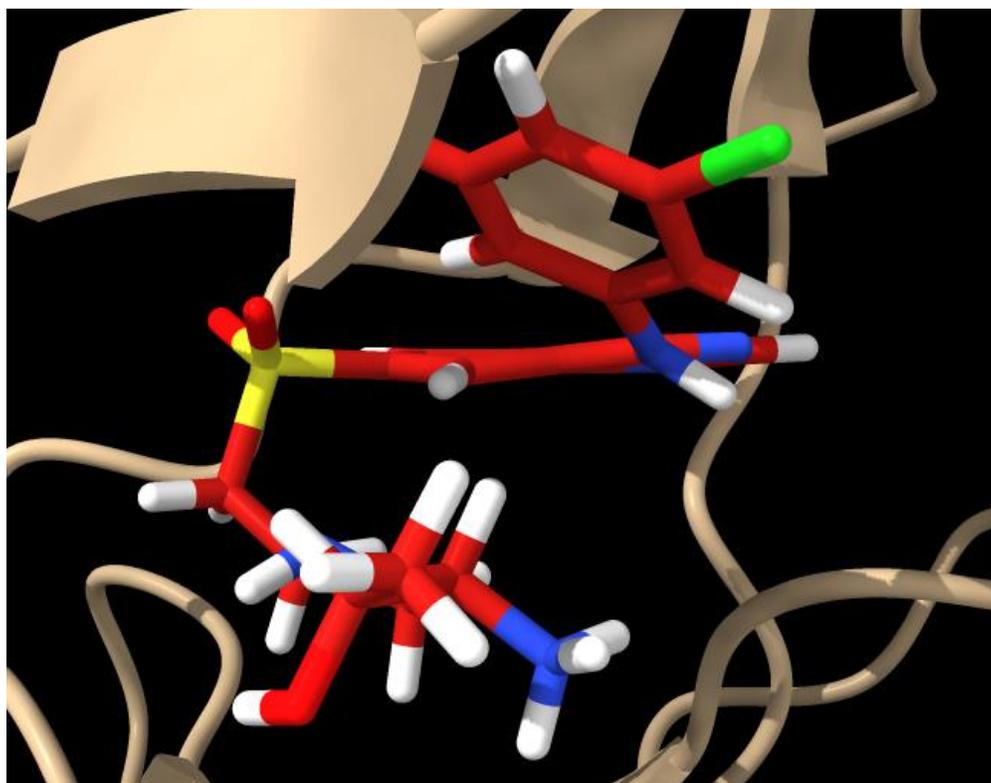
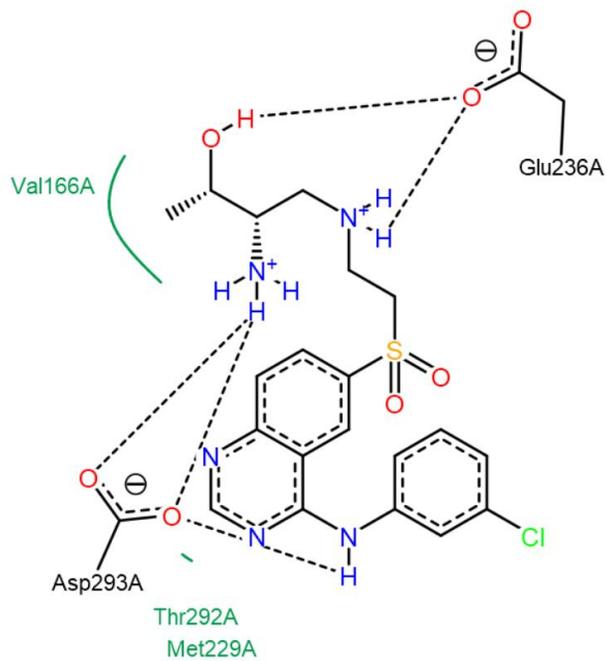


Figura A82. Modo de unión e interacciones de AUMO-33 en 2jdo

A 4.5 Especiación ácido base de AUMO-28

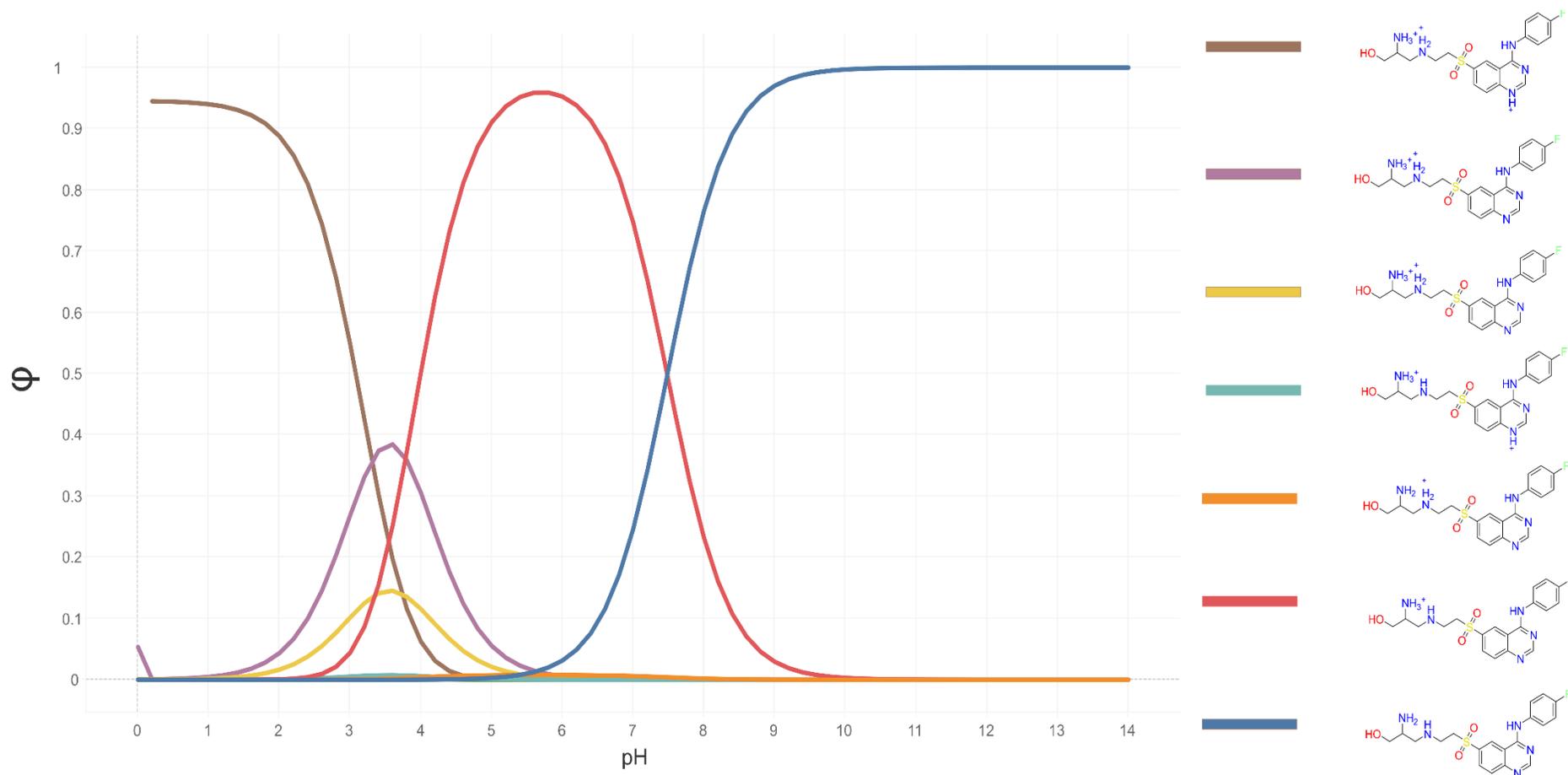


Gráfico A1. Diagrama de distribución de especies ácido-base de AUMO-28. Se muestran las especies involucradas y sus respectivas curvas. Diagrama generado a partir del paquete Protonating de ChemAxom.

APÉNDICE V. DINÁMICA MOLECULAR

A 5.1 AUMO-28 en EGFR

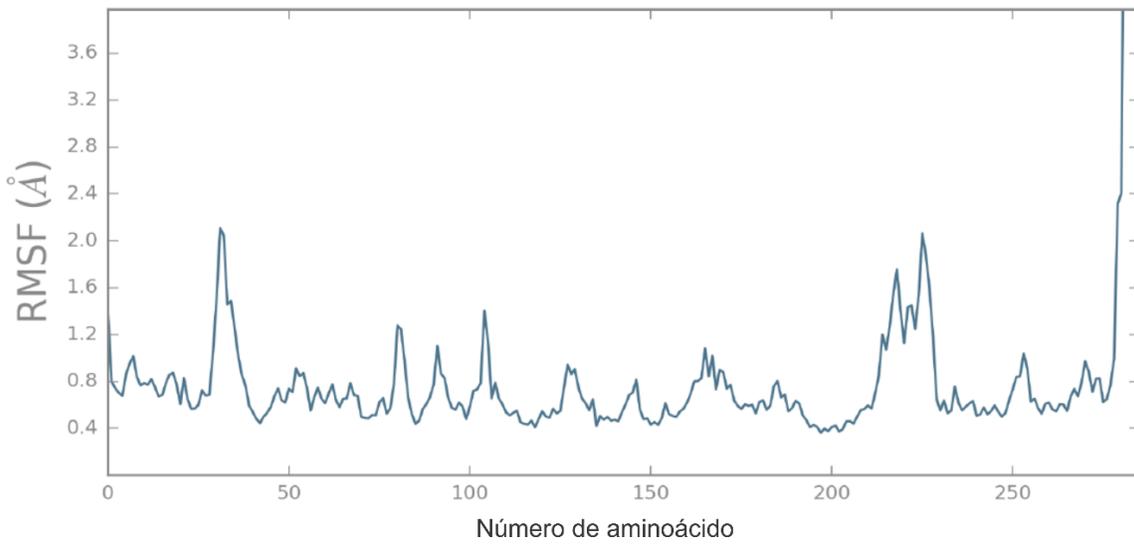


Gráfico A2. RMSF de EGFR en la dinámica molecular

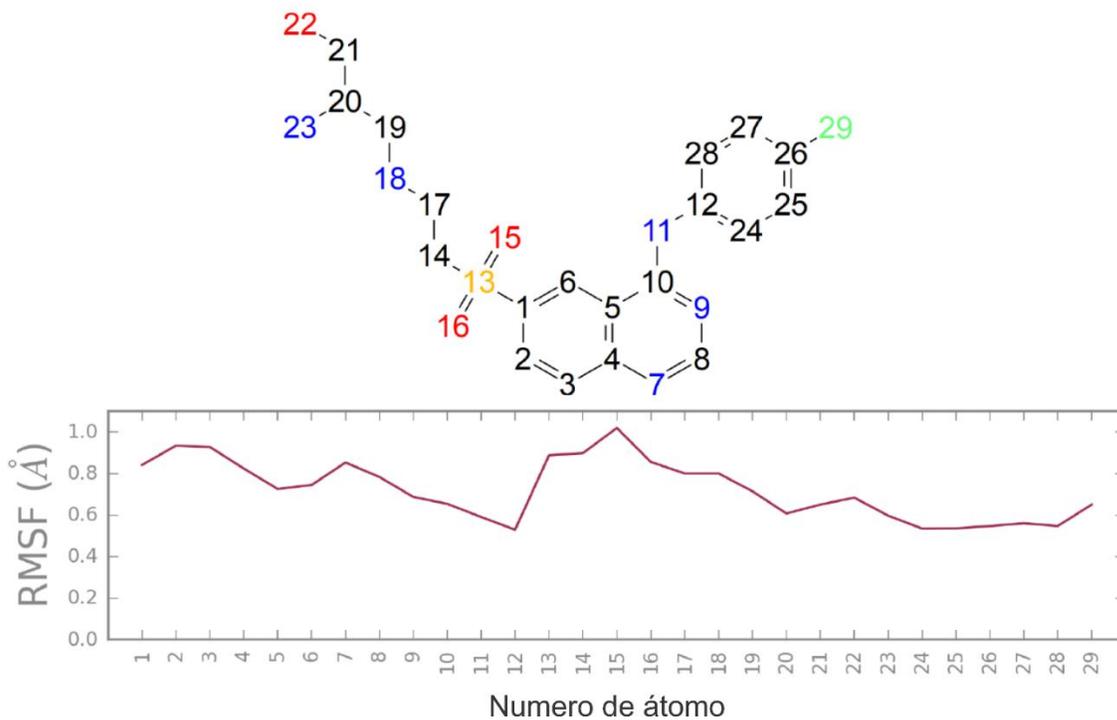


Gráfico A3. RMSF de AUMO-28 con respecto al sitio de unión en EGFR

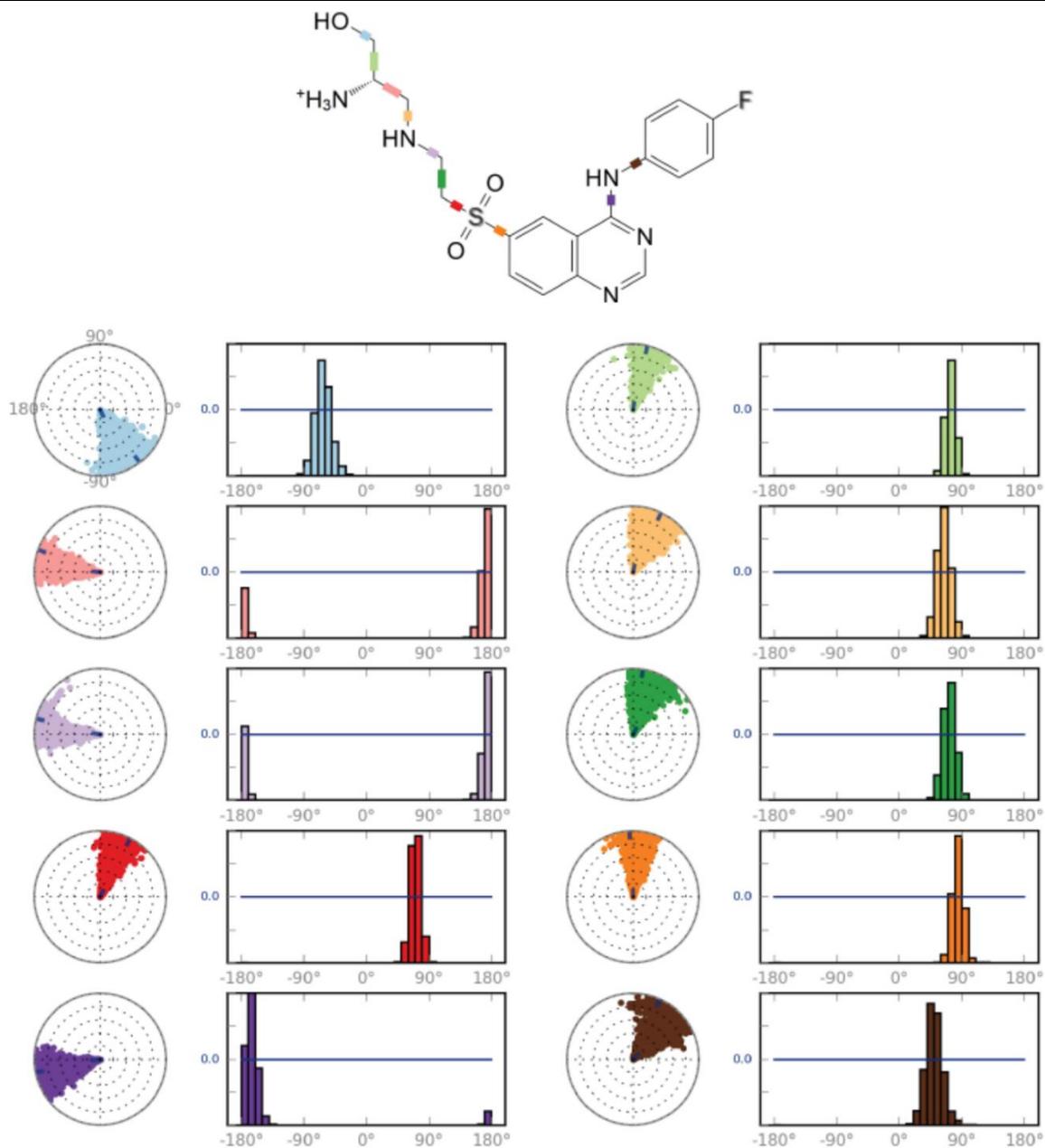


Gráfico A4. Ángulos de torsión de los enlaces rotables de AUMO-28 en la dinámica molecular de EGFR

A 5.2 AUMO-28 en AKT2

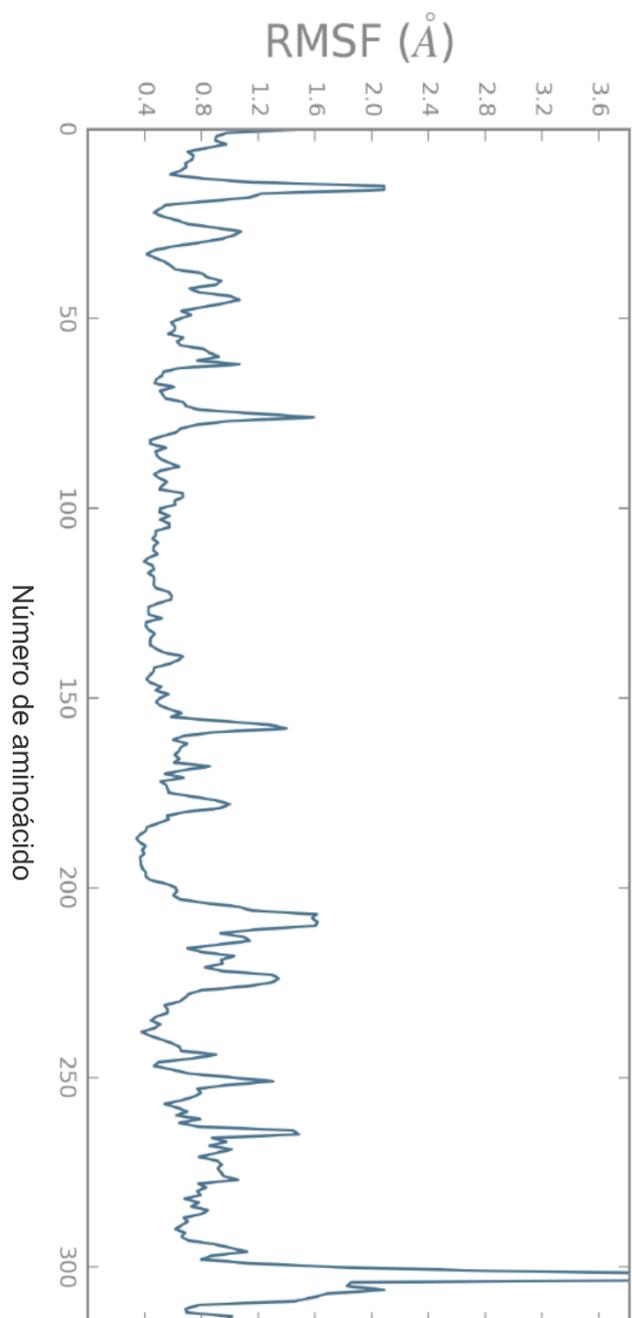


Gráfico A5. RMSF de AKT2 en la dinámica molecular

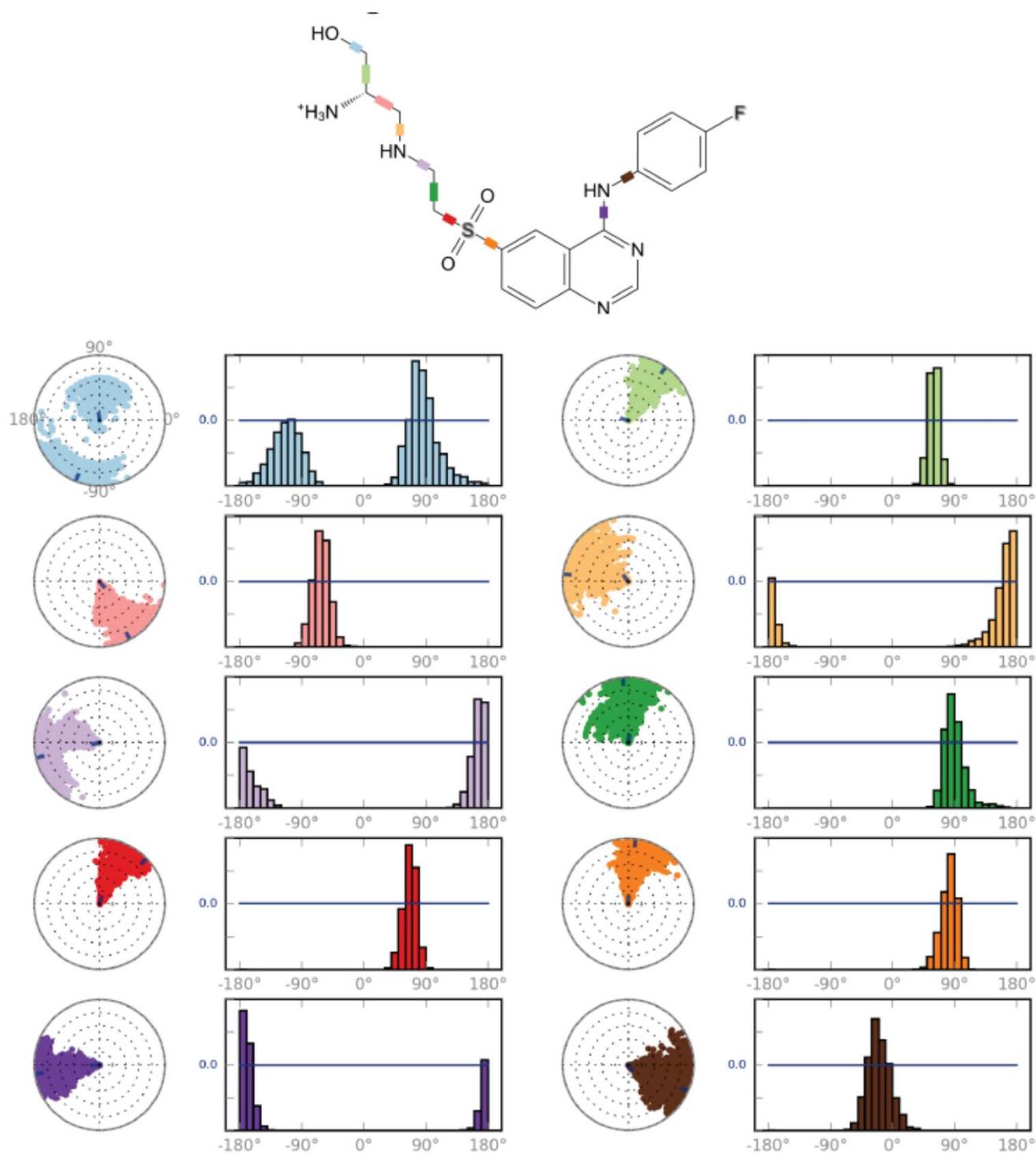


Gráfico A6. Ángulos de torsión de los enlaces rotables de AUMO-28 en la dinámica molecular de AKT2

A 5.3 CUMO-13 en PARP1

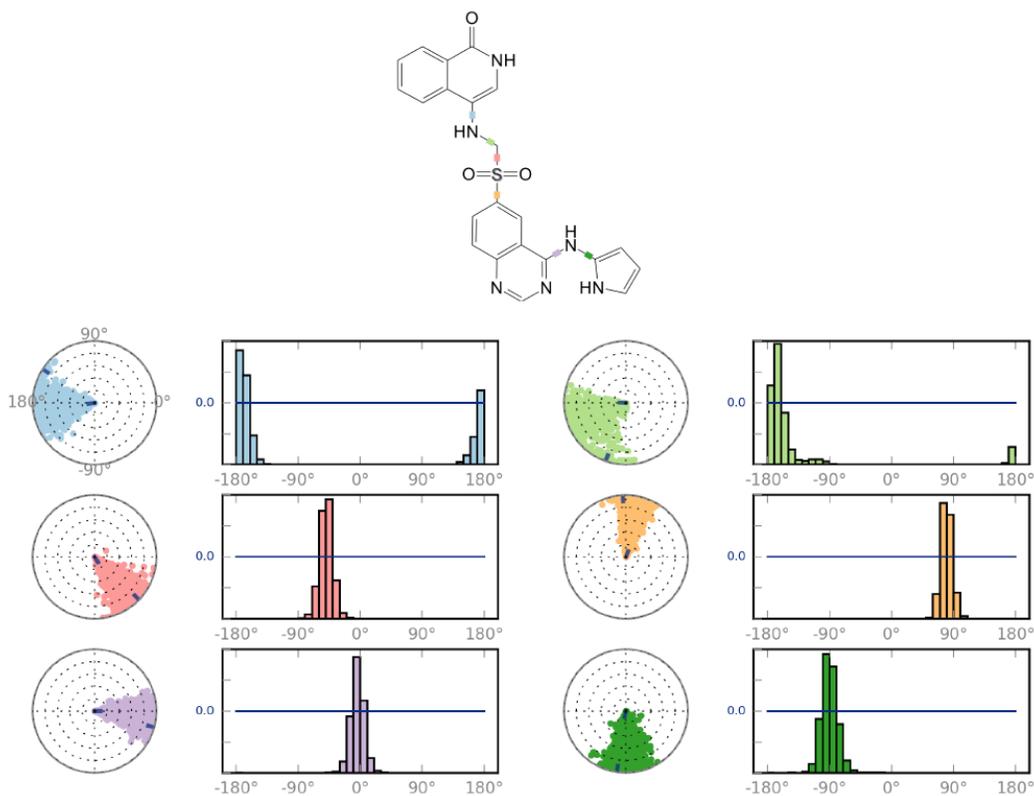


Gráfico A7. Ángulos de torsión de los enlaces rotables de CUMO-13 en la dinámica molecular de PARP1.

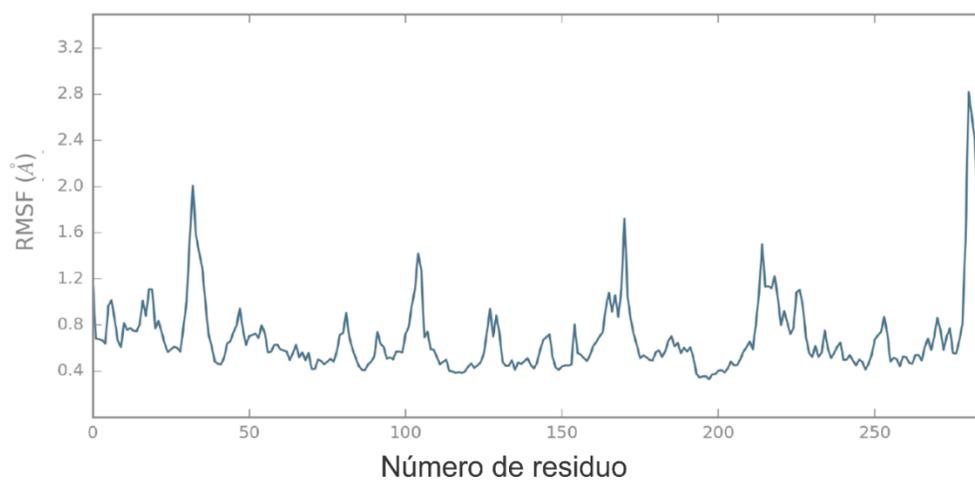


Gráfico A8. RMSF de PARP1 en la dinámica molecular.

A 5.4 CUMO-13 en EGFR

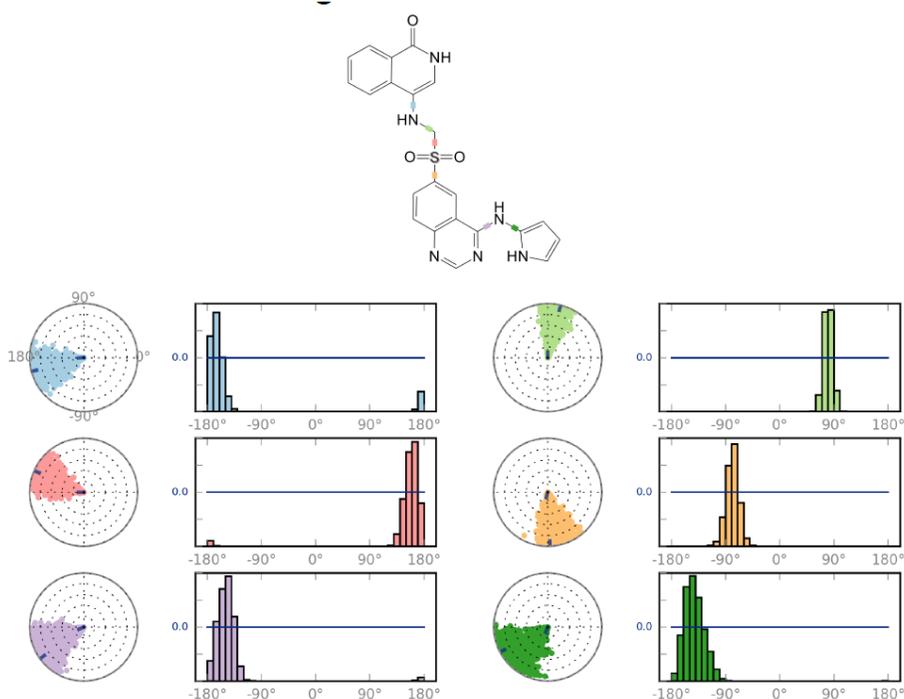


Gráfico A9. Ángulos de torsión de los enlaces rotables de CUMO-13 en la dinámica molecular de EGFR en los primeros 3ns.

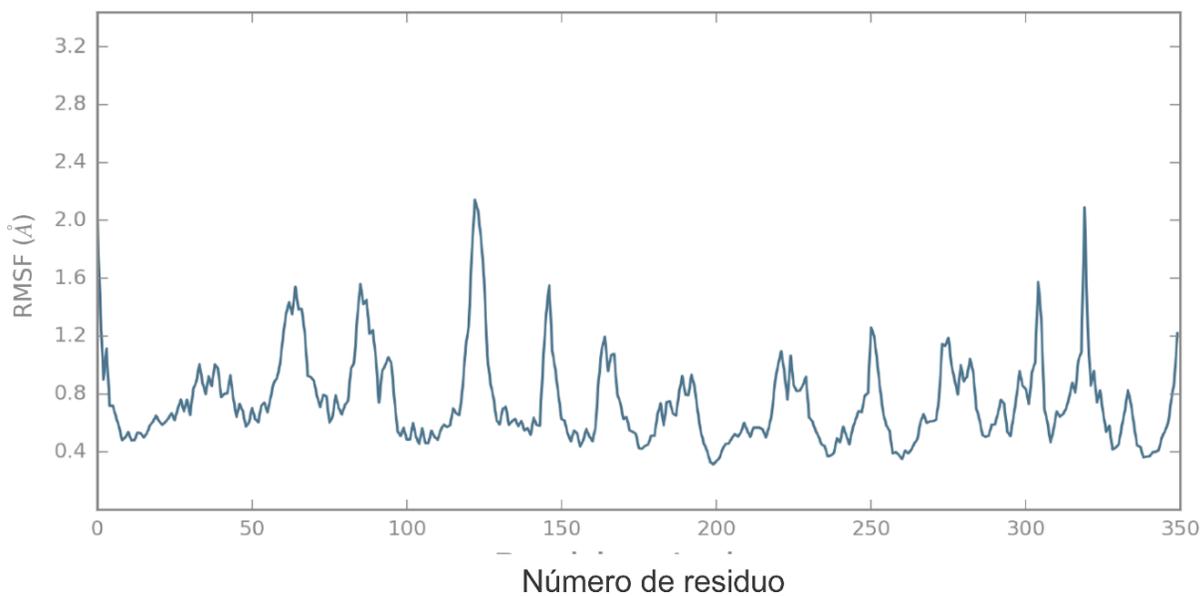


Gráfico A10. RMSF de EGFR en la dinámica molecular en los primeros 3 ns.

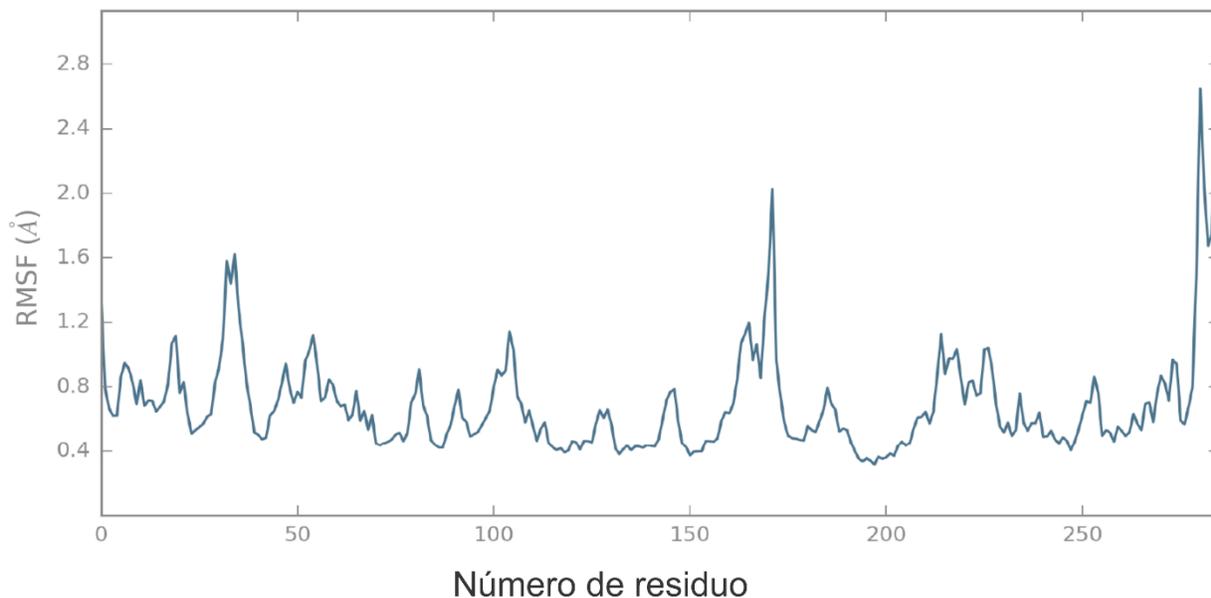


Gráfico A11. RMSF de EGFR en la dinámica molecular de 3 a 6 ns.

APÉNDICE VI. PROPIEDADES ADME Y PUNTAJES

A 6.1 SERIE CUMO

Tabla A2. Propiedades ADME y puntajes de acoplamiento en GlideXP en EGFR y PARP1 de la serie CUMO

Molécula	Puntaje		MM (g/mol)	logP	APH	DPH	TPSA (Å ²)	ER
	(kcal/mol)							
	EGFR	PARP1						
CUMO-1	----	-7.252	121.139	0.7469	2	1	43.09	1
CUMO-2	----	-7.751	147.176	1.2958	2	1	29.1	0
CUMO-3	----	-7.690	148.165	-0.7294	3	2	41.13	0
CUMO-4	----	-7.386	146.149	0.9409	3	1	41.46	0
CUMO-5	-6.483	-8.649	145.161	1.1399	2	1	29.1	0
AUMO-7	-7.660	-8.298	288.309	2.1738	5	2	66.91	2
CUMO-8	-9.084	-8.550	303.324	1.8479	6	3	92.93	2
CUMO-9	-8.398	-7.231	379.422	4.0556	6	3	78.94	4
CUMO-10	-9.315	-7.785	408.464	3.5083	7	4	90.97	6
CUMO-11	-9.315	-8.372	407.476	4.1951	6	3	78.94	6
CUMO-12	-8.255	-8.855	457.513	2.7687	8	3	121.46	6

A 6.1 SERIE AUMO

Tabla A3. Propiedades ADME y puntajes de acoplamiento molecular en GlideXP en EGFR y AKT2 de la serie AUMO

Molécula	Puntaje (kcal/mol)		MM (g/mol)	logP	APH	DPH	TPSA (Å ²)	ER
	EGFR	AKT2						
AUMO-2	-10.677	-6.435	665.741	3.4218	12	3	162.8	10
AUMO-3	-10.873	-8.514	715.748	4.1693	12	3	162.8	11
AUMO-4	-5.955	-6.280	726.647	4.0462	12	3	162.8	10
AUMO-5	-6.714	-7.386	682.196	3.927	12	3	162.8	10
AUMO-6	-6.566	-8.170	625.124	1.8166	11	5	163.56	7
AUMO-7	-7.196	-8.774	658.676	2.0589	11	5	163.56	8
AUMO-8	-6.840	-8.550	669.575	1.9358	11	5	163.56	7
AUMO-9	-6.731	-7.090	608.669	1.3114	11	5	163.56	7
AUMO-10	-8.592	-7.630	652.568	5.0673	10	3	142.13	7
AUMO-11	-6.582	-8.222	641.669	5.1904	10	3	142.13	8
AUMO-12	-7.030	-8.823	591.662	4.4429	10	3	142.13	7
AUMO-13	-8.711	-7.870	608.117	4.9481	10	3	142.13	7
AUMO-14	-9.103	-6.559	638.585	5.3645	9	3	132.9	10
AUMO-15	-7.742	-7.837	627.686	5.4876	9	3	132.9	11
AUMO-16	-9.635	-9.103	577.679	4.7401	9	3	132.9	10
AUMO-17	-8.873	-6.396	594.134	5.2453	9	3	132.9	10
AUMO-18	-6.511	-6.854	653.6	4.1433	10	4	158.92	10
AUMO-19	-6.936	-7.462	642.701	4.2664	10	4	158.92	11
AUMO-20	-7.528	-8.636	592.694	3.5189	10	4	158.92	10
AUMO-21	-7.559	-6.559	609.149	4.0241	10	4	158.92	10
AUMO-22	-8.820	-7.767	599.508	3.2211	10	5	167.71	10
AUMO-23	-6.517	-8.189	588.609	3.3442	10	5	167.71	11
AUMO-24	-9.466	-7.887	538.602	2.5967	10	5	167.71	10
AUMO-25	-9.577	-7.462	555.057	3.1019	10	5	167.71	10

APÉNDICE VI

AUMO-26	-9.310	-6.337	480.386	1.0607	8	4	138.61	9
AUMO-27	-9.748	-6.626	469.487	1.1838	8	4	138.61	10
AUMO-29	-9.424	-6.599	435.935	0.9415	8	4	138.61	9
AUMO-30	-9.446	-6.818	509.428	1.4527	9	5	150.64	9
AUMO-31	-8.169	-7.157	483.514	1.5431	8	4	138.61	10
AUMO-32	-8.883	-8.960	433.507	0.7956	8	4	138.61	9
AUMO-33	-9.119	-5.727	449.962	1.3008	8	4	138.61	9
