



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Química**

**Nueva generación de quinazolinas como  
posibles inhibidores de EGFR para su uso como  
agentes antitumorales**

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

**PRESENTA**  
**Diego Ignacio Figueroa Figueroa**



**MÉXICO, CDMX**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:	Martha Yolanda González Quezada
VOCAL:	Francisco Hernández Luis
SECRETARIO:	José Luis Medina Franco
1er. SUPLENTE:	María Eugenia Mendoza Jasso
2do. 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

Diego Ignacio Figueroa Figueroa

---

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las oportunidades, los espacios, los programas pero, sobre todo, por todas aquellas increíbles personas que me permitió conocer.

A la Facultad de Química por brindarme todos los conocimientos, los apoyos y los recursos necesarios para desarrollarme profesional y científicamente.

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 la "Conclusión de estudios" proyecto número IN218117.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada "CONACyT-SEP" proyecto número CB-220664.

## Abreviaturas y Acrónimos

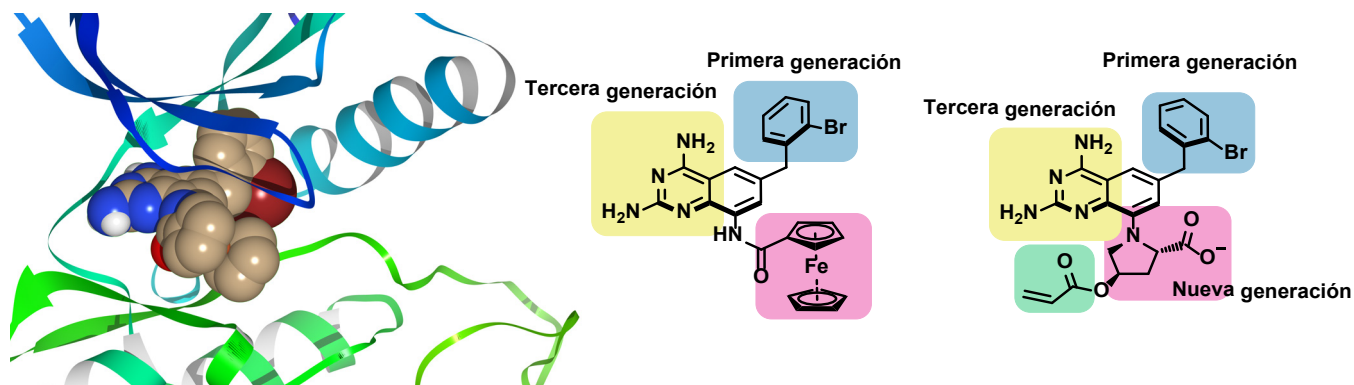
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcr-Abl	El gen ABL del cromosoma 9 se une al gen BCR
myc	Oncogén de células infectadas por el virus de transformación aguda MC29
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR/ERBB1	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FDA	Administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos de América
FGFR	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
HER2/ERBB2	Proteína que participa en el desarrollo normal de las células.
H-ras	Enzima codificada por el gen HRAS
INSR	Receptor de insulina
KEAP1	Gen que codifica para la proteína Keap-1
K-ras	Enzima codificada por el gen KRAS
L858N	Mutación de EGFR
LUAD	Adenocarcinoma de pulmón
LUSC	Carcinoma de pulmón de células escamosas
MAPK	Protein cinasas activadas por mitógeno
NF1	Gen que codifica para la neurofibromina
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
PDB	Protein Data Bank
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLC $\gamma$	Fosfolipasa C gamma
Ras/Raf/Mek	Vía de señalización de MAPK cinasas
Rg	Radio de giro
RMSD	Desviación media cuadrática
RTK	Receptores acoplados a tirosin cinasas
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
STK11	Gen que codifica para la enzima serin/treonin cinasa 11
T790M	Mutación de EGFR
TKD	Dominio tirosin cinasa
TKI	Inhibidores de tirosin cinasas
TP53	Gen que codifica para la proteína p53
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento de epitelio vascular
Wnt-1	Enzima codificada por el gen WNT1
WT	Proteína silvestre

## **Contenido**

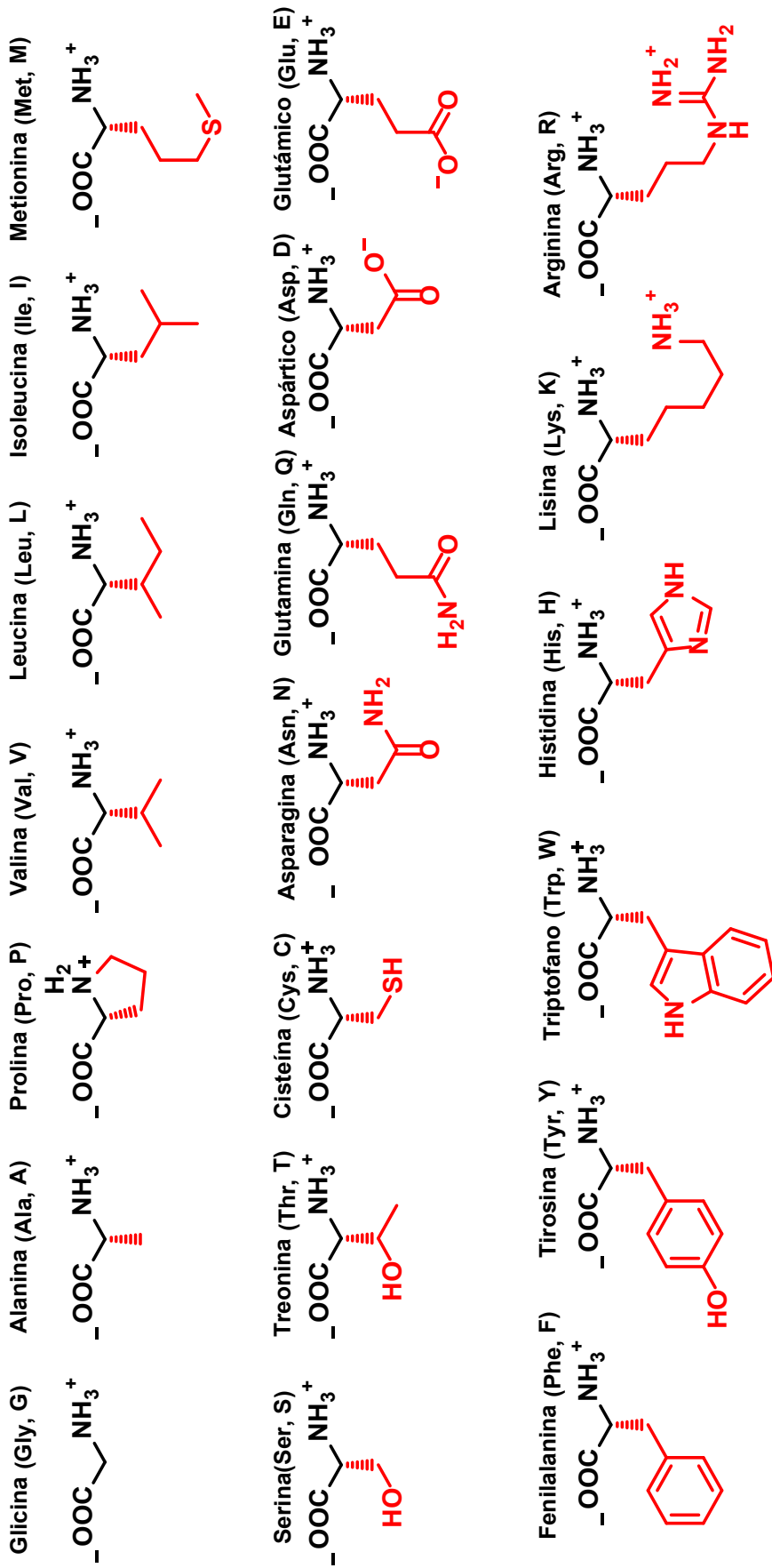
<b>1.RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>2.ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
<b>2.1.CÁNCER</b>	<b>10</b>
2.1.1.CARCINOGENESIS	11
2.1.2.CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER	13
2.1.3.ADICCIÓN ONCOGÉNICA	14
2.1.4.CÁNCER DE PULMÓN	15
<b>2.2.TERAPIA ANTITUMORAL</b>	<b>17</b>
2.2.1.QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL	18
2.2.1.1.INHIBIDORES DE TIROSIN CINASAS	19
2.2.1.2.INHIBIDORES DE EGFR	21
2.2.1.2.1.PRIMERA GENERACIÓN: INHIBIDORES REVERSIBLES	21
2.2.1.2.2.SEGUNDA GENERACIÓN: INHIBIDORES IRREVERSIBLES	22
2.2.1.2.3.TERCERA GENERACIÓN: ADIÓS QUINAZOLINA	24
2.2.1.2.4.NUEVAS ESTRATEGIAS: MÁS DE LO MISMO PERO CON IMAGINACIÓN	24
<b>2.3.QUÍMICA FARMACÉUTICA: EL DISEÑO DE FÁRMACOS Y MOLÉCULAS BIOACTIVAS</b>	<b>25</b>
2.3.1.MIMETIZACIÓN DE MOLÉCULAS ENDÓGENAS: CINASAS Y ATP	26
2.3.2.QUÍMICA FARMACÉUTICA INORGÁNICA	28
<b>2.4.RECEPTORES ACOLADOS A TIROSIN CINASAS</b>	<b>30</b>
2.4.1.FAMILIA ERBB	31
2.4.1.1.EGFR	32
2.4.1.1.1.ESTRUCTURA	32
2.4.1.1.2.FUNCIÓN	35
2.4.1.1.2.1REACCIÓN DE FOSFORILACIÓN EN TKD	35
2.4.1.1.2.2VÍA DE SEÑALIZACIÓN	35
2.4.1.1.3.MUTACIONES Y RESISTENCIA A FÁRMACOS	36
<b>3.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>37</b>
<b>4.HIPÓTESIS</b>	<b>37</b>
<b>5.OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>5.1.OBJETIVO GENERAL</b>	<b>38</b>

<b>5.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>38</b>
<b>6.METODOLOGÍA</b>	<b>39</b>
<b>6.1.ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS</b>	<b>39</b>
<b>6.2.ACOPLAMIENTO MOLECULAR</b>	<b>39</b>
6.2.1.PREPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	40
6.2.2.ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN AUTODOCK Y AUTODOCK VINA	40
6.2.3.PREPARACIÓN DE LOS LIGANDOS	41
<b>6.3.DINÁMICA MOLECULAR</b>	<b>41</b>
<b>7.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>7.1.ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS</b>	<b>42</b>
<b>7.2.ACOLAMIENTO MOLECULAR</b>	<b>44</b>
<b>7.3.ESTUDIOS DE DINÁMICA MOLECULAR</b>	<b>58</b>
<b>8.CONCLUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>9.PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>

## Resumen gráfico



## LISTA DE AMINOÁCIDOS





## 1. RESUMEN

Sin duda, el cáncer es un problema de salud que afecta a las personas en todos los sentidos, desde el estado físico y mental, hasta el social y familiar. Por ello, se han realizado esfuerzos en todas las áreas de la ciencia a lo largo del mundo, para ofrecer una mejor calidad de vida a las personas que padecen algún tipo de cáncer.

En este trabajo, se exploró la historia de los inhibidores de EGFR y, con ello, se recuperó cada pieza de ese rompecabezas para la creación de nuevas moléculas y nuevas estrategias para inhibir el TKD del receptor. Gracias a estudios bioinformáticos, se encontró que algunos ligandos se unen a ambas conformaciones sin importar la mutación del residuo guardián del sitio activo EGFR<sup>T790M</sup>. Estudios de acoplamiento molecular con inhibidores conocidos complementaron esta información destacando que, todos los ligandos se unen a la conformación inactiva pero no todos se unen a la conformación activa.

A través de estudios de acoplamiento molecular, se halló que la mayoría de los compuestos de la serie 1, previamente sintetizados por este grupo de investigación, adquieren el modo de unión predicho en la conformación inactiva. Se utilizó como modelo el compuesto **1c** que tuvo el mismo modo de unión en EGFR<sup>WT</sup> y EGFR<sup>T790M</sup> al igual que la mejor energía de unión promedio en todos los sistemas. Se le realizaron tres modificaciones para mantener características de la primera generación. Con ello, se consiguió una molécula (**QN1**) que mantiene el farmacóforo de ATP y el farmacóforo de la primera generación de inhibidores. Posteriormente, y de igual forma, pensando en moléculas previamente sintetizadas, se llegó a la molécula **QN2** con la cual, se plantea un nuevo mecanismo de inhibición de EGFR a través de radicales libres y reacciones redox.

Finalmente, como propuesta de otro mecanismo de inhibición, se diseñó la molécula **QN3**; esta molécula muestra que el diseño de las moléculas fue adecuado ya que, en los estudios de dinámica molecular, al tiempo de simulación, logra estabilizar mejor el receptor que otros ligandos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. CÁNCER

Cuando nos referimos al cáncer, es muy importante distinguir que se trata de un término común para un conjunto de aproximadamente doscientas enfermedades[1] que pueden afectar casi a todos los órganos (algunos de ellos representados en la **Figura 1**) y tejidos del cuerpo humano y de otros animales. El término científico o médico para el cáncer es neoplasia maligna, que se define como un crecimiento relativamente autónomo de tejido que no está sujeto a las reglas y regulaciones de las células en crecimiento normales. Todos los tipos de cáncer poseen ciertas características en común, dos de las más destacadas son el descontrol de la proliferación celular y su diseminación hacia otros tejidos u órganos (metástasis). El cáncer se puede distinguir por sus bases genéticas, etiológicas, patrones de progresión y desenlace clínico, de ahí, parten los diagnósticos y los tratamientos para cada uno de los distintos tumores malignos.

Para una mejor comprensión de este trabajo de investigación, la **Tabla 1** engloba algunas definiciones importantes.



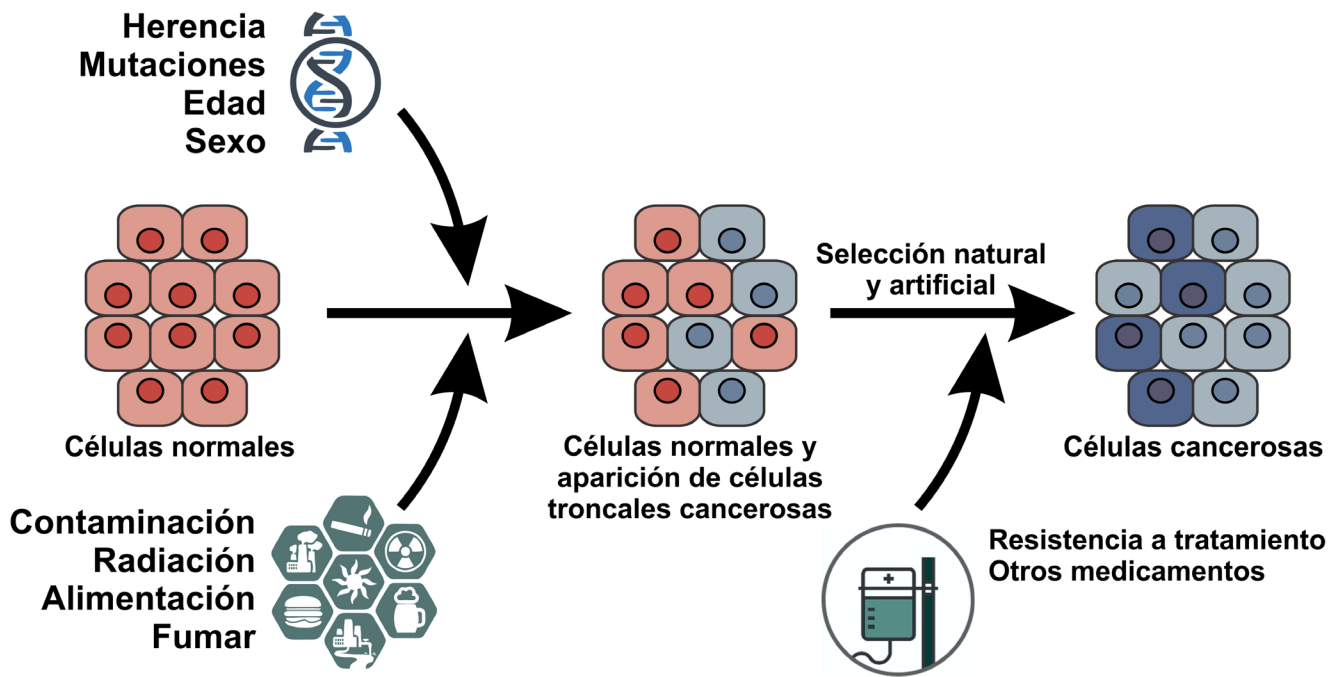
**Figura 1.** Cáncer como un término común para un grupo de enfermedades que comparten algunas características y que pueden afectar a distintos órganos o tejidos.

**Tabla 1. Conceptos generales relacionados con cáncer.**

<b>Concepto</b>	<b>Definición</b>
Aplasia	Carencia total o parcial de un órgano.
Condiciones precancerosas	
Hiperplasia	Excesiva multiplicación de células normales en un órgano o en un tejido.
Anaplasia	Regresión de las células a un estado menos diferenciado.
Metaplasia	Cambio en la forma que toman algunas células que, por lo general, no es normal en las células del tejido al que pertenecen.
Displasia	Anomalía en el desarrollo de un órgano.
Carcinoma in situ	Es el tipo más severo de cambio precanceroso. Las células son muy anormales pero no han crecido en tejido cercano. El carcinoma in situ generalmente se trata porque tiene un alto riesgo de convertirse en cáncer.
Neoplasia benigna	Tumores que carecen de la capacidad de invadir otros tejidos. Estos permanecen en un lugar y no se propagan a otras partes del cuerpo. Por lo general, no regresan después de que son extraídos. Tienden a tener una forma regular y lisa y con una cubierta llamada cápsula. Se pueden remover fácilmente del tejido
Neoplasia maligna o tumor maligno	Masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede y está descoordinado con el de los tejidos normales, y que persiste en su anormalidad después de que haya cesado el estímulo que provocó el cambio

### **2.1.1. CARCINOGENESIS**

Las causas de cáncer son muy variadas, de hecho, se considera una enfermedad multifactorial debido a que las combinaciones de diversos agentes promueven su formación. En la actualidad se concibe que el cáncer es el resultado de la acumulación gradual de mutaciones genéticas que aumentan sucesivamente la proliferación celular. Estas mutaciones pueden ser generadas por factores ambientales o exter-



**Figura 2.** La carcinogénesis como un proceso multifactorial, donde los componentes genéticos y el medio ambiente influyen en la adquisición de características que desencadenan la proliferación incontrolada de las células del cuerpo.

nos, o bien, por factores relacionados con la genética y la bioquímica de las células del huésped, también llamados factores internos.

La carcinogénesis es un proceso de varias etapas cuyos pasos reflejan alteraciones genéticas que incluyen cambios a pequeña escala en las secuencias de ADN, como mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas a mayor escala, translocaciones, deleciones y amplificaciones; y cambios que afectan a la estructura de la cromatina y están asociados con un control epigenético disfuncional, como la metilación aberrante del ADN o la acetilación de las histonas.[2] Cualquiera de estas alteraciones genéticas confiere uno u otro tipo de ventaja en el crecimiento que impulsa la transformación progresiva de células normales en células cancerosas altamente malignas.

Aproximadamente del 5 al 10% de las muertes por cáncer son por factores hereditarios mientras el 80% de todas las muertes por cáncer humano están relacionadas con factores externos que pueden controlarse o prevenirse.[3-5]

## 2.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

Hanahan y Weinberg reportaron seis sellos distintivos o capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de tumores humanos en múltiples etapas: mantener la señalización proliferativa, evitar los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis.[6]

El progreso conceptual posterior agregó nuevos sellos a esta lista: evadir la destrucción inmune, desregular la energía celular (reprogramación del metabolismo energético), inestabilidad genómica y mutación, y la inflamación provocada por el tumor.[7]



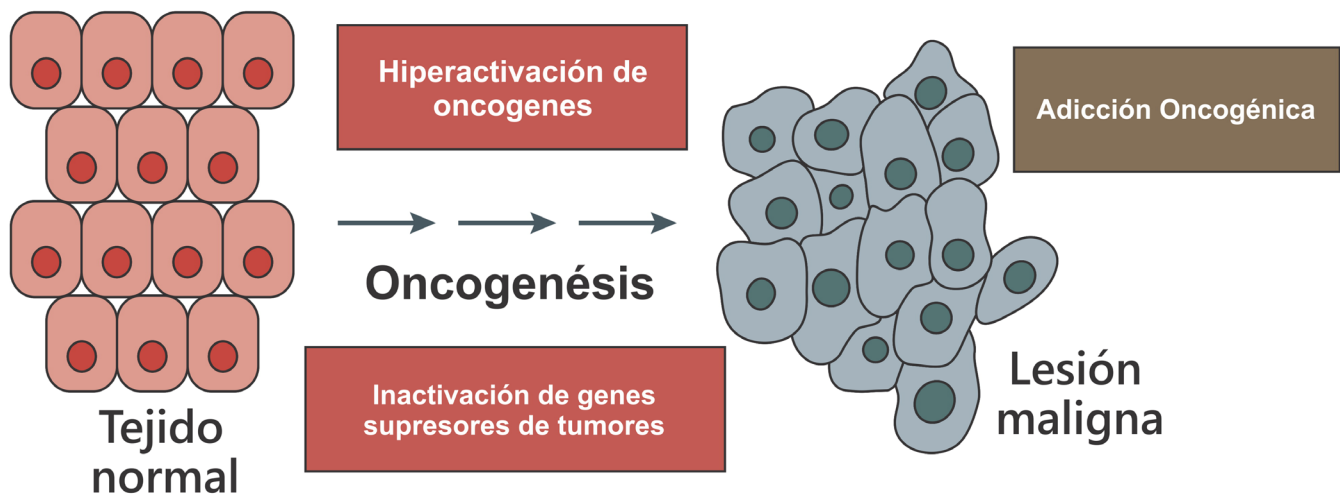
**Figura 3.** Características del cáncer descritos por Hanahan y Weinberg (2011).

(Adaptada al español)

### 2.1.3. ADICCIÓN ONCOGÉNICA

En este proyecto se aprovechará una de las características que se ha visto en ciertos tipos de cáncer, como es la adicción oncogénica. El término "adicción al oncogénica" fue acuñado por primera vez por Bernard Weinstein; [8] postula que, a pesar de la diversidad de lesiones genéticas típicas del cáncer, algunos tumores dependen de un único oncogén dominante para su crecimiento y supervivencia, por lo que la inhibición de este oncogén específico es suficiente para detener el fenotipo neoplásico. El término ha sido reforzado por varios hallazgos reportados en tumores de modelos animales en los que tumores inducidos por oncogenes, ya sea generados como xenoinjertos o mediante el uso de modelos modificados por ingeniería genética, se han encontrado que experimentan regresión, asociada con paro proliferativo, apoptosis, y/o diferenciación después de la inhibición aguda de la función oncoproteica.

Numerosos estudios que utilizan líneas celulares de cáncer humano indican que, aunque estas células son aneuploides y portan varios genes y anomalías epigenéticas, también pueden ser altamente dependientes de la actividad de un único



**Figura 4.** Adicción Oncogénica. La oncogénesis se produce generalmente mediante la adquisición progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que, en conjunto, influyen en diversos procesos celulares, incluidas las vías metabólicas. Estas alteraciones, que generalmente implican la inactivación de los genes oncosupresores o la hiperactivación de los oncogenes, no sólo permiten la transformación maligna, sino que también contribuyen a la supervivencia de los tumores establecidos.

(Adaptada al español)

oncogén para la continua proliferación celular y supervivencia. La **Tabla 2.** describe algunos blancos terapéuticos y la evidencia clínica que se tiene acerca de la dependencia a ciertos oncogenes.

**Tabla 2. Adicción oncogénica: estudios en enzimas de ratones y de líneas celulares de cáncer humano.**

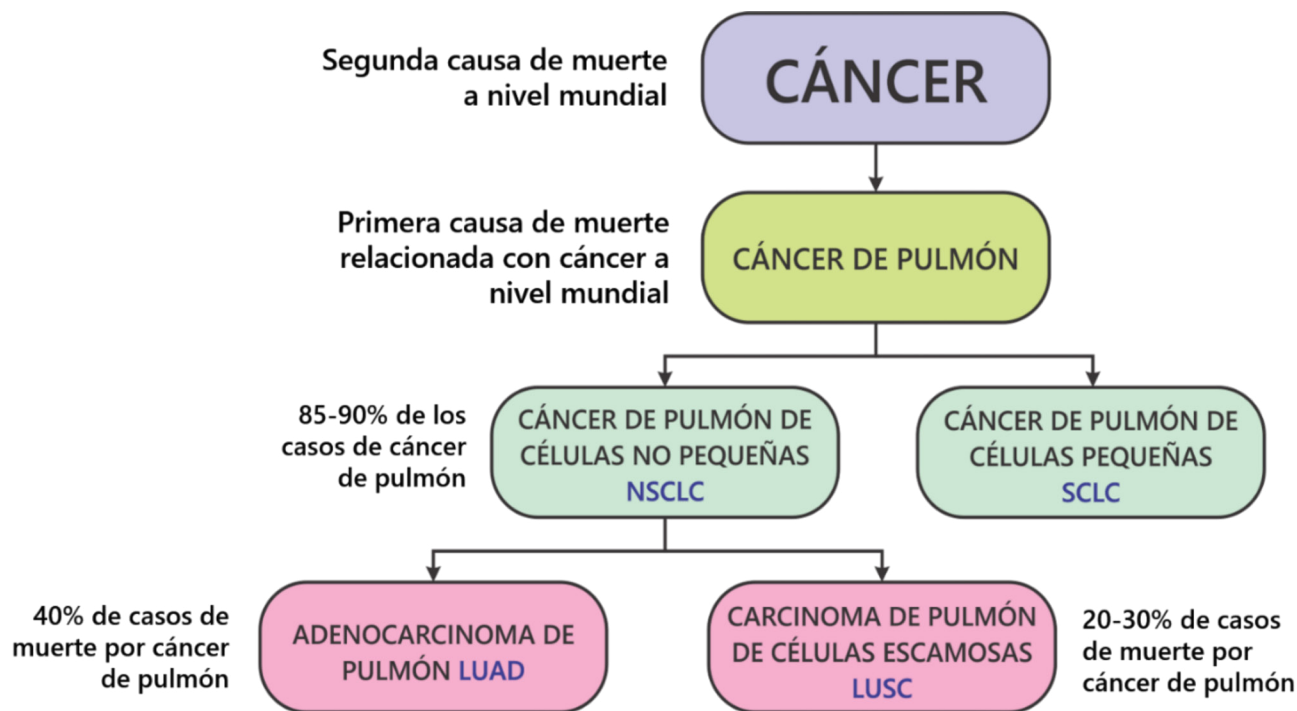
Oncogenes diana	Tipo de cáncer
c-myc	Leucemia de células T y mieloide aguda
Bcr-Abl	Leucemia
H-ras	Melanoma
K-ras	Pulmón
c-myc	Células $\beta$ pancreáticas
c-myc	Sarcoma Osteogénico
Her-2/neu	Mama
c-myc	Mama
Wnt-1	Mama
EGFR	Pulmón

Muchos oncogenes y genes supresores de tumores codifican para cinasas o proteínas que actúan en vías río arriba de estas. Por lo tanto, es razonable esperar que los inhibidores específicos de las cinasas puedan resultar valiosos en el tratamiento del cáncer, como es propósito de este trabajo.

#### 2.1.4. CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es la causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo, con un estimado de 1.6 millones de muertes cada año.[9] Aproximadamente el 85% de pacientes tienen un grupo de subtipos histológicos conocidos colectivamente como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), de los cuales adenocarcinoma de pulmón (LUAD) y carcinoma de pulmón de células escamosas (LUSC) son los subtipos más comunes.[10] El otro 15% de los pacientes presenta otro tipo histológico denominado cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).

La etiología más común del cáncer de pulmón es el tabaquismo, que representa



**Figura 5.** Tipos, subtipos y estadísticas sobre el cáncer de pulmón a nivel mundial

más del 80% de los casos en los Estados Unidos y otros países donde el tabaquismo es común.[11] Aunque todos los subtipos histológicos principales del NSCLC, como así como el SCLC, se relacionan con el tabaquismo, la asociación es más fuerte con LUSC y SCLC que con LUAD, con este último siendo la histología más común en los no fumadores.[12] Cáncer de pulmón en no fumadores es más común en las mujeres y en el este de Asia, y está asociada con exposición al medio ambiente, incluyendo el tabaquismo pasivo, la contaminación y los carcinógenos ocupacionales, y con genética hereditaria o predisposición.

Al igual que la mayoría de las neoplasias malignas, el cáncer de pulmón está compuesto por subpoblaciones de células, o clonas, con características moleculares distintas, lo que resulta en algo llamado "heterogeneidad intratumoral". Una fracción de mutación subclonal mayor puede asociarse con una mayor probabilidad de recaída posquirúrgica en pacientes con LUAD localizada, lo que implica que existe una mayor propensión a la metástasis durante el desarrollo del tumor en aquellos tumores con mayor heterogeneidad intratumoral.[13] Aquí, el problema que podemos observar no es la cantidad de subpoblaciones tumorales, sino la selección artificial por células cada vez más malignas a través de la terapia con fármacos sensibles a



algunas resistencias, tal como se ilustra en la **Figura 2**.

Los genes con una tasa de mutación mayor en LUAD incluyen: KRAS y EGFR; de hecho, la sobreexpresión de EGFR, representa aproximadamente el 10% de los casos de LUAD en los países occidentales y 50% en los países orientales.[14] El resto se genera a través de mutaciones en los genes supresores tumorales TP53, KEAP1, STK11 y NF1. La frecuencia de mutaciones activadoras del EGFR varía enormemente según la región y el origen étnico.

## 2.2. TERAPIA ANTITUMORAL

Existen muchos tipos de tratamiento para el cáncer. Los tipos de tratamiento que una persona reciba dependerán del tipo de cáncer que tenga y de qué tan avanzado esté. Actualmente existen cuatro diferentes tipos de terapias antitumorales.[15] La **Figura 6** describe las cuatro terapias y las generalidades de cada una.

Algunas personas con cáncer reciben solo un tratamiento. Pero la mayoría de las personas tienen una combinación de tratamientos, como cirugía con quimioterapia y/o radioterapia. Aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer no se curan con quimioterapia sistémica y logran obtener una supervivencia prolongada.

Este proyecto está basado en la quimioterapia antitumoral, por lo que se omiten detalles acerca de los otros tipos de terapia.



### CIRUJÍA

Cuando se usa para tratar el cáncer, la cirugía es un procedimiento en el cual, un cirujano remueve el tumor del cuerpo



### QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia es un tipo de tratamiento para el cáncer que utiliza medicamentos para destruir las células cancerosas



### RADIOTERAPIA

La radioterapia es un tipo de tratamiento para el cáncer que utiliza altas dosis de radiación para eliminar las células cancerosas y reducir los tumores



### INMUNOTERAPIA

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento que ayuda al sistema inmunológico a detectar y combatir el cáncer

**Figura 6.** Breve descripción de los cuatro tipos de terapia antitumoral

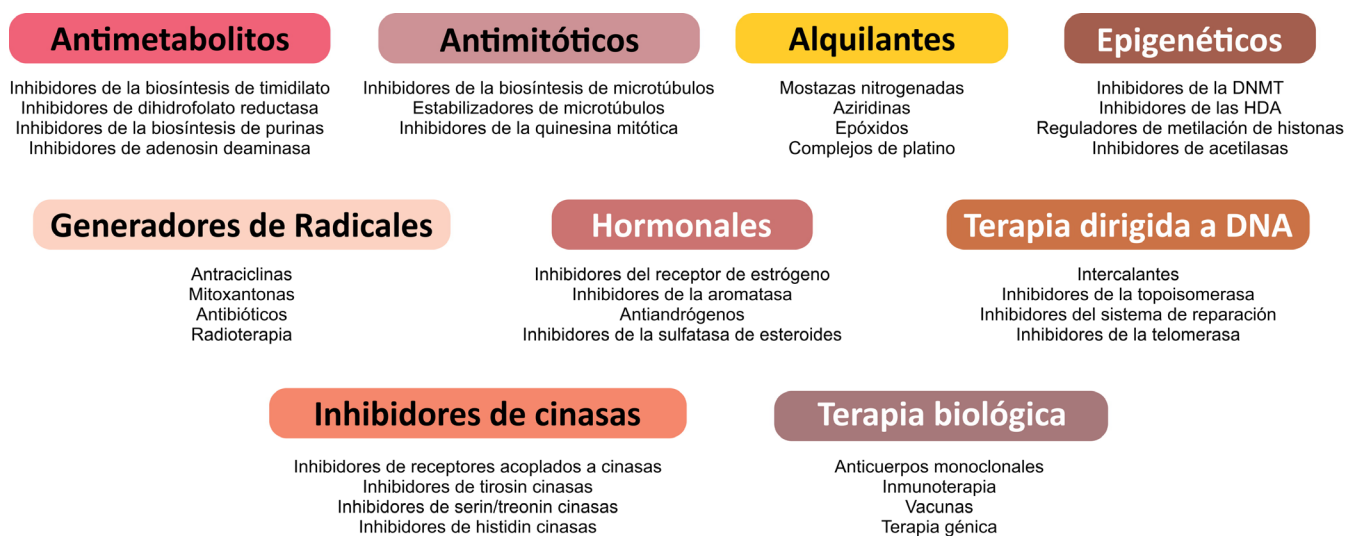
## 2.2.1. QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL

La quimioterapia funciona deteniendo o retrasando el crecimiento de las células cancerosas, que crecen y se dividen rápidamente. La quimioterapia se utiliza para: 1) Tratar el cáncer y 2) Aliviar los síntomas del cáncer.

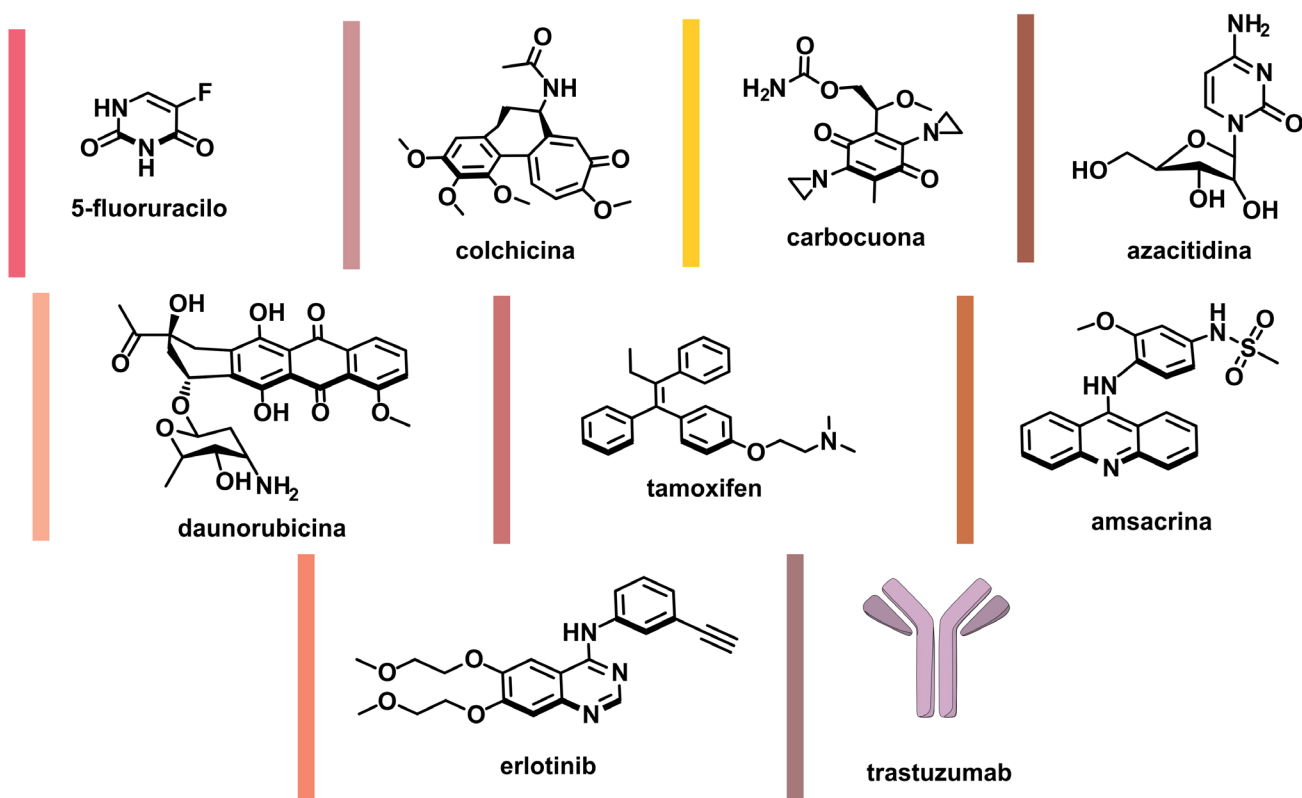
Uno de los problemas más graves de la quimioterapia es que no sólo mata las células cancerosas, sino que también mata o retrasa el crecimiento de las células sanas que tienen una tasa de crecimiento rápido. Algunos ejemplos son las células del epitelio bucal, intestinal y las células de la matriz del folículo piloso. El daño a las células sanas puede causar efectos secundarios, como llagas en la boca, náuseas y alopecia. Los efectos secundarios a menudo mejoran o desaparecen después de haber terminado la quimioterapia.

Existen diversas formas de clasificar en general a todos los fármacos y, en efecto, los fármacos antitumorales se pueden clasificar de acuerdo con su mecanismo de acción como se describen en la **Figura 7**.

Muchos quimioterapéuticos para el cáncer, actualmente en uso clínico, tratan de controlar el crecimiento anormal de las células de tumores malignos mediante la inhibición de algunos de los mecanismos involucrados en la división celular. Por consiguiente, los compuestos antitumorales desarrollados a través de este enfoque son citostáticos. Ahora bien, cuando lo que se busca es inhibir o eliminar vías que



**Figura 7.** Clasificación de los fármacos antitumorales de acuerdo con su mecanismo de acción



**Figura 8.** Ejemplo de fármacos ocupados actualmente como terapia antitumoral. Los códigos de colores van asociados a la clasificación mostrada en la Figura 7

son importantes tanto para el crecimiento normal de las células, como para su proliferación descontrolada, estamos hablando de fármacos citotóxicos para todas las células en división, incluidas las células normales; por esta razón estos fármacos no son específicos. Sin embargo, el avance en el conocimiento de la biología tumoral durante las últimas décadas, ha allanado el camino para medicamentos específicos contra el cáncer.[16]

En la **Figura 8** se ilustran la estructura 2D de algunos de los fármacos ocupados en la actualidad para el tratamiento de cáncer.

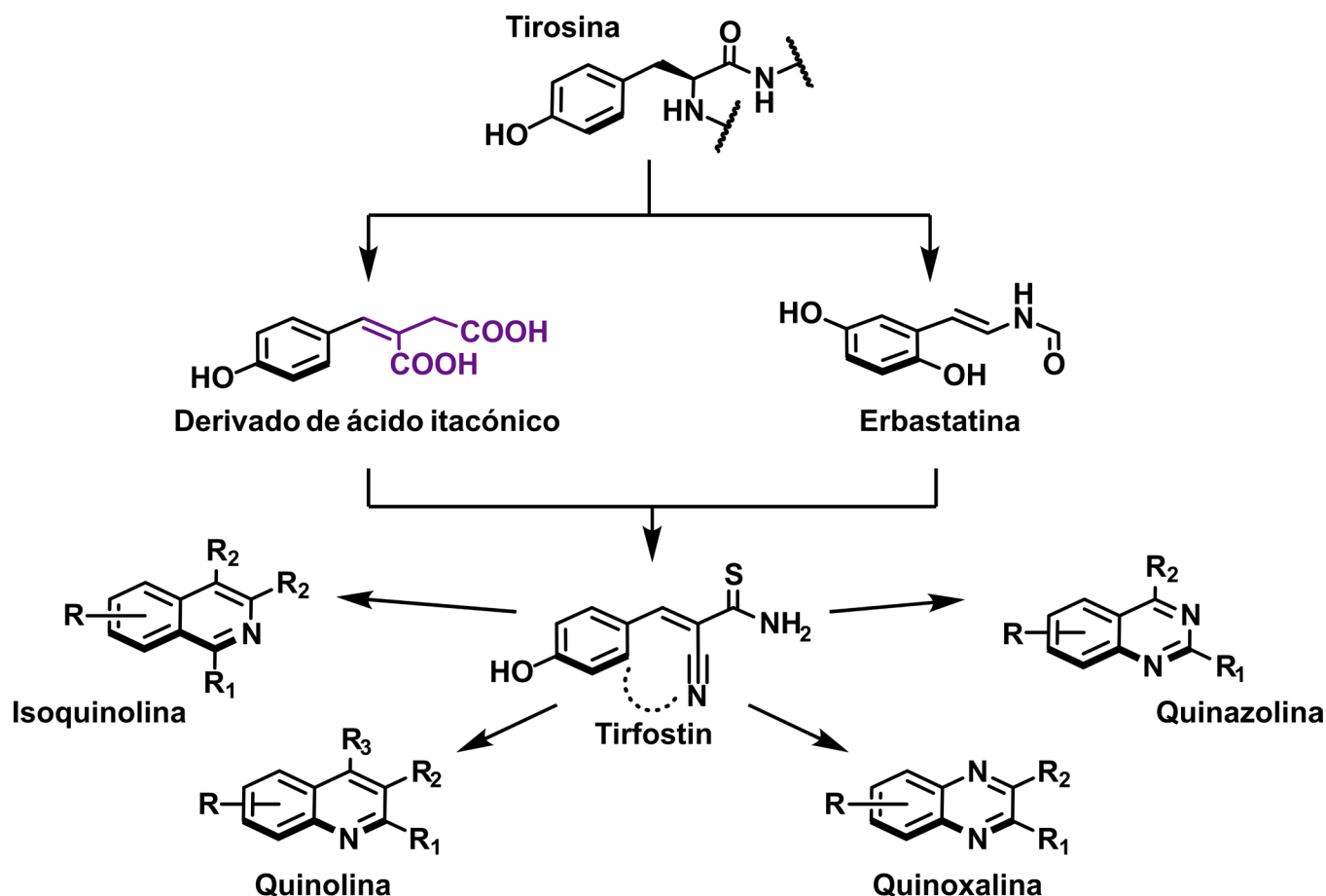
### 2.2.1.1. INHIBIDORES DE TIROSIN CINASAS

El desarrollo de inhibidores específicos de tirosin cinasas (TKI) comenzó con la síntesis de compuestos de hidroxifenil como imitación de la tirosina. Algunos de ellos eran derivados del ácido itacónico, un compuesto que inhibía al receptor de insulina sin efecto sobre las Ser/Thr cinasas. Otra fuente de inspiración fue el producto natu-

ral erbstatina, un inhibidor de EGFR y otras cinasas. El primer potente inhibidor que surgió de este trabajo fue el tirfostin (AG-213).

Estrategias de restricción conformacional por un heterociclo en este compuesto condujo finalmente a la identificación del sistema quinoxalina, quinazolina, quinolina e isoquinolina como un conjunto de sustancias muy útiles para la salud humana; bien llamados "estructuras privilegiadas", útiles en el diseño de los inhibidores de tirosin cinasas. Curiosamente, actúan como ATP miméticos más que como análogos de sustratos tipo tirosina, lo cual, podría considerarse serendipia ya que, el diseño no fue adecuado, pero se obtuvieron muy buenos resultados.

Inicialmente, los inhibidores de tirosin cinasas (TKI) fueron desarrollados como terapias dirigidas que sólo interferirían con la activación aberrante de tirosin cinasas en las células malignas. Sin embargo, varios TKIs, como el gefitinib, erlotinib, lapatinib, sorafenib y dasatinib, también exhiben efectos "fuera del objetivo" que no están **Figura 9.** Fármacos y scaffolds representativos de inhibidores de tirosin cinasas (Adaptado al español) [84]

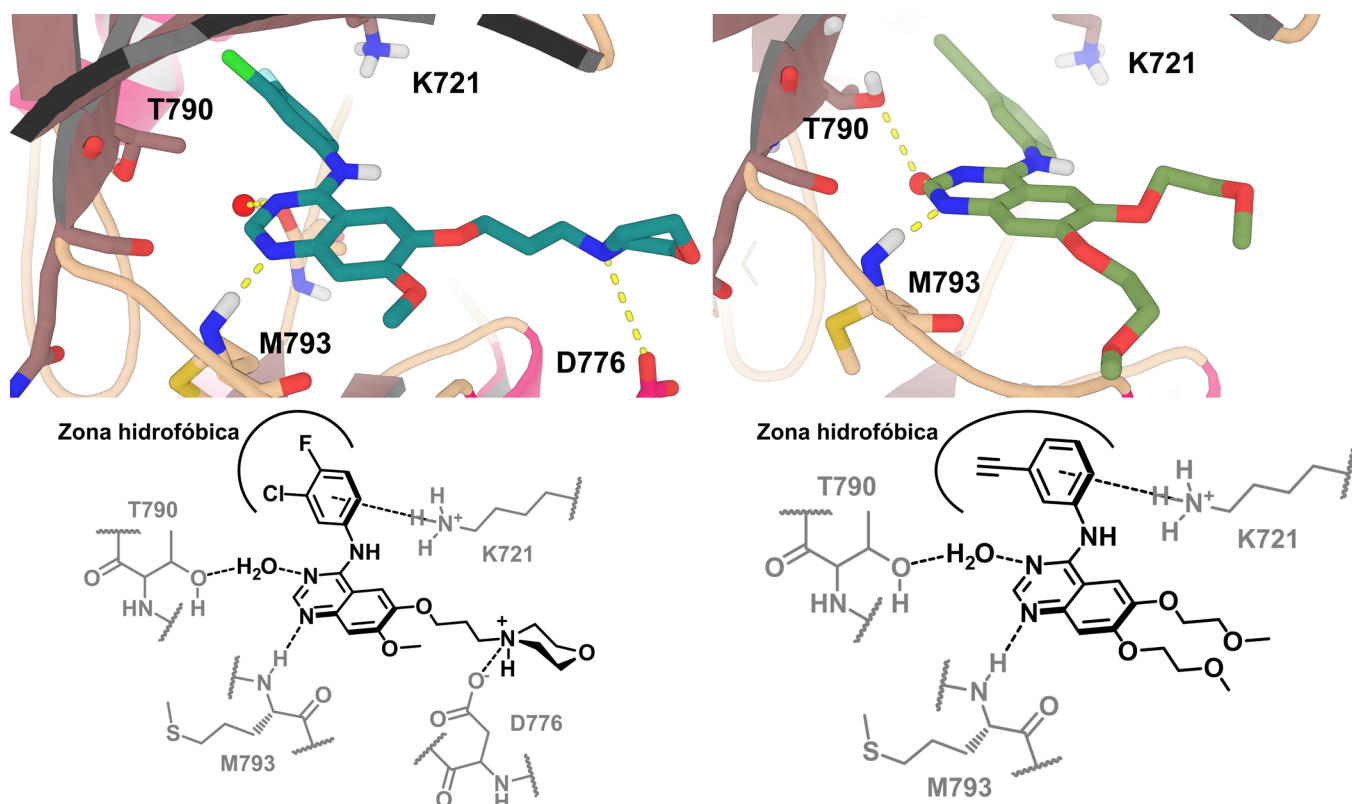


mediados por los mecanismos de acción propuestos.

## 2.2.1.2. INHIBIDORES DE EGFR

### 2.2.1.2.1. PRIMERA GENERACIÓN: INHIBIDORES REVERSIBLES

Durante los estudios realizados por algunos grupos de investigación, destinados a caracterizar el dominio catalítico de EGFR (EGFR-TKD) utilizando técnicas de cribado de alto rendimiento (high throughput screening), se descubrió que los derivados de *N*-fenilquinazolin-4-amina eran inhibidores prometedores.[17] Entre los derivados de este núcleo, el primer fármaco antitumoral que actuaba como agente anti-EGFR fue el gefitinib (ZO-1839, Iressa™), desarrollado por AstraZeneca™ a mediados de los años noventa. En 2003, fue el primer compuesto “no citotóxico” aprobado para uso clínico como monoterapia para el tratamiento de pacientes con NSCLC local-



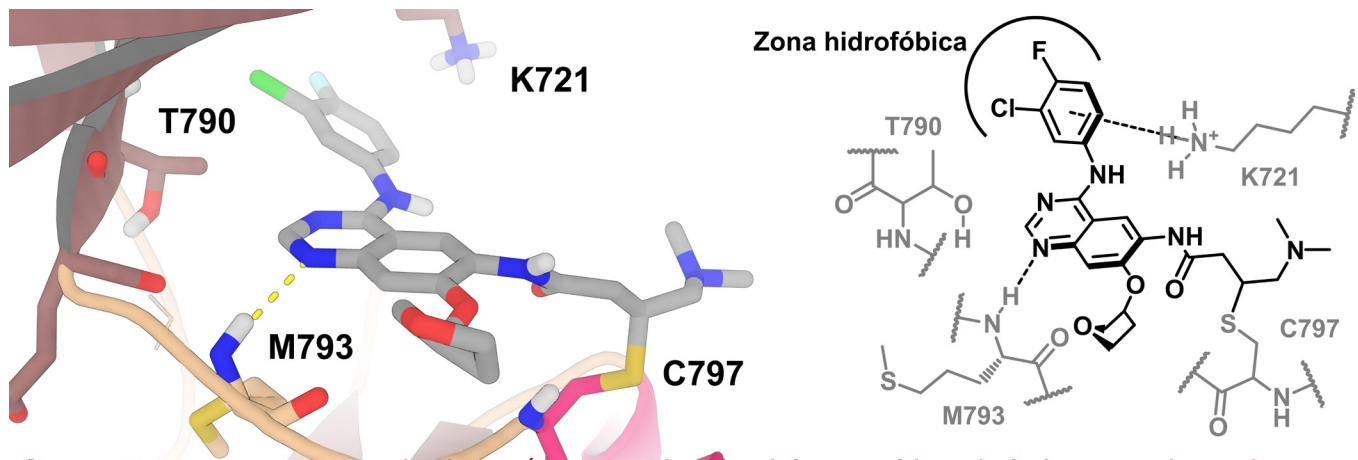
**Figura 10.** Estructura y modo de unión en 3D (arriba) y 2D (abajo) de gefitinib (izquierda) y erlotinib (derecha); PDB IDs: 4WKQ y 1M17 respectivamente.

mente avanzado tras el fracaso de los tratamientos con platino y docetaxel.[18] Sin embargo, un estudio aleatorizado posterior a gran escala no demostró una ventaja de supervivencia del gefitinib en el tratamiento de este cáncer, y su combinación con los agentes de platino no mostraron ningún beneficio clínico.[19] Estas limitaciones, junto con el informe de toxicidad pulmonar letal a partir de estudios realizados en Japón, fue lo que llevó a su sustitución por el compuesto estrechamente relacionado erlotinib (OSI-774, Tarceva™). Curiosamente, la falta de respuesta clínica al gefitinib en algunos pacientes se asocia a mutaciones en varias posiciones del EGFR, lo que ejemplifica las posibilidades de los tratamientos basado en la farmacogenómica o la medicina personalizada. El erlotinib fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 2004 para pacientes con EGFR positivo con enfermedad avanzada o metastásica de NSCLC después del fracaso de la quimioterapia anterior. Esto significa que, idealmente, todos los pacientes potenciales, para ser tratados con este medicamento, deben ser preseleccionados con pruebas de expresión de EGFR, ello implica ahorro de tiempo y costo. y una biopsia de tumor puede no ser factible para algunos tipos de tumores. Su análogo, el icotinib (BPI- 2009H, Conmana™) es otro fármaco dirigido a pacientes con NSCLC cuyos tumores son positivos para algunas mutaciones del EGFR.

Otro derivado de la quinazolina que inhibe el EGFR con una eficacia similar y aprobado para su uso como antitumoral es el lapatinib (GW-2016, Tyverb™), un inhibidor dual del EGFR y el receptor HER-2 estrechamente relacionado, que es otra diana terapéutica importante en distintos tipos de cáncer en los que está sobreexpresado.

#### **2.2.1.2.2. SEGUNDA GENERACIÓN: INHIBIDORES IRREVERSIBLES**

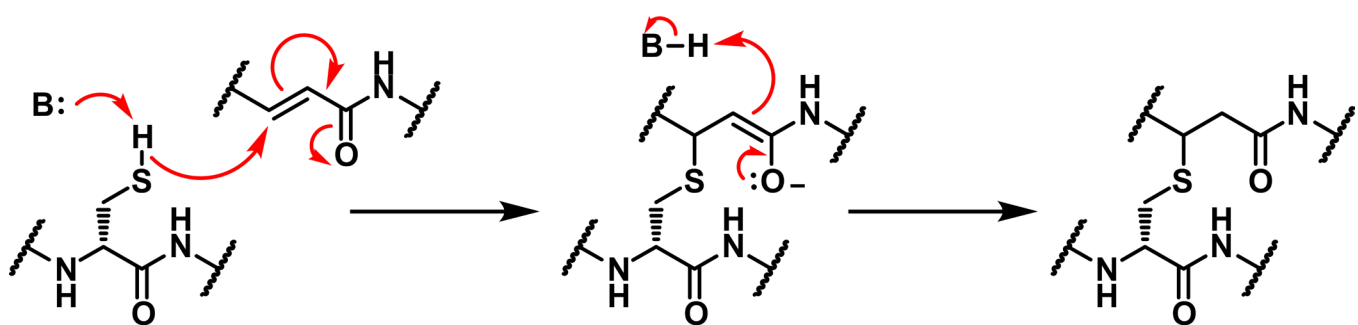
Una de las estrategias logradas para generar inhibidores de EGFR como terapia de segunda elección, debido a la baja respuesta lograda por la primera generación de inhibidores y, además, por la rápida depuración de estos, fue la creación de inhibidores irreversibles, llamados "inhibidores de segunda generación". Este tipo de compuestos, como el afatinib (BIB-2992, Gilotrif™)[20], contienen sistemas electrófilos



**Figura 11.** Estructura y modo de unión en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de apatinib. En la C797 se logra observar el enlace covalente formado por el azufre de la cisteína y el carbono  $\beta$  respecto al electroattractor (amida). PDB ID: 4G5J

aceptores de Michael para unirse covalentemente a un residuo de cisteína (Cys797) que se encuentra en la región del sitio catalítico expuesta al disolvente, justo en la parte superior de la hélice  $\alpha$ D. La modificación covalente lograda por este tipo de inhibidores, mostró un incremento en el tiempo de inhibición en el TKD y, además, se sobreponía ante la mutación EGFR<sup>T790M</sup> del sitio catalítico.<sup>[21-23]</sup> El afatinib demostró ser igualmente potente contra la doble mutación EGFR<sup>L858R/T790M</sup> y la isoforma silvestre (EGFR<sup>WT</sup>), lo que produjo diversos efectos secundarios a dosis clínicas.

**Figura 12.** Mecanismo de adición tipo Michael en sistemas proteína-ligando irreversible

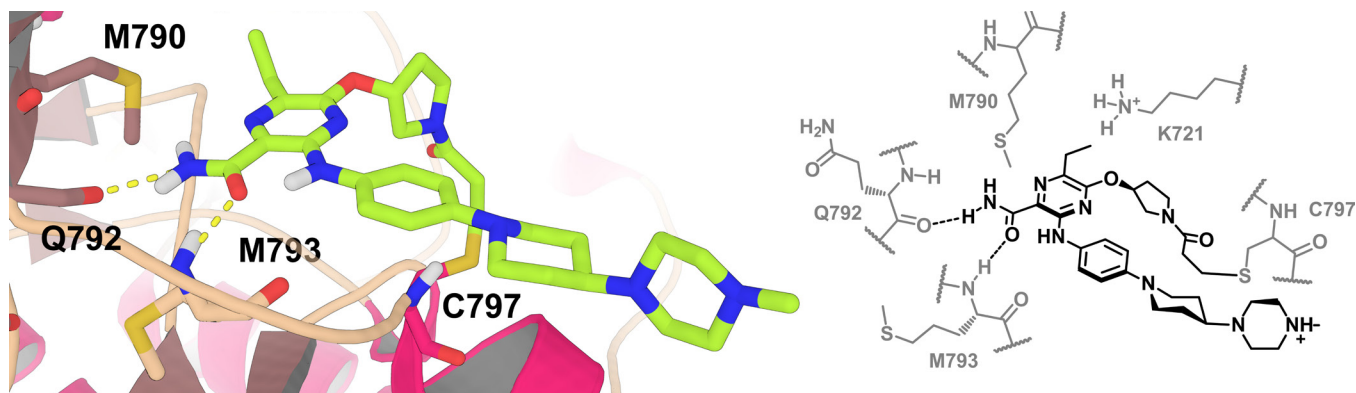


### 2.2.1.2.3. TERCERA GENERACIÓN: ADIÓS QUINAZOLINA

La siguiente generación de moléculas activas contra EGFR se basó en scaffolds diferentes a las quinazolininas. Éstas, tenían los mismos objetivos: 1) lograr una unión covalente con el sitio activo de la enzima para aumentar el tiempo de inhibición y 2) evadir la mutación EGFR<sup>T790M</sup>.

Así, AztraZeneca® patentó en el 2009 el osimertinib (AZD-9291), un compuesto cuya estructura base es una pirimidina acoplada a un indol mediante un enlace arilo-arilo. La característica que define estos inhibidores de tercera generación es que tienen una actividad significativamente mayor en las células mutantes del EGFR que en las células con EGFR<sup>WT</sup>, lo que los convierte en mutantes selectivos.[24] Fármacos como el osimertinib, rociletinib (CO-1686), olmutinib (HM61713), naquotinib (ASP8273) (Figura 13), nazartinib (EGF816), son ejemplos de la tercera generación de inhibidores de EGFR.

**Figura 13.** Estructura y modo de unión en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de naquotinib. En la C797 se logra observar el enlace covalente formado por el azufre de la cisteína y el carbono β respecto al electroattractor (amida). PDB ID: 5Y9T



### 2.2.1.2.4. NUEVAS ESTRATEGIAS

Dado que, a pesar de lograr modificar covalentemente a EGFR con los inhibidores de segunda y tercera generación, datos clínicos revelan que éstos, no ofrecen una ventaja significativa de supervivencia comparado con los TKI de primera genera-



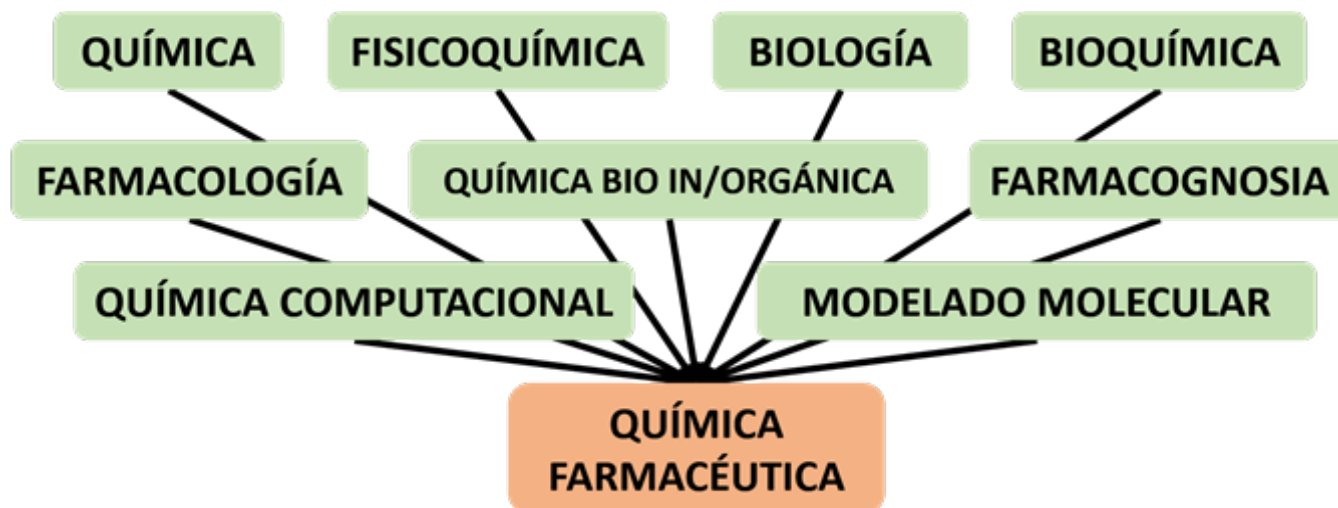
ción. Por ello, la investigación continuó por encontrar nuevas moléculas que ofrecieran una supervivencia mayor. A partir de la tercera generación, los inhibidores de EGFR no han cambiado del todo la estrategia, se sigue buscando formar enlace covalente con la Cys797 e intentando evitar la resistencia por la mutación EGFR<sup>T790</sup>. La molécula más reciente (Qiuju-**3bb**), reportada con ensayo de determinación de IC<sub>50</sub> hacia EGFR fue publicada por Qiuju, Xun en el Journal of Medicinal Chemistry. [25] El diseño de esta molécula no fue dirigido hacia EGFR, sino para el receptor del factor estimulante de colonia (CSF1R); aún así, al analizar la estructura podemos encontrar que parece un inhibidor de segunda o tercera generación por la presencia del aceptor de Michael. Determinaron una IC<sub>50</sub> de 2.5 μM, considerándolo un hit para EGFR.

En el 2015, Zhang, Y. reportó un conjunto de moléculas similares a la primera generación de inhibidores, pero incluía una porción organometálica en una de las colas de las estructuras. Su compuesto más activo tipo [(η<sup>6</sup>-areno)Ru(N,N-L13)Cl]PF<sub>6</sub> parecido al gefitinib, Zhang-**4**, tuvo una IC<sub>50</sub> de 1.36 μM. La estrategia se basó en aumentar el potencial para inducir apoptosis gracias al complejo organometálico. Los autores no mencionan ninguna actividad adicional a la unión de estos ligandos a EGFR y a DNA, sin embargo, en el trabajo de investigación que aquí se presenta, se trata de abordar un caso similar, pero con datos teóricos y desde una perspectiva molecular más contundente.

Landi, L. establece que el inhibidor ideal podría ser igualmente eficaz independientemente del tipo de mutaciones de EGFR, muy similar al sitio de unión del receptor, activo incluso en presencia de clonas de EGFR<sup>T790M</sup> y -desde el punto de vista del paciente- al menos con un perfil de toxicidad idéntico o mejor que los compuestos más antiguos. [26]

### 2.3. QUÍMICA FARMACÉUTICA: EL DISEÑO DE FÁRMACOS Y MOLÉCULAS BIOACTIVAS

Por años, se han desarrollado incontables estrategias para crear moléculas con una actividad biológica deseada. En un inicio, el uso de materiales vegetales guio la te-



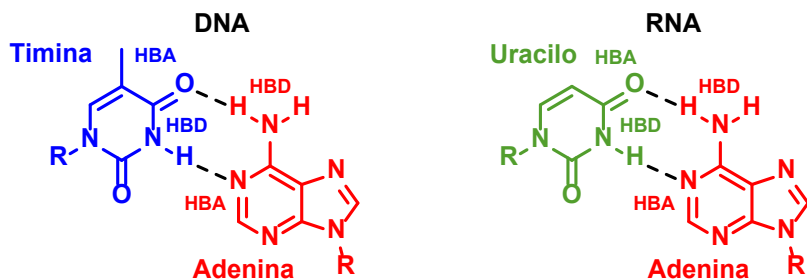
**Figura 14.** La Química Farmacéutica como un área multidisciplinaria donde se estudia, a nivel molecular, la actividad biológica de los compuestos activos, especialmente fármacos.

rapéutica con la que el ser humano mantenía la integridad física. Posteriormente, se descubrió la química de algunas moléculas con distintas actividades y comenzó el diseño de nuevas moléculas, quizá con la misma actividad, basado en sus antecedentes. Gracias a los aportes de muchos científicos, destacando a Paul Ehrlich, creador del término “receptor” con su teoría de las cadenas laterales, y al desarrollo de la cristalización de biomacromoléculas como las proteínas, se descubrió que las moléculas activas tenían una diana biológica con la que interactuaban, causando modificaciones en ella y desencadenando una serie de reacciones que culminaban en un efecto específico.

Gracias a esto, la Química Farmacéutica se desarrolló, poco a poco, como una combinación de disciplinas donde, a partir de estudios químicos, fisicoquímicos, biológicos, computacionales, se creaban nuevas moléculas con potencial actividad biológica y muy buenos pronósticos para llegar a pacientes con la necesidad de terapias para distintas patologías.

La IUPAC define a la Química Farmacéutica como “...la invención, descubrimiento, diseño, desarrollo, identificación, preparación y la interpretación del modo de acción y metabolismo de los compuestos biológicamente activos a nivel molecular. Se hace hincapié en los fármacos, pero los intereses del químico farmacéutico no se limitan a éstos, sino que incluyen los compuestos bioactivos en general”.[27]

### Interacciones entre nucleótidos (DNA/RNA)



**Figura 15.** Estabilización de la doble cadena de DNA mediante puentes de hidrógeno entre bases nitrogenadas

cromolécula al cual unirse. Una estrategia para la inhibición de EGFR es imitar las interacciones que estabilizan al ATP dentro del sitio activo, sobre todo, de la base púrica adenina. Las figuras que a continuación se muestran, tratan de ilustrar las interacciones que puede tener adenina con distintas biomacromoléculas como DNA, RNA y cinasas.

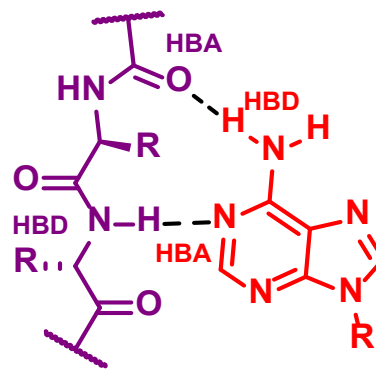
De acuerdo con los descubrimientos de Watson y Crick[28] sobre el apareamiento de las bases nitrogenadas, en el DNA la adenina forma dos puentes de hidrógeno con timina, mientras que en el RNA la adenina forma los mismos puentes de hidrógeno, pero con uracilo. Los otros dos nucleótidos -citosina y guanina- en ambos, DNA y RNA, se conservan y forman tres puentes de hidrógeno intramoleculares, interacciones que disminuyen la capacidad de poder desnaturalizar tan fácil el DNA y RNA.

Como se observa en la **Figura 16** las interacciones que existen entre la cadena proteica principal de las cinasas de ATP y la adenina son semejantes a las que existen intermolecularmente entre las bases del DNA y RNA. ATP es un cofactor de muchas enzimas que llevan a cabo procesos de señalización mediante fosforilación de ciertos residuos de aminoácidos, para el caso de este trabajo

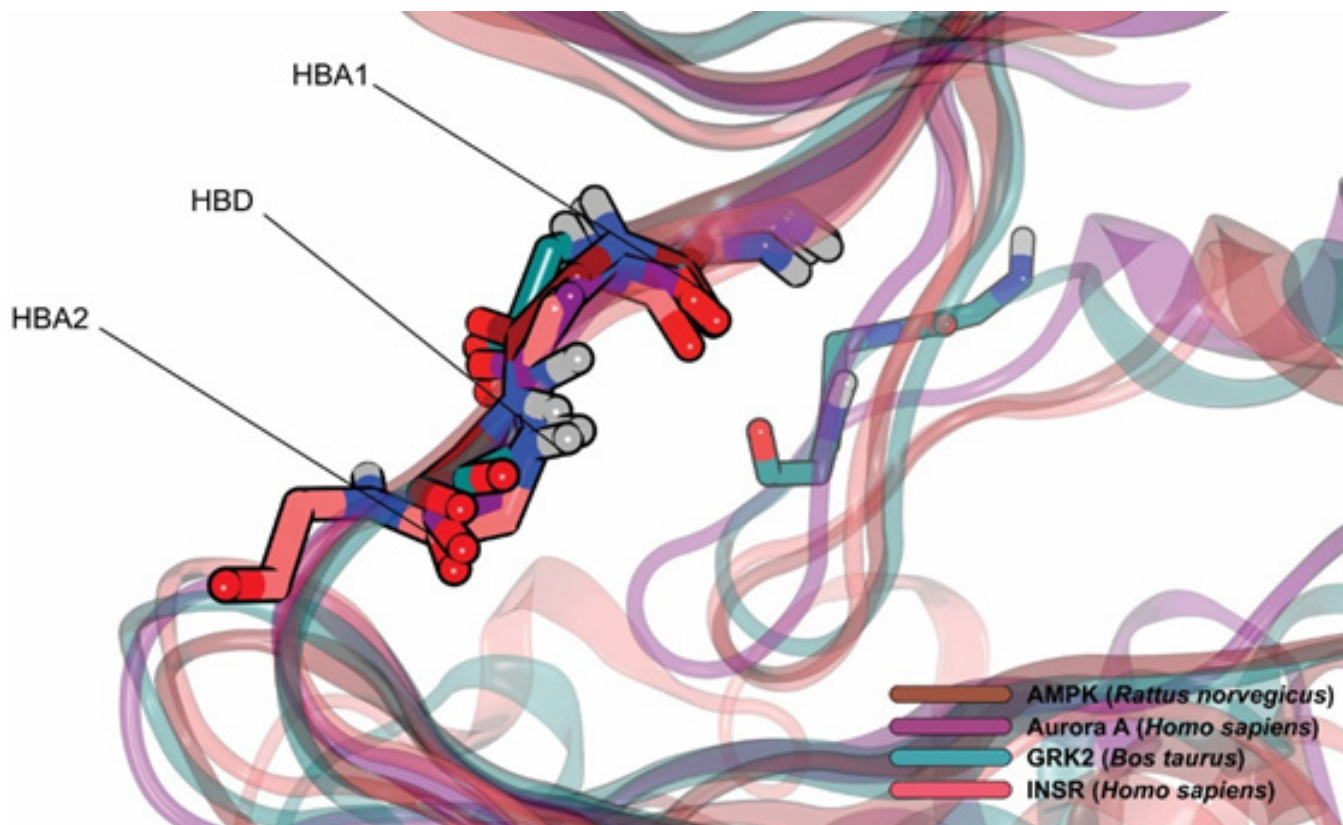
### 2.3.1. MIMETIZACIÓN DE MOLÉCULAS ENDÓGENAS: CINASAS Y ATP

Una de las estrategias en el diseño de fármacos es la creación de moléculas que mimeticen alguna molécula endógena que posee algún receptor, enzima o bioma-

#### Reconocimiento en cinasas de ATP



**Figura 16.** Estabilización de la adenina en cinasas de ATP



**Figura 17.** Sitio activo conservado en algunas cinasas de ATP

se pretende mimetizar dichas interacciones de reconocimiento en las cinasas, de tal forma que se pueda inhibir este receptor sin afectar el material genético.

Cabe destacar la conservación algunos elementos de estructura secundaria de todas las cinasas de ATP para reconocer este cofactor, en la **Figura 17** se aprecia lo antes mencionado con algunas estructuras cristalográficas de cinasas recuperadas del PDB.

Nótese de la **Figura 17** la presencia del carbonilo del enlace peptídico aceptor de puentes de hidrógeno (HBA1) y el hidrógeno de la amida donador de puentes de hidrógeno (HBD), además, en todas las cinasas también se conserva un segundo carbonilo aceptor de puentes de hidrógeno (HBA2). De aquí, que partimos para la propuesta del núcleo o scaffold que tendrán las moléculas a diseñar.

### 2.3.2. QUÍMICA FARMACÉUTICA INORGÁNICA

Los sistemas biológicos son básicamente un ensamble de átomos de carbono dis-

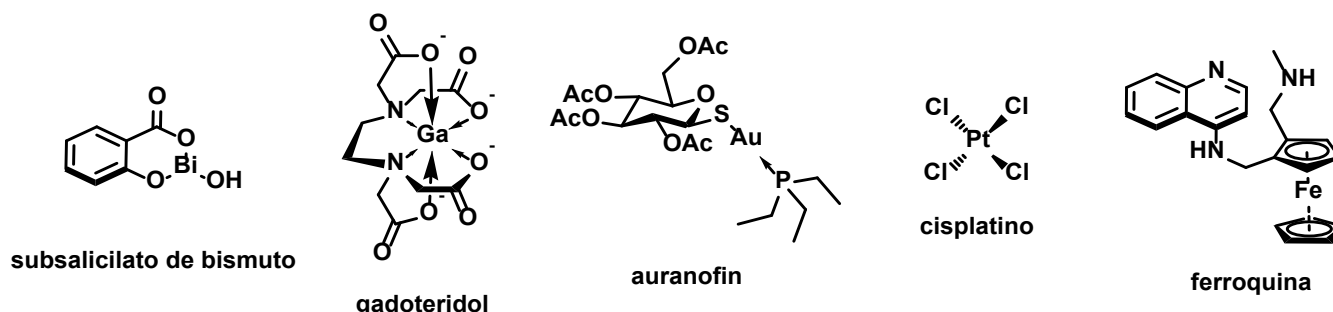
puestos en distintas conformaciones y combinaciones con otros átomos como oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo (CHONPS), entre otros.

A pesar de ello, nunca hay que olvidar la importancia que tienen otros átomos como los metales en la química de la vida. Muchos procesos importantes requieren iones metálicos, incluyendo la respiración, gran parte del metabolismo, la fijación de nitrógeno, la fotosíntesis, el desarrollo, la transmisión nerviosa, la contracción muscular, la transducción de señales y la protección contra agentes tóxicos y mutagénicos. Los metales "no naturales" se han introducido en la biología humana como sondas de diagnóstico y fármacos. A medida que se han ido descubriendo más sistemas que requieren iones metálicos, el número de trabajos de investigación en Química Farmacéutica Inorgánica se ha multiplicado hasta el punto de que donde lo que antes era una frontera en expansión ahora está madurando.

Ya en la actualidad, es incontable la cantidad de moléculas orgánicas que tienen actividad biológica, este capítulo no alcanzaría ni un 1% (por no decir nada) para describir cada una de estas moléculas y sus actividades. Las moléculas orgánicas e inorgánicas con algún centro metálico y con actividad biológica, tampoco se quedan atrás. Solamente por mencionar algunos fármacos con metales está el subsalicilato de bismuto, un fármaco comenzado a usarse en 1900 para evitar las diarreas causadas por cólera.[29] Se trata de un compuesto derivado del ácido salicílico con el ácido carboxílico y al fenol de éste, coordinado a un átomo de bismuto.

A finales de la década de 1970, durante un auge en el uso y descubrimiento de terapias con Au(I), surgió el auranofin como un posible un agente antiartrítico alternativo que tenía una presunta ventaja en la administración oral comparado con

**Figura 18.** Estructura 2D de algunos fármacos con metales, actualmente en uso y con distintas dianas y actividades biológicas.



otros de su tipo. El auranofin es una especie monomérica de Au(I) en la que el grupo trietilfosfina estabiliza el complejo oro-tiol. No se entiende bien cómo funciona exactamente el auranofin. Puede actuar como un inhibidor de la cinasa I- $\kappa$ B[30] y la tiorreductasa, lo que llevaría a una disminución de la respuesta inmune y de la producción de radicales libres, respectivamente. En pacientes con artritis inflamatoria, como la artritis reumatoide adulta y juvenil, las sales de oro pueden disminuir la inflamación del revestimiento de la articulación. Este efecto puede prevenir la destrucción del hueso y del cartílago.

Estos dos fármacos solo son ejemplo de muchos en uso actualmente, sin embargo, no todos son fármacos dirigidos a una diana en específico. En ese sentido, el gadoteridol, un complejo del ácido etilendiamin-tetraacético (EDTA) y Gd(III), mejora el contraste del cerebro, la columna vertebral y los tejidos circundantes, lo que resulta en una mejor visualización (en comparación con la RMN no mejorada) de las lesiones con vascularidad anormal o de aquellas que se cree que causan una alteración de la barrera hematoencefálica normal. Como un átomo paramagnético, los pares de electrones desapareados del Gd(III), provocan un cambio en el campo magnético local de los protones que permite observar mejor los tejidos en donde éste se acumula.

Estructuras de los fármacos mencionados anteriormente y otros, cuyo uso no es mencionado pero que, de alguna manera representan una pequeña población de los fármacos con metales, se representan en la **Figura 18**.

## **2.4. RECEPTORES ACOLADOS A TIROSIN CINASAS**

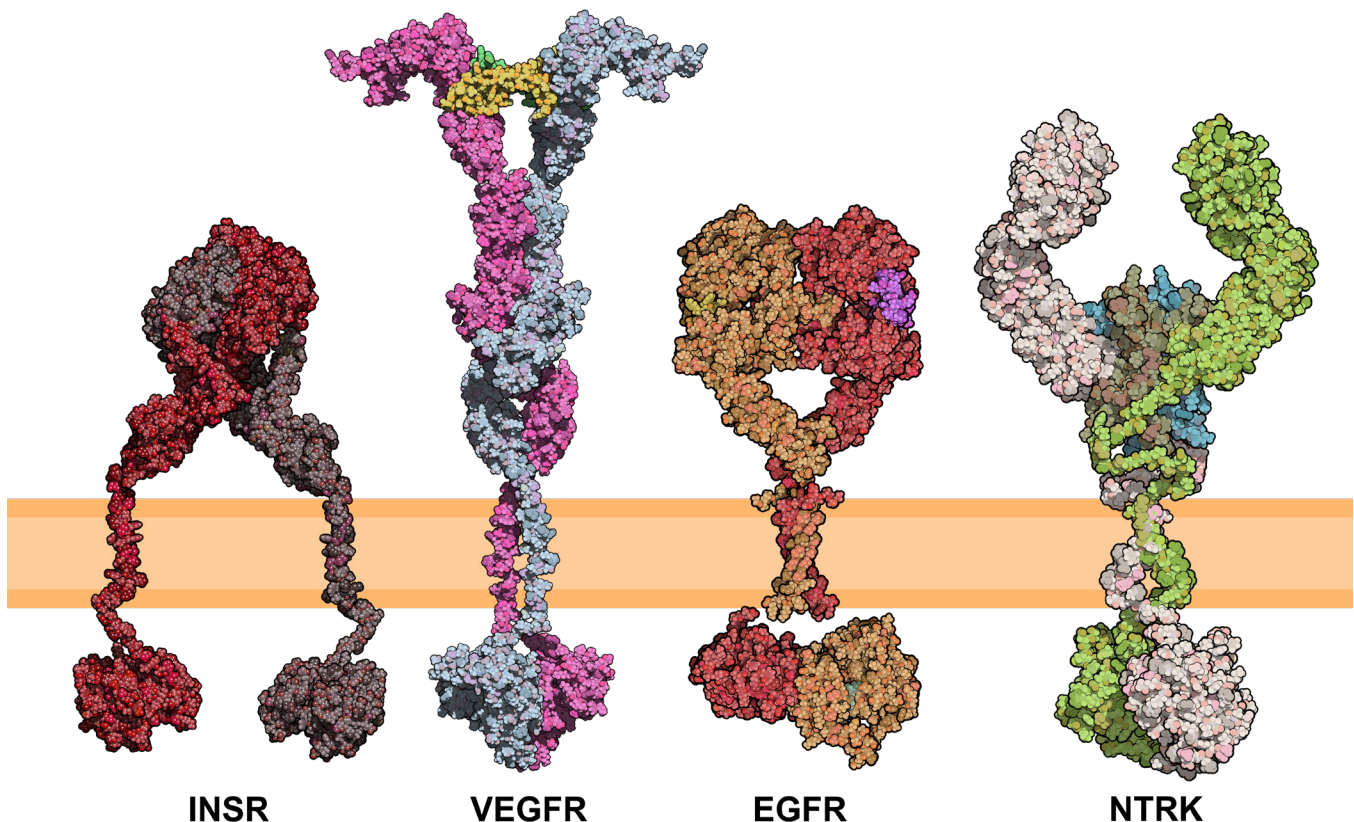
Los receptores acoplados a tirosin cinasas (RTKs), son una gran familia de receptores de membrana plasmática con actividad intrínseca de la protein cinasa, transducen las señales extracelulares mediante un mecanismo fundamentalmente diferente al de los Receptores acoplados a proteína G (GPCRs).

Las RTK tienen un dominio de unión de ligandos en la cara extracelular de la membrana plasmática y un sitio activo de enzimas en la cara citoplasmática, conectado por un único segmento transmembranal. El dominio citoplasmático es una protein cinasa que fosforila los residuos de tirosina en proteínas diana específicas: una tiro-

sin cinasa. Los receptores de la insulina y del factor de crecimiento epidérmico son ejemplos de este grupo de receptores.[31]

Las funciones principales de los receptores acoplados a tirosin cinasa son la regulación de los aspectos multicelulares del organismo. Las señales de célula a célula relacionadas con el crecimiento, la diferenciación, la adhesión, la motilidad y la muerte, se transmiten frecuentemente a través de las tirosin cinasas. En contraste, muchas de las familias de la serin/treonin cinasa, como las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y las cinasas MAP, se conservan a través de los eucariotas y regulan los procesos tanto en organismos unicelulares como multicelulares. En los seres humanos, se ha demostrado que las tirosin cinasas desempeñan un papel significativo en el desarrollo de muchos estados patológicos, incluyendo la diabetes y el cáncer. Históricamente, las tirosin cinasas definen la clase prototípica de los oncogenes, in-

**Figura 19.** Receptores acoplados a tirosin cinasa. Los receptores de factores de crecimiento que señalizan a través de la actividad de tirosin cinasa incluyen los de la insulina (INSR), el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGFR), el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de crecimiento nervioso de alta afinidad (NTRK)



volucrados en la mayoría de las formas de enfermedades humanas.[32]

En la actualidad se han identificado aproximadamente 20 clases diferentes de RTK. [32,33]

### **2.4.1. FAMILIA ERBB**

La familia de RTK del EGFR o Clase I está formada por 4 miembros (denominados colectivamente la familia ErbB o HER): EGFR, ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Como todos los RTK, cada receptor ErbB comprende una gran región extracelular, un único dominio de transmembrana (TM), una región yuxtamembranal intracelular (JM), un dominio de tirosin cinasa (TKD) y una región reguladora C-terminal. Los ligandos que regulan los receptores ErbB pueden separarse en dos grupos principales: los agonistas del EGF que activan el EGFR, y las neuregulinas (NRG) que se unen a ErbB3 y ErbB4.

#### **2.4.1.1. EGFR**

El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es uno de los cuatro miembros de la familia de receptores de membrana con actividad tirosin cinasa (TK) conocidos de forma global como ErbB. La activación de este receptor supone tanto un beneficio de proliferación, como un importante freno a la apoptosis al estimular rutas oncogénicas como MAPK y PI3K/Akt/PTEN/mTOR. La unión de la proteína a un ligando induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de la tirosina y conduce a la proliferación celular. Las mutaciones en este gen están asociadas con el cáncer de pulmón, principalmente de próstata, colon y mama.

EGFR se encuentra en el locus 22 del brazo corto del cromosoma 7 (7p22), que abarca 110 kb de ADN dividido en 28 exones.[34] En células normales, la expresión de EGFR se estima en 40.000-100.000 receptores por célula [35], mientras que en células cancerosas se observa una sobreexpresión de más de 2 millones de receptores por célula.[36]

El EGF es un mensajero (hormona) que dice a las células que tienen permiso para

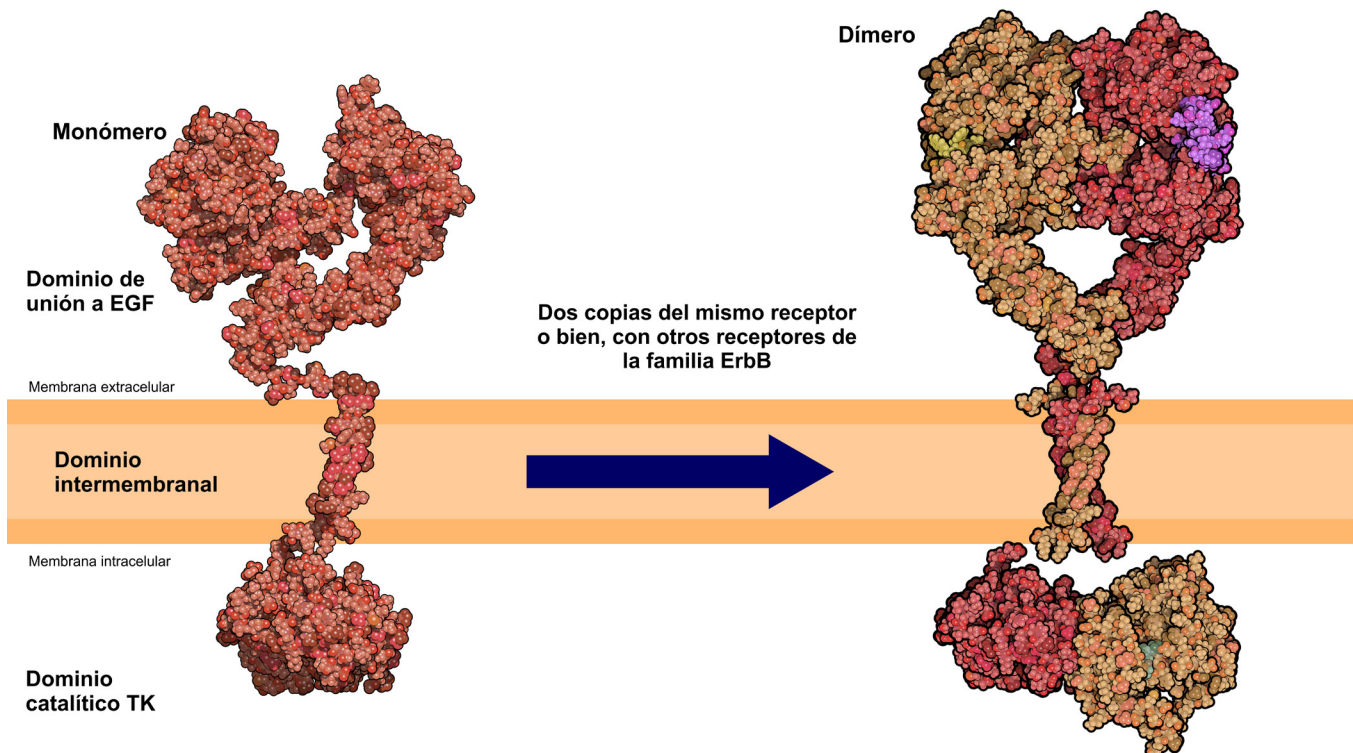


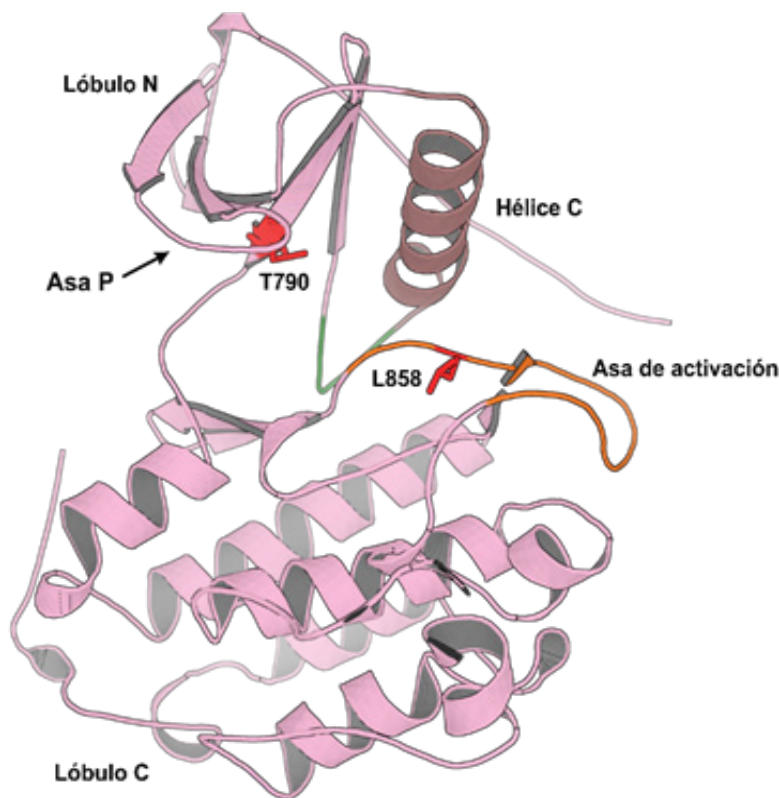
crecer. Es liberado por las células en áreas de crecimiento activo, y luego es recogido por la propia célula o por las células vecinas, estimulando su capacidad de dividirse. El mensaje es recibido por un receptor en la superficie de la célula, que se une al EGF y transmite el mensaje a las proteínas de señalización dentro de la célula, movilizándolo en última instancia los procesos necesarios para el crecimiento.

### 2.4.1.1.1. ESTRUCTURA

EGFR, mostrado en la **Figura 20**, es una proteína flexible con muchas partes móviles, incluyendo una gran porción extracelular, una sección que cruza la membrana celular, un dominio de cinasa (EGFR-TKD) y una larga cola flexible.

La parte que mira hacia afuera de la membrana, que se muestra en la parte superior, está compuesta por cuatro dominios articulados que reconocen el EGF. Cuando el EGF no está presente, se pliega sobre sí mismo, como se muestra en la estructura de la izquierda. Luego, cuando el EGF se une, el receptor se abre y se une a otra **Figura 20**. Factor de crecimiento epidérmico (morado) y su receptor (beige/rojo). La forma inactiva (izquierda) se dimeriza cuando se une a la hormona (derecha). La membrana celular se muestra esquemáticamente en naranja.

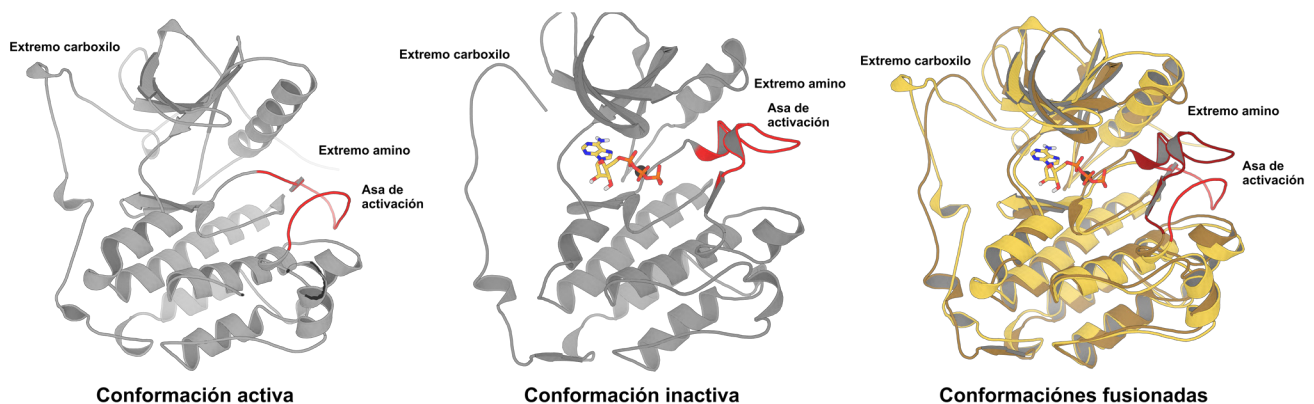




**Figura 21.** El TKD de EGFR consiste en un lóbulo N-terminal más pequeño y un lóbulo C-terminal más grande. El sitio activo se encuentra en la hendidura entre los dos lóbulos. La cinasa se muestra en la conformación activa. Las ubicaciones de las mutaciones activadoras se indican en rojo. La hélice C reguladora es de color rosa quemado, el asa P que coordina el fosfato se muestra con una flecha, y el asa de activación es de color naranja.

copia del receptor, formando el complejo dimérico que se muestra a la derecha. Esto reúne dos copias de EGFR-TKD, que se muestran en la parte inferior de la imagen de la **Figura 20**. Dado que los dominios de la cinasa están cerca uno del otro, pueden añadir grupos de fosfato a los aminoácidos de la tirosina en las largas y flexibles colas del receptor (las colas del extremo carboxilo no se muestran en la **Figura 20**).

**Figura 20.** Conformaciones activa e inactiva del dominio TK de EGFR. Se muestran las partes representativas como los lóbulos regulatorios N y C, la hélice C y el asa de activación. La conformación inactiva cuenta con ATP cocrystalizado



Las colas fosforiladas estimulan entonces las proteínas de señalización dentro de la célula.

El dominio de la tirosin cinasa (TKD) puede dividirse en un lóbulo N (principalmente una estructura de hoja  $\beta$  y un lóbulo C (una estructura principalmente de hélice  $\alpha$ , con un sitio de unión ATP situado entre los dos lóbulos.[37] La transautofosforilación se basa en la interacción del lóbulo N de un receptor con el lóbulo C del otro.[38] El dominio de la cinasa también contiene residuos de lisina que son los principales sitios de ubiquitinación de los receptores. La cola C-terminal incluye varios residuos de tirosina, que cuando se fosforilan, permiten el anclaje de una variedad de proteínas intracelulares al receptor activado. Estas proteínas participan entonces en la transducción de señales.

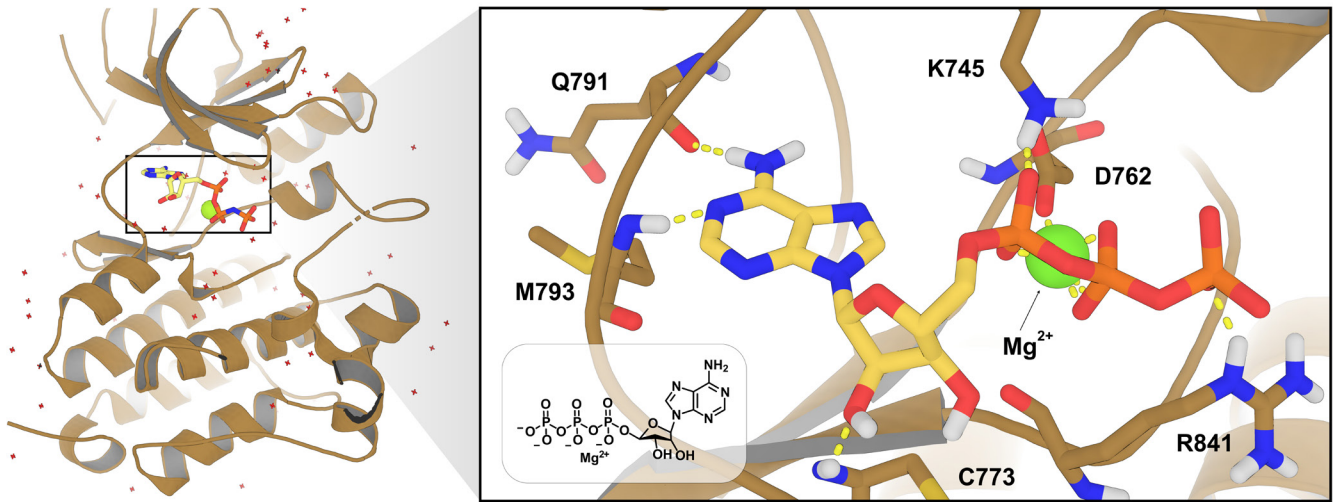
La señal transmitida por el EGFR puede ser peligrosa si no se utiliza correctamente. Muchas formas de cáncer evitan el proceso normal de señalización del EGF, dándose permiso para crecer sin control. Debido a esto, los medicamentos que bloquean la señalización del EGF son efectivos para el tratamiento del cáncer.

## **2.4.1.1.2. FUNCIÓN**

### **2.4.1.1.2.1 REACCIÓN DE FOSFORILACIÓN EN TKD**

Las enzimas llamadas cinasas catalizan la transferencia de grupos fosfato a moléculas orgánicas o bien, a otras proteínas. La fuente del grupo fosforilo en la mayoría de las reacciones de fosforilación es una molécula de trifosfato de adenosina, abreviada ATP.

La molécula de ATP consta esencialmente de tres partes: una base de nucleósidos de adenina, un azúcar de cinco carbonos (ribosa) y un grupo trifosfato. Los tres fosfatos se designan con las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . El difosfato de adenosina (ADP) y el monofosfato de adenosina (AMP) también son actores importantes en las reacciones de las cinasas.



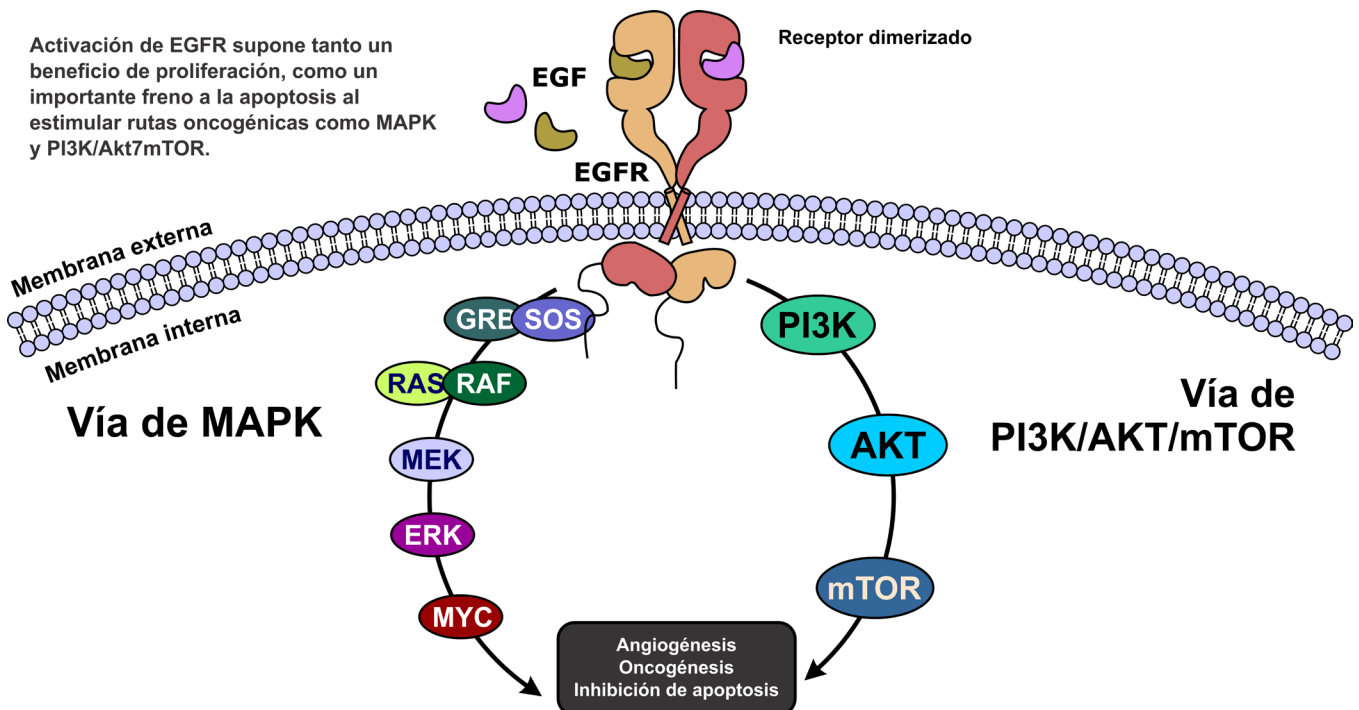
**Figura 21.** Sitio catalítico de EGFR TKD con ATP-Mg<sup>2+</sup> cocrystalizado. PDB ID: 2GS7

### 2.4.1.1.2.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN

Después de la activación del receptor y de la fosforilación de ciertos residuos de tirosina, EGFR puede conducir a dos vías de señalización importantes: 1) la vía de las MAPK y 2) la vía de PI3K/AKT/mTOR. En el Anexo III. se muestra, esquemática y detalladamente, la vía de las MAPK.

Aquí, se detalla la vía de las MAPK, que comienza con el complejo formado por Grb2

**Figura 22.** Señalización río abajo de EGFR hasta la señal de crecimiento y proliferación celular



y Sos, que se unen directamente o a través de la asociación de la proteína adaptadora Shc, a residuos específicos de tirosina fosforilada en el receptor. Esto lleva a un cambio conformacional en Sos, que puede reclutar y activar Ras-GDP. Ras-GDP intercambia a GDP por GTP y posteriormente activa a Raf-1 que, además, activa las cinasas reguladas extracelulares ERK1 y ERK2 mediadas por proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Las cinasas activadas eventualmente se mueven hacia el núcleo para fosforilar factores de transcripción específicos como Elk1 y C-myc para inducir la proliferación celular.

En la **Figura 22** se observa, de manera general, la vía de señalización de EGFR desde la unión de su ligando hasta la proliferación y crecimiento de la célula.

### **2.4.1.1.3. MUTACIONES Y RESISTENCIA A FÁRMACOS**

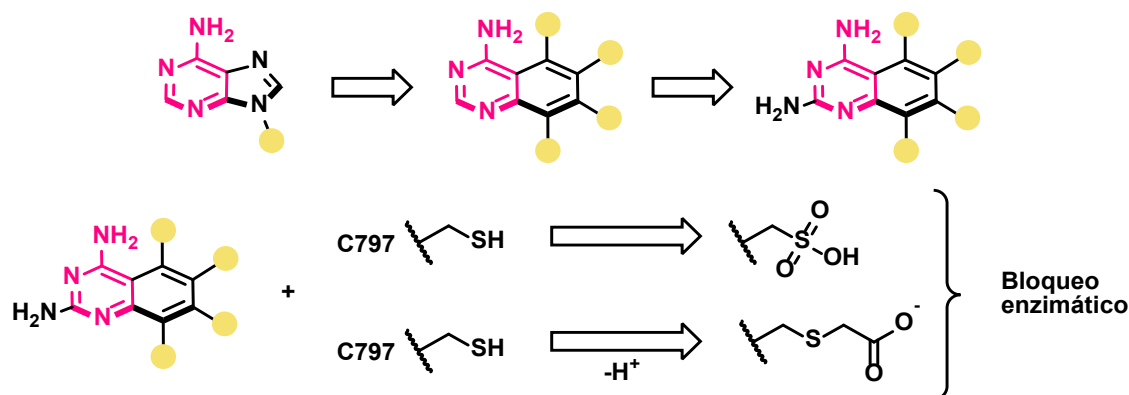
En el dominio de la cinasa, la mutación puntual de EGFR más comúnmente observada es EGFR<sup>L858R</sup>, llamada una mutación activadora "clásica" que constituye aproximadamente el 45% de las mutaciones en el dominio de la tirosin cinasa.[39,40] La mutación EGFR<sup>L858R</sup> del asa de activación confiere una actividad cinasa 50 veces mayor y un  $K_M$  más alto para el ATP que el tipo silvestre.[41,42] Molecularmente, el análisis cristalográfico sugiere que la sustitución de leucina por arginina hace que el asa de activación "se repliegue", desestabilizando la conformación activa que normalmente se encuentra en el EGFR sin ligando unido, lo que esencialmente conduce a una conformación activa estabilizada [38] y por lo tanto, activación constitutiva. Otra mutante del dominio de la cinasa, EGFR<sup>T790M</sup>, denominado como "residuo guardián", es conocido por conferir resistencia a los inhibidores farmacológicos de la tirosin cinasa del EGFR, además de aumentar los niveles de fosforilación del EGFR. [43,44] Se sabe que esta mutación está presente del 50-60% de los pacientes que desarrollan resistencia a los inhibidores actuales. Aunque aún no se conoce el mecanismo de resistencia del EGFR<sup>T790M</sup>, la cadena lateral de metionina, más voluminosa, puede ser un obstáculo estérico para la fijación del inhibidor.[45] Uno de los principales objetivos de este trabajo de investigación es lograr diseñar moléculas que evadan precisamente esta mutante.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

EGFR es un receptor que se encuentra sobreexpresado en cierto tipo de tumores, como el LUAD. No obstante, también se ha observado que ciertas mutaciones, como la EGFR<sup>T790M</sup>, modifican su sitio activo y, por lo tanto, afectan su interacción con los fármacos aprobados para su uso en pacientes con el adenocarcinoma antes mencionado. La investigación de moléculas novedosas que enfrenten las mutaciones señaladas aún continúa debido a la baja respuesta en fases clínicas. Tres generaciones han marcado el rumbo de las estrategias [14,20,24] con las que se pueden desarrollar moléculas activas contra este receptor, sin embargo, pocas han sido las moléculas diseñadas con base en nuevas estrategias químicas para inhibirlo y que conserven las cualidades para evadir la resistencia. Este proyecto busca generar una nueva generación de moléculas que posean cualidades de las tres generaciones de inhibidores de EGFR y, además, que incluyan una subestructura o un grupo funcional que permita la modificación del receptor sin depender de la clásica inhibición en el sitio activo.

### 4. HIPÓTESIS

Diversos han sido los trabajos de investigación alrededor del mundo que buscan evitar, a toda costa, la resistencia que le confiere ciertas mutaciones para la estabilización de inhibidores en el TKD de EGFR. Por ello, este trabajo, busca darle un giro la estrategia de inhibición. En primer lugar, pensando entre la analogía que puede existir entre el núcleo de adenina del ATP y el núcleo de la quinazolina, ya que, retomando la idea de Landi, L [26] los inhibidores deberían de parecerse más al sustrato natural. Al realizar primero una modificación isostérica del imidazol por el benceno y posteriormente, la adición de una amina en la posición 2 como donadora de puente de hidrógeno, será posible conservar las interacciones que posee ATP en su sitio activo. En segundo lugar, la clásica inhibición de EGFR de los TKI actuales busca mantener en el sitio activo al inhibidor; ello, se ha encontrado que no resulta tan benéfico ya que la mutación EGFR<sup>T790M</sup> termina por remover al inhibidor del sitio activo. En ese caso, la idea de este proyecto es proponer un nuevo inhibidor que cause alguna modificación al residuo de Cys797, como lo hacen los inhibidores de



**Figura 23.** Hipótesis gráfica

segunda y tercera generación, pero que no se tenga que depender de la permanencia del inhibidor en el sitio activo para poder inactivar el TKD de EGFR.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Diseñar, asistido por técnicas computacionales, una serie de derivados de quinazolina con nuevas estrategias de inhibición, planteando el modo de unión, la energía asociada y la estabilización del receptor con y sin ligandos.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar cuál es la conformación (activa o inactiva) del TKD de EGFR<sup>WT</sup> y EGFR<sup>T790M</sup> en presencia de ligandos, para escoger los modelos adecuados y realizar con ellos acoplamiento y dinámica molecular.
- Predecir el modo de unión en el TKD de EGFR, de un conjunto de quinazolininas previamente sintetizadas por este grupo de investigación, a fin de determinar los sitios de sustitución factibles para añadir grupos funcionales que permitan la modificación del receptor.
- Proponer un conjunto de quinazolininas novedosas que brinden nuevas estrategias para inhibir EGFR, que sean factibles de sintetizar y que puedan ser evaluadas posteriormente en un ensayo de inhibición de EGFR.
- Estudiar la estructura y estabilidad del TKD de EGFR<sup>WT</sup> en su conformación activa

e inactiva, con ligandos y sin ligandos.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS

Utilizando el programa Jalview 2.10.5, se obtuvieron las secuencias de EGFR humano de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>).<sup>[46]</sup> La identificación y alineamiento de todas las secuencias utilizadas se realizó utilizando las herramientas internas del programa con el servidor de alineamiento ClustalX Versión 2.0 (<http://www.clustal.org/clustal2/>). Se descargaron 28 estructuras 3D de EGFR humano, depositadas entre los años 2002 y 2015, con una resolución entre 1.5 y 2.9 Å, preferentemente en su forma silvestre y únicamente con la mutación EGFR<sup>T790M</sup>. La representación 3D y la superposición de las proteínas se consiguió utilizando PyMOL 2.2.3 (<https://pymol.org/>).<sup>[47]</sup> Para conseguir la similitud entre secuencias se utilizó la herramienta MatGAT v2.0, generando una matriz de correlación con el algoritmo BLOSUM50.

La matriz de RMSD se construyó utilizando las herramientas de MOE 2015.01.<sup>[48]</sup>

### 6.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Con el fin de obtener información sobre la afinidad y los posibles modos de unión de las moléculas estudiadas, se realizaron estudios de acoplamiento molecular. Todos los estudios de acoplamiento se llevaron a cabo en PC con Windows 10 (x86) como sistema operativo.

#### 6.2.1. PREPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Los modelos proteicos de EGFR<sup>WT</sup> y EGFR<sup>T790M</sup>, seleccionados en la parte de los estudios bioinformáticos, se importaron en MOE 2015.01.<sup>[48]</sup> Con la herramienta Structure Preparation se corrigieron los elementos de estructura secundaria faltantes como asas y giros, se añadieron los aminoácidos incompletos y se les asignó la carga correspondiente; posteriormente, se corrigió la hibridación de los carbonos



alfa de la cadena principal. Al sistema completo se le asignaron cargas parciales ocupando como campo de fuerza Amber10:EHT.[49] Posteriormente, se verificó la validez de la estructura a través de los ángulos de torsión mediante el gráfico de Ramachandran generado con el servidor MolProbity [50] y mostrados en el Anexo I.

### **6.2.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN AUTODOCK Y AUTODOCK VINA**

Los modelos proteicos de EGFR<sup>WT</sup> y EGFR<sup>T790M</sup> obtenidas en el PDB y preparados en MOE 2015.01 se importaron en Autodock Tools 1.5.6, se agregaron hidrógenos polares y se combinaron los no polares. A todos los modelos se le asignaron cargas de Gasteiger-Marsili.

Los mapas de la caja se calcularon utilizando AutoGrid 4.2. En todos los acoplamientos, se construyó una cuadrícula de 40x40x40 puntos en las direcciones x, y, y z. Luego, los mapas se centraron en las coordenadas del sitio catalítico de la proteína. El archivo de los parámetros de la caja (\*.gpf) fueron generados y guardados. Para el acoplamiento molecular se establecieron los parámetros del algoritmo genético que vienen predeterminados en ADT, estableciendo los siguientes valores: una población de 300 individuos, 2.5 millones de evaluaciones energéticas, un valor máximo de 27000 generaciones, número máximo de individuos por generación que sobreviven automáticamente a la siguiente generación de 1, tasa de mutación de genes de 0.02, tasa de cruce de 0.8, 100 ejecuciones de acoplamiento, posiciones y conformaciones iniciales aleatorias. La probabilidad de realizar la búsqueda local de un individuo de la población se estableció en 10. Finalmente se guardaron los parámetros del acoplamiento (\*.dpf) y se ejecutaron con AutoDock 4.2.

Para el uso de Vina se ocuparon las mismas dimensiones y posiciones de la caja ocupados para AutoDock y posteriormente se generó el archivo de configuración de Vina (config.txt), dejando las opciones que vienen predeterminados: 9 modos de unión, exhaustividad de 8 y rango de energía de 3.

### **6.2.3. PREPARACIÓN DE LOS LIGANDOS**

Todos los ligandos se construyeron en Spartan 14 (versión 1.1.4) de Wavefunction,

se optimizó la geometría de equilibrio con el modelo semiempírico PM3 (Parameterized Model Number 3)[51] el cuál, incluye los parámetros para los átomos que contienen todas las moléculas. Todas las moléculas se guardaron en un solo documento en formato \*.pdb y \*.mol2.

### 6.3. DINÁMICA MOLECULAR

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular en una PC con Linux Ubuntu utilizando Gromacs 4.6.5 [52–55] tanto para EGFR<sup>WT</sup> como para EGFR<sup>T790M</sup>. Se utilizó el campo de fuerza CHARMM27 [56] para generar las topologías de ambos modelos. Todos los sistemas se resolvieron con el modelo SPC/E (carga puntual simple extendida) en una caja cúbica bajo las condiciones periódicas utilizando una distancia de 1.0 nm desde la proteína hasta la superficie de la caja. Para neutralizar el sistema, se escogió como sal NaCl. Cada sistema fue sujeto a la minimización de energía usando el integrador steepest descent sin restricciones por 10 pasos. Después de la minimización, los sistemas fueron equilibrados bajo el ensamble NVT (canónico) y NPT (isotérmico-isobárico) por 10 ps a 300 K después de aplicar restricciones de posición a la proteína. Por último, se realizó la producción de la dinámica molecular de 5000 ps bajo condiciones NPT quitando las restricciones de posición. La temperatura y la presión del sistema se mantuvieron utilizando el método de acoplamiento débil de Berendsen. Los potenciales de Lennard-Jones fueron usados para las interacciones de van der Waals; y las interacciones electrostáticas fueron manejadas por PME (Particle Mesh Ewald) con un corte para el término espacial real de 0,8 nm. Se utilizó el algoritmo LINCS (Linear Constraint Solver) para restringir todos los enlaces a 2 fs de tiempo y se guardaron las coordenadas finales de 5 ps. Todas las simulaciones se realizaron por duplicado y los datos de las coordenadas finales se promediaron. Los análisis para los estudios de simulación se realizaron utilizando herramientas incorporadas de Gromacs. Las visualizaciones se realizaron con PyMOL, los datos se exportaron y se graficaron en GraphPad Prism.

Las topologías para los ligandos se obtuvieron de SwissParam (<http://www.swissparam.ch/>)[57] y se incorporaron a las topologías de las proteínas.

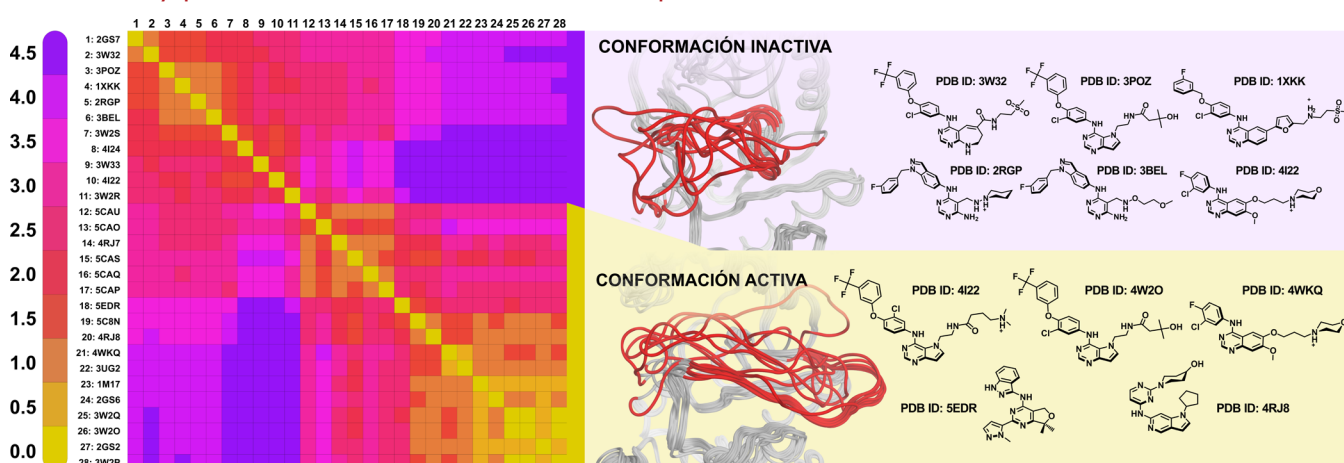
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS

Como se menciona en la sección de los antecedentes, el TKD de EGFR se puede hallar en dos conformaciones distintas; una activa cuando no se encuentra unida a ATP y una inactiva cuando se encuentra unida a ATP y  $Mg^{2+}$ ; la forma inactiva, a su vez, también se puede encontrar constitutivamente, sin ATP, cuando está presente la mutación EGFR<sup>L858R</sup> [41,42,44] aunque no en todos los casos. En esta primera parte de los resultados, se buscó determinar cuál es la conformación de EGFR a la hora de cristalizar otros ligandos, ello, con el fin de realizar adecuadamente los estudios de acoplamiento molecular y dinámica molecular. Para lograr este fin, primero se realizó una búsqueda en PDB para encontrar cuál de los cristales depositados de EGFR<sup>WT</sup> en su forma activa e inactiva (con ATP o sus derivados) poseen los mejores valores de resolución.

La selección de algunos modelos sirvió como patrón para identificar qué conformación adquiere EGFR cuando se encuentra cocrystalizado con algún ligando. Para ello se utilizaron las 28 estructuras de EGFR como se menciona en la Metodología; como requisito indispensable, todas las estructuras deben tener un ligando cocrystalizado. Como control positivo de la conformación inactiva, se seleccionó la estructura

**Figura 24.** Matriz de RMSD de las 28 estructuras obtenidas, superposición del asa de activación resaltada en rojo y estructura de algunos ligandos cocrystalizados con las proteínas. Colores más amarillos en la matriz (RMSD=0) indican alta similitud estructural. Colores más morados (RMSD=4.5) indican muy poca similitud estructural entre las proteínas.



con PDB ID: 2GS7, 2.6 Å; debido a que se encuentra cristalizado con un análogo de ATP (ANP) y ello genera naturalmente la conformación inactiva de EGFR.

En la **Figura 24** se muestran los resultados correspondientes a la alineación y superposición de las secuencias de las 28 estructuras de EGFR. La identidad de las secuencias, demostrando que todos los cristales corresponden a EGFR-TKD, se muestran en el **Anexo II**.

La matriz observada nos muestra la raíz de la desviación media cuadrática (RMSD) que nos indica, con base en la superposición de las cadenas principales de los 28 modelos, que tan semejantes son las estructuras. Se ilustra en amarillo una alta similitud en estructura y en morado una baja similitud. Se estableció qué estructuras corresponden a la forma inactiva y cuáles a la forma activa basado en sección morada en la parte superior derecha de la matriz.

La posición del asa de activación (roja), se encuentra desordenada, sobre todo, en la conformación inactiva. Esto tiene mucho que ver con la flexibilidad de esa parte y a la detección de ATP en el medio.[38,58] Al ser una parte muy flexible de la proteína, el asa se acerca aleatoriamente y de manera desordenada al sitio activo. Ahora bien, cuando ATP deja el sitio catalítico, el asa debe regresar a su posición, este regreso también debe ser desordenado. Cualquier molécula, que interfiera con los aminoácidos que permiten el regreso de la hélice C y del asa de activación a la conformación activa deberían de encontrarse cristalizados en la forma inactiva; dicha afirmación se puede comprobar diseñando moléculas con ese propósito o bien, realizando técnicas de dinámica molecular con mayor tiempo de simulación a los realizados en este trabajo. Del lado derecho de la Figura 30 se muestran algunos ligandos cristalizados en ambas conformaciones de EGFR. Cosa curiosa salta a la vista encontrar que algunos ligandos se encuentran tanto en la conformación activa como en la inactiva. Algunos autores [59,60] han sugerido que fármacos como el erlotinib y el gefitinib se unen a ambas conformaciones de EGFR; incluso sugieren que tienen una “preferencia” por cualquiera de las dos conformaciones.[61] También, el compuesto TAK-285, creado en el 2012 y estancado en la fase clínica 1, se encuentra en ambas conformaciones como lo ilustran los modelos correspondientes al PDB ID 3POZ [62] y 3W2O [63]. Estudios de dinámica molecular [64] con el PDB

3POZ (conformación inactiva) y con TAK-285, muestran como a 6 ns de tiempo de simulación, la conformación de EGFR no cambia a su forma activa y mantiene un RMSD constante. Sugiriendo que el ligando cristalizado mantiene la conformación inactiva por las interacciones que genera con la proteína.

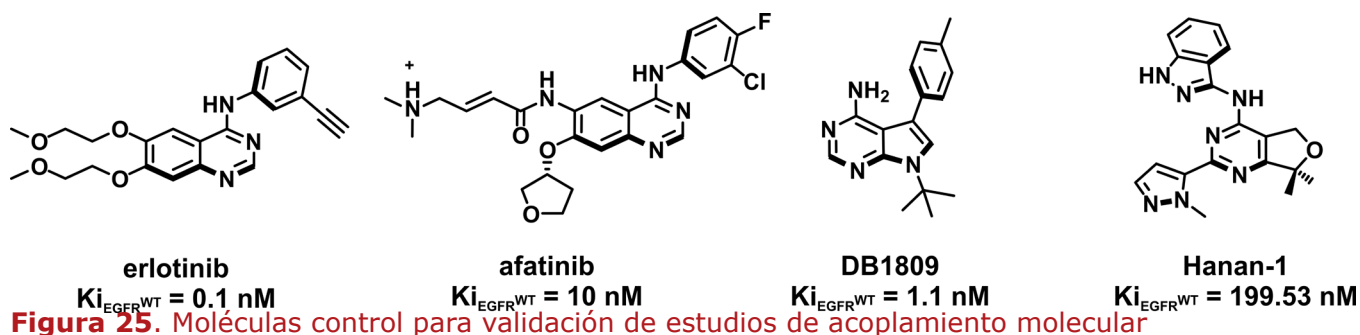
De esta matriz de RMSD no se encontró algún patrón que nos indique cuál es la conformación preferida por cierto tipo de moléculas. Por el contrario, se halló que una misma molécula puede estar unida a dos mismas conformaciones

Para realizar los estudios de acoplamiento molecular, se decidió utilizar los modelos de EGFR correspondientes a su conformación activa y a su conformación inactiva, en su forma silvestre (EGFR<sup>WT</sup>) y en su forma mutada (EGFR<sup>T790M</sup>). Se escogió como modelo en forma inactiva de EGFR<sup>WT</sup> el modelo con PDB ID:4HJO, 2.75 Å [60]; como modelo de EGFR<sup>T790M</sup> a la estructura con la mejor resolución (PDB ID: 4I24, 1.8 Å).[65] Como modelo de la forma activa de EGFR<sup>T790M</sup> se escogió la estructura con PDB ID 3IKA, 2.9 Å [66] por tener solo la mutación requerida.

## 7.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

En primer lugar, para tener certeza sobre la validez de los estudios de acoplamiento molecular, y de estudiar el comportamiento de los modelos seleccionados en la sección anterior, se utilizaron algunos ligandos conocidos de EGFR mostrados en la **Figura 25** Se siguió la metodología antes mencionada y utilizada por algunos autores [60,67,68] para predecir el modo de unión en Autodock.

En estudios previos [69], realizados por Hanan, et.al. para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un conjunto de dihidrofuropirimidinas, predijeron el modo de unión de la molécula Hanan-1 dentro del sitio activo de EGFR; en este, el nitrógeno 2 del anillo de pirazol forma un puente de hidrógeno con la cadena principal de la Met793. **La Figura 26** muestra dicha interacción en los acoplamientos con todas las conformaciones de EGFR, excepto con la conformación activa de la mutación EGFR<sup>T790M</sup>. Lo mismo ocurre con la molécula **DB1809**; posee las mismas interacciones y modo de unión en todas las conformaciones de EGFR pero no en la mutada y activa. Zhang, et.al. ya habían reportado que erlotinib y gefitinib se unen a am-

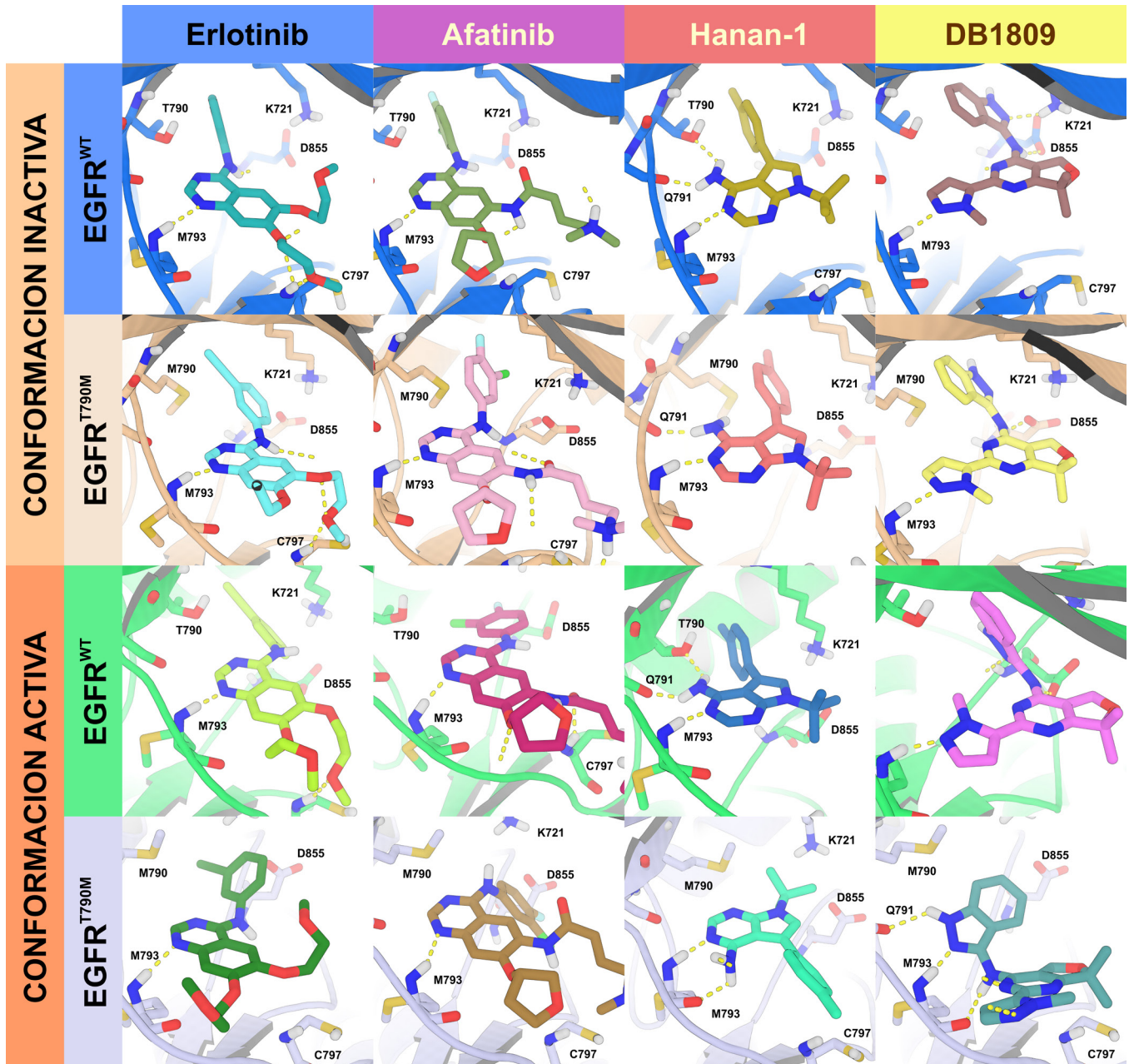


bas conformaciones de EGFR y en efecto, estudios cristalográficos y los resultados mostrados en la **Figura 26** confirman esa hipótesis. Un detalle muy importante de analizar es que todas las moléculas control utilizadas para validar el estudio, se unen preferentemente por la conformación inactiva de EGFR sin importar la mutación EGFR<sup>T790M</sup>; esto puede significar que todas las estructuras cristalográficas reportadas con gefitinib o erlotinib, primero debieron haber estado en la forma inactiva y posteriormente, con la dinámica natural de la proteína, regresar a su conformación activa. Esta teoría va de la mano con los resultados de energías de unión ( $\Delta G$ ) calculados por la función de puntaje de Autodock mostrados en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Energías de unión de cuatro ligandos conocidos de EGFR en 4 sistemas diferentes del receptor

Molécula	$\Delta G$ de unión (kcal/mol)			
	Conformación inactiva		Conformación activa	
	WT	T790M	WT	T790M
<b>Erlotinib</b>	-7.22	-7.71	-6.22	-6.19
<b>Afatinib</b>	-8.36	-9.39	-6.85	-7.81
<b>DB1809</b>	-7.49	-7.05	-7.29	-6.45
<b>Hanan-1</b>	-8.89	-9.46	-7.74	-8.3

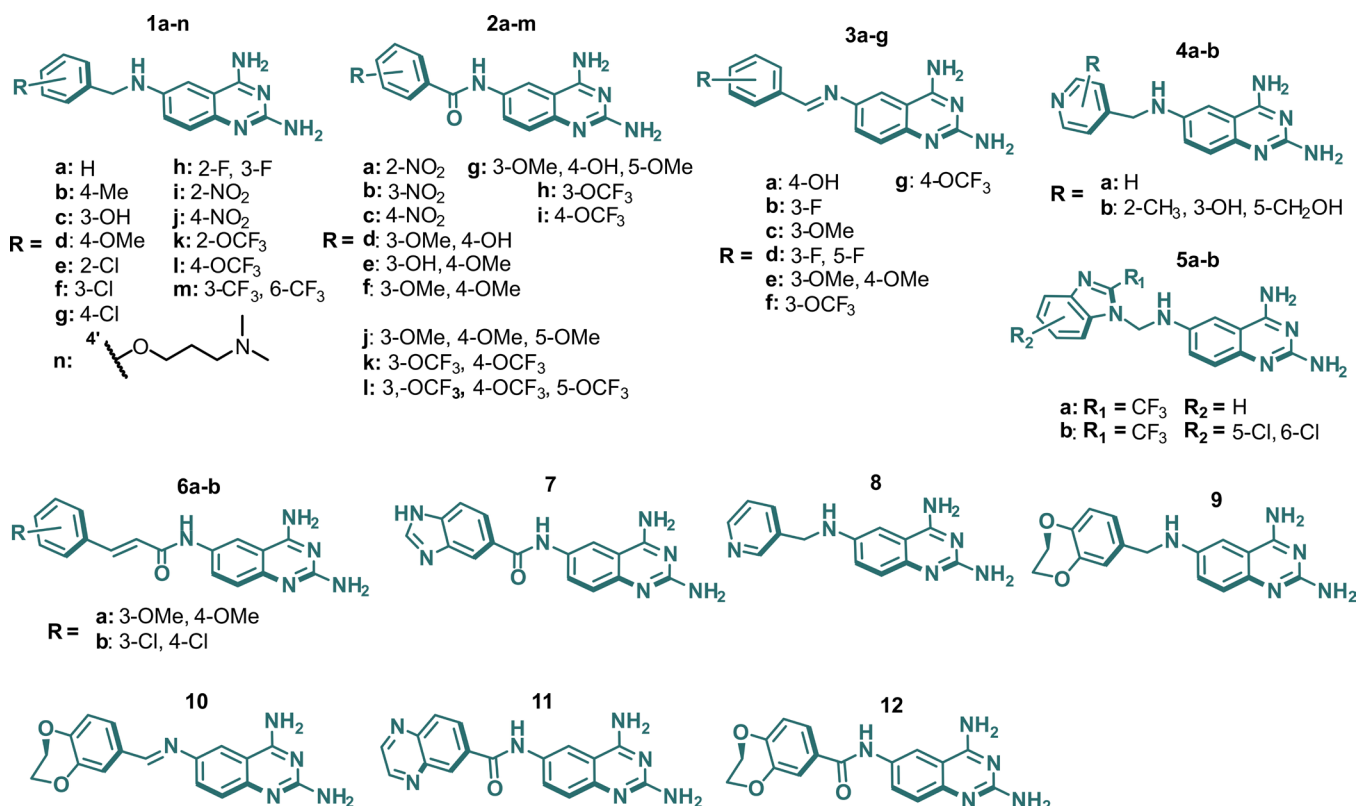
Los datos de la **Tabla 4** indican que, contrario a la evidencia que existe [42], los inhibidores de EGFR presentan mejor energía de unión por la proteína mutada que por la silvestre en su conformación inactiva sugiriendo que, la hipótesis planteada en el párrafo anterior puede ser cierta. Se requiere que los inhibidores entren al sitio activo una vez que ADP lo ha dejado para que así, pueda encontrar la conformación inactiva y con ello, aumentar su energía de unión gracias a que el asa de activación



**Figura 26.** Acoplamiento molecular en EGFR<sup>WT</sup> y EGFR<sup>T790M</sup>, conformación activa e inactiva de las moléculas control

compacta el sitio activo y la hélice C, responsable de disminuir el hueco del sitio activo cuando se tiene la conformación activa, se encuentra desplazada hacia la parte posterior abriendo el hueco mencionado.

Nótese de la **Figura 26** con el afatinib en la conformación activa de EGFR<sup>T790M</sup>, cómo la parte de anilina tiene que sufrir una rotación bastante diferente a aquella en las otras conformaciones y residuos de aminoácidos de la proteína. Esto se debe a lo mismo, la conformación activa desplaza a la hélice C hacia el sitio activo y este dis-



**Figura 27.** Estructura 2D de 45 quinazolininas sintetizadas por este grupo de investigación

minuye su tamaño.

Para este estudio, se escogió arbitrariamente una molécula de cada generación y de nuevas estrategias para verificar que el programa pueda predecir el modo de unión. El programa es confiable ya que logra predecir el modo de unión de todos los compuestos; algunos de ellos ya cuentan con estructura cristalográfica que respalda los resultados teóricos.

Previamente, en este grupo de investigación, se ha trabajado con un conjunto de quinazolininas creadas como agentes antiparasitarios. El diseño fue pensado en una estrategia para evitar la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato por la enzima dihidrofolato reductasa. Las estructuras de 45 de estas quinazolininas se muestran en la **Figura 27**. Con estas quinazolininas, se realizó un estudio de acoplamiento molecular en EGFR-TKD en su conformación inactiva y activa, silvestre y mutada, para determinar cuáles de ellas presentan el modo de unión propuesto.

La **Figura 28** muestra una superposición de las estructuras que tuvieron el modo de unión adecuado para los estudios posteriores. Las demás moléculas solamente que-

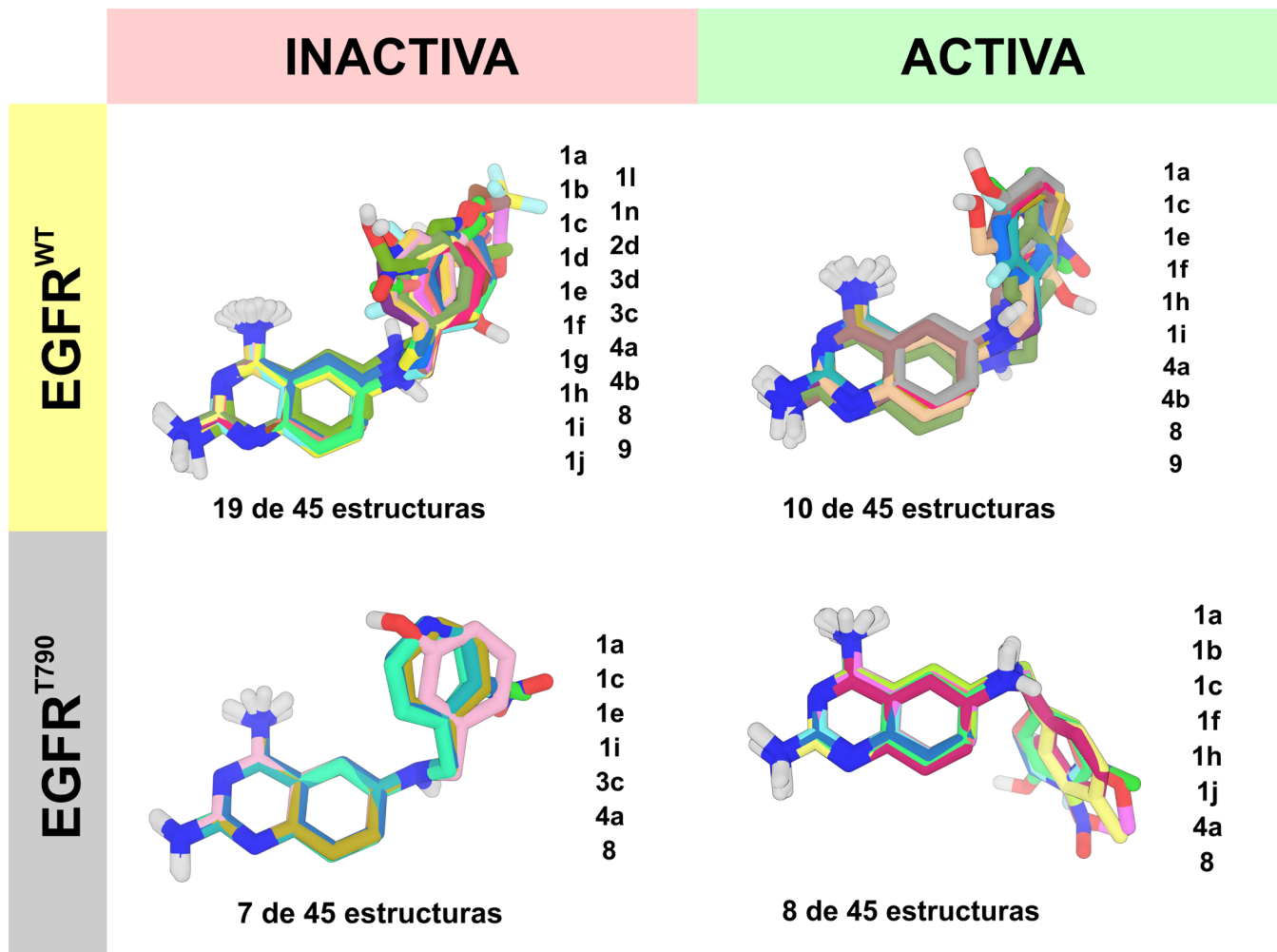


dan ilustradas en la **Figura 27**, de tal forma que quede claro que solo un pequeño grupo de moléculas fueron las que lograron generar el modo de unión propuesto.

Destaca que solo algunas moléculas de la serie 1 y análogos de estas como los compuestos **4a**, **4b**, **8** y **9** presentaron el modo de unión propuesto en EGFR<sup>WT</sup>. También, moléculas de la serie 3 y 2 tuvieron el modo de unión propuesto únicamente en la forma inactiva de EGFR. Hay que hacer notar que la rigidez en posición 6 no da buenos resultados ya que solo tres moléculas: **2d**, **3d** y **3c**, correspondientes a los grupos amida e imina, respectivamente, solo obtuvieron el modo de unión adecuado en la conformación inactiva de EGFR<sup>WT</sup>. Por otra parte, nótese de las estructuras en la conformación activa de EGFR<sup>T790M</sup> cómo la modificación en la posición 6 realiza un giro diferente a las demás estructuras. En la **Tabla 5** se muestran los códigos y las energías de unión correspondientes a las estructuras observadas en la **Figura 28**.

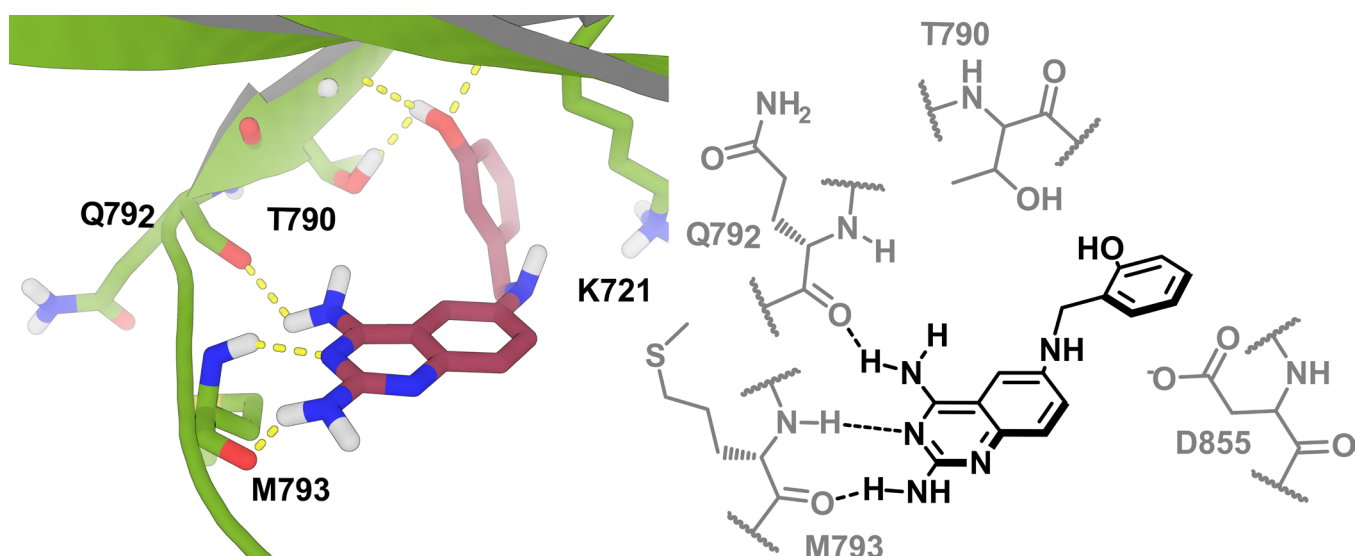
**Tabla 5.** Códigos y energías de unión de las quinazolininas acopladas al EGFR-TKD. Las celdas sin valor indican que en la otra conformación no adquirieron el modo de unión adecuado

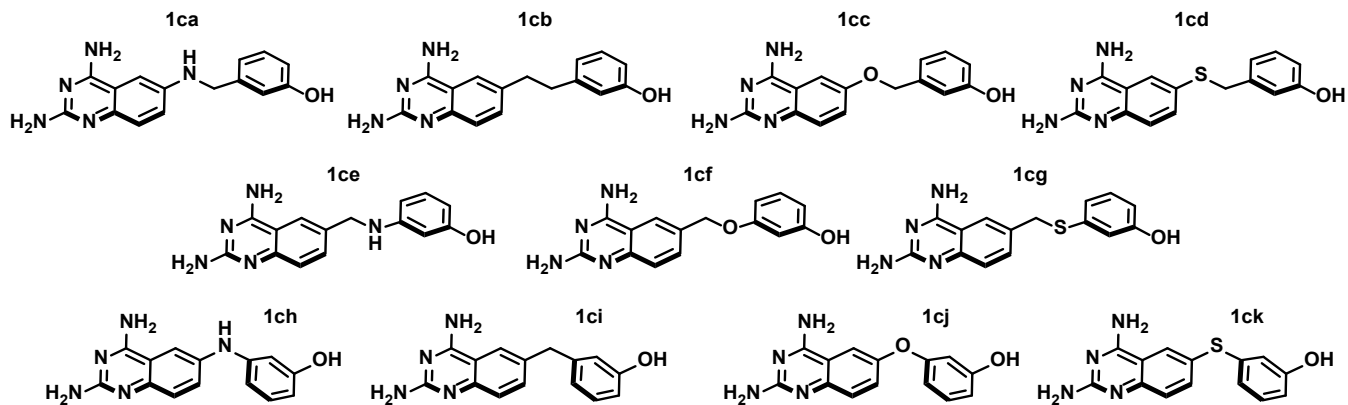
<b>ΔG de unión (kcal/mol)</b>					
Molécula	Inactiva		Activa		Promedio
	WT	T790M	WT	T790M	
<b>1a</b>	-8.9	-8.3	-7.9	-7.5	-8.15
<b>1b</b>	-9.3	-	-	-7.7	-4.25
<b>1c</b>	-9.7	-8.4	-8.7	-7.7	-8.63
<b>1d</b>	-8.9	-	-	-	-2.23
<b>1e</b>	-9.2	-8.8	-8.0	-	-6.50
<b>1f</b>	-9.2	-	-8.0	-7.9	-6.28
<b>1g</b>	-9.1	-	-	-	-2.28
<b>1h</b>	-9.6	-	-8.3	-7.8	-6.43
<b>1i</b>	-9.2	-8.7	-8.5	-	-6.60
<b>1j</b>	-10.1	-	-	-7.8	-4.48
<b>1l</b>	-9.6	-	-	-	-2.40
<b>1n</b>	-9.0	-	-	-	-2.25
<b>2d</b>	-8.5	-	-	-	-2.13
<b>3d</b>	-8.5	-	-	-	-2.13
<b>3c</b>	-8.9	-6.2	-	-	-3.78
<b>4a</b>	-8.5	-8.1	-7.5	-7.3	-7.85
<b>4b</b>	-8.9	-	-8.0	-	-4.23
<b>8</b>	-8.6	-7.7	-7.7	-7.3	-7.83
<b>9</b>	-9.8	-	-8.1	-	-5.97



**Figura 28.** Superposición de las quinazolininas acopladas al TKD de EGFR. A un lado de las estructuras se muestran los códigos correspondientes a las estructuras.

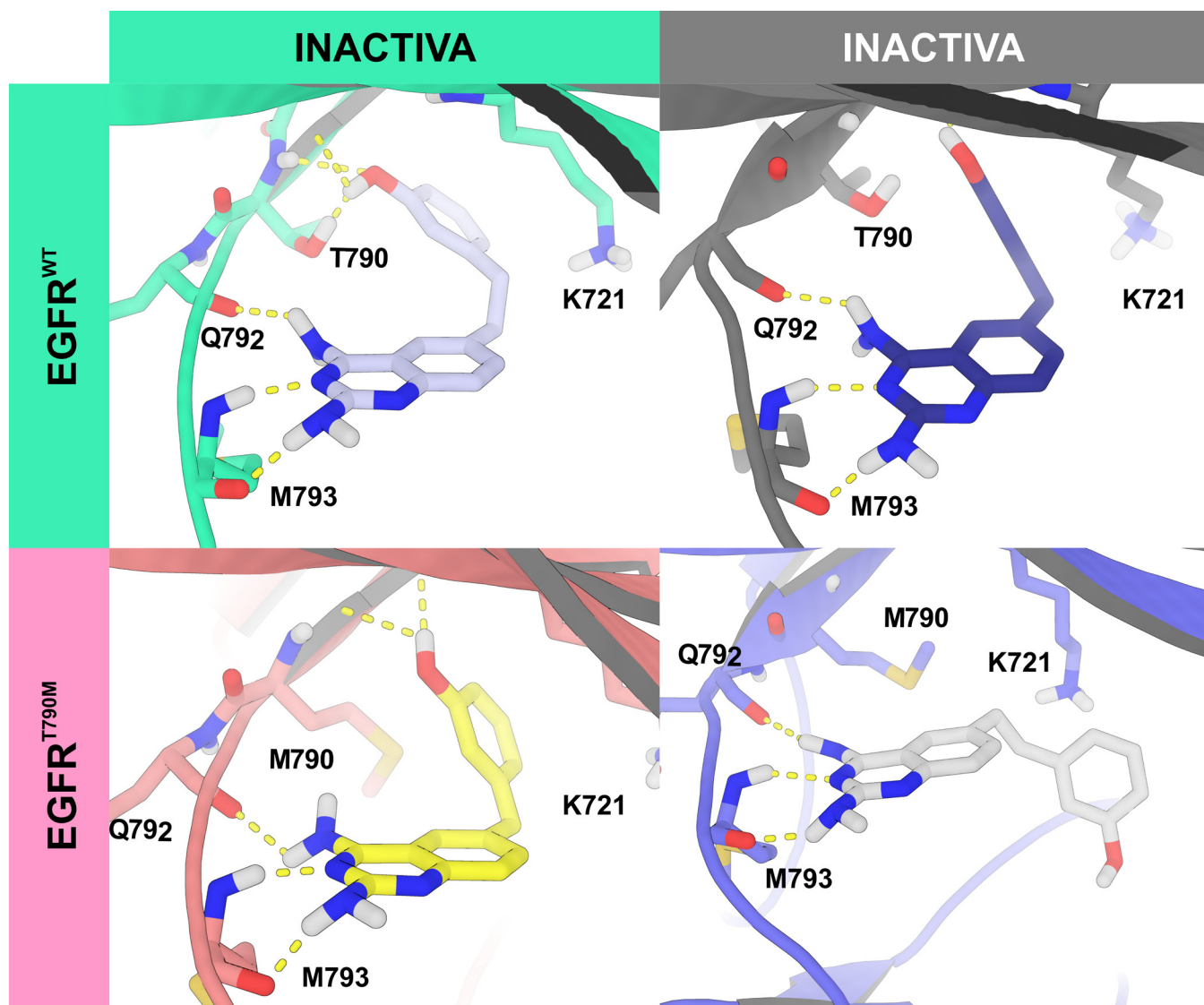
**Figura 29.** Estructura y modo de unión de **1c** en el sitio activo de EGFR





**Figura 30.** Modificaciones realizadas al compuesto **1c** para imitar a los inhibidores de primera generación.

**Figura 31.** Modos de unión de **1cb** (arriba-izquierda y abajo-derecha) y **1ci** (arriba-derecha y abajo-izquierda)



El compuesto **1j** obtuvo el mejor valor de energía de unión por EGFR<sup>WT</sup> considerando que a menor energía, mayor afinidad por el sitio activo; sin embargo, no tuvo el modo de unión adecuado en 2 de los 4 modos de EGFR posibles, ello porque las sustituciones grandes o con mucha densidad electrónica en posición 4 como trifluorometoxi (**1l**), nitro (**1j**) y halógenos (**1g**) del anillo de benceno se ven impedidas por los aminoácidos del sitio activo como la Thr790 o Met790. También, dobles sustituciones en el anillo de benceno como el que hay en los compuesto **2d**, **4b** y **3c**, provocan un cambio en el modo de unión; la excepción a esta observación es el compuesto **1h** el cual, solo se ve modificado por la conformación activa de EGFR<sup>T790M</sup>. Esto podría ser causa del tamaño de sus dos sustituyentes (flúor) en posición 2 y 3 los cuales, no tienen una gran dimensión pero se ven impedidos por la Met790. El compuesto **1c** tiene sustituido un hidroxilo en posición 3 del anillo de benceno y este no se ve afectado por la Met790; obtuvo la menor energía en la conformación activa de EGFR<sup>WT</sup>, es la segunda mejor energía en la conformación inactiva de EGFR<sup>WT</sup> y posee la mejor energía promedio de las moléculas mostradas en la [Tabla 5](#). Este compuesto fue elegido para optimizarlo y generar un compuesto con características de la primera generación de quinazolininas.

La primera modificación a este compuesto se trató de un reemplazo isostérico clásico de nitrógeno por carbono, oxígeno y azufre en la posición 6 de la quinazolinina para aumentar la flexibilidad y para evitar la Met790 en EGFR<sup>T790M</sup>. El cambio isostérico se complementó con una homología de cadena ya que, de acuerdo a lo observado en la [Figura 29](#), con el acoplamiento del compuesto **1c**, la parte del anillo de benceno se posiciona justo en el sitio donde se posiciona la parte anilina de las quinazolininas de la primera generación. Las modificaciones mencionadas se resumen en la [Figura 30](#).

En la [Tabla 6](#) se muestran las energías de unión correspondientes a cada modificación mostrada en la [Figura 30](#). Todos los compuestos mantuvieron su modo de unión dentro del sitio activo.

La [Figura 31](#) muestra los modos de unión correspondientes al mejor valor de cada variante. En el primer caso, la molécula **1cb** obtuvo la mejor energía de unión en la conformación inactiva de EGFR<sup>WT</sup> sin embargo, es un poco engañosa, ya que el hidrógeno del hidroxilo de **3cb** se encuentra muy cercano al hidroxilo de la Thr790.

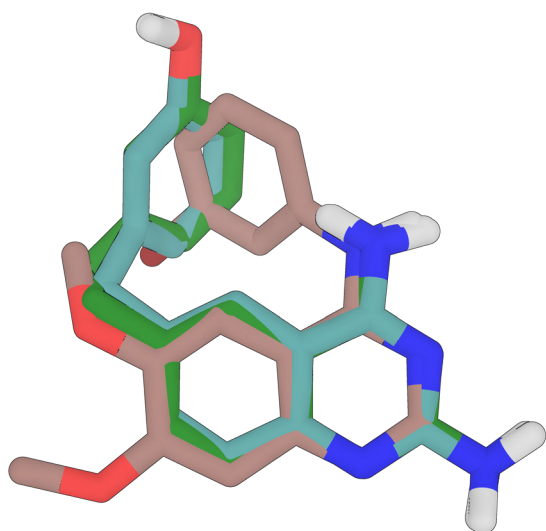
Aun así, tuvo la mejor energía en 2 de 4 variantes y también, fue la molécula con la mejor energía promedio junto con la molécula **3ci**, la cual, obtuvo la mejor energía en 2 de 4 variantes.

**Tabla 6.** Energías de unión de los compuestos obtenidos a partir de modificaciones al compuesto **1c**

<b><math>\Delta G</math> de unión (kcal/mol)</b>					
Molécula	Inactiva		Activa		Promedio
	WT	T790M	WT	T790M	
<b>1ca</b>	-9.7	-8.5	-8.6	-7.8	-8.7
<b>1cb</b>	-10.1	-8.9	-8.9	-8.1	-9.0
<b>1cc</b>	-9.6	-8.4	-8.5	-7.8	-8.6
<b>1cd</b>	-9.7	-8.4	-8.7	-7.8	-8.7
<b>1ce</b>	-9.7	-8.7	-8.6	-8.0	-8.8
<b>1cf</b>	-9.8	-8.6	-8.7	-8.0	-8.8
<b>1cg</b>	-9.7	-8.4	-8.7	-7.8	-8.7
<b>1ch</b>	-9.1	-8.7	-8.9	-7.6	-8.6
<b>1ci</b>	-9.6	-9.1	-9.2	-8.0	-9.0
<b>1cj</b>	-9.1	-8.1	-8.9	-7.6	-8.4
<b>1ck</b>	-9.2	-	-8.9	-7.7	-8.6

De acuerdo con la literatura [70], sustituyentes que tienen un grupo hidroxilo en alguna posición del anillo de benceno, pueden sufrir metabolismo de segunda fase por glucuronidación, ello generaría excreción pronta del compuesto del organismo.

A continuación, se propone el cambio de sustituyente basado en un compuesto ocupado como referencia para los ensayos de inhibición de EGFR. El compuesto **SU-5271** creado en 1995 por Rewcastle et. al. [71] se ha reportado como el compuesto con la  $K_i$  de menor valor (6 pM)[72] en ensayos de inhibición de EGFR. Un alineamiento de **SU-5271** con **1cb** y **1ci** (Figura 32) mues-



**Figura 32.** Alineamiento de QN1 (azul), **1cb** (verde) y SU-5271 (morado)

tran que las modificaciones realizadas pueden interactuar con la zona hidrofóbica del sitio activo tal como lo hacen las quinazolininas de la primera generación. Por ello, para intentar lograr los mismos valores de  $K_i$  de **SU-5271**, se realizó una modificación de hidroxilo por bromo en posición 2; ahora bien, debido a que **1cb** y **1ci** tienen los mismos modos de unión, mismos valores energéticos y misma alineación con **SU-5271**, el criterio que se consideró para elegir cualquier de los dos compuestos fue la eficiencia del ligando (LE), el cual se obtiene al dividir la energía de unión obtenida entre el número de átomos pesados. **1cb** tiene un LE de  $-0.423 \text{ kcal/mol*HA}$  (HA, son las siglas en inglés para átomos pesados = No hidrógenos); mientras que **1ci** tiene un LE de  $-0.45 \text{ kcal/mol*HA}$ . Por ello, la contribución energética que generan los átomos no pesados en **1ci** es mayor que **1cb**. Con este dato, se justifica la elección de **1ci**. A este compuesto le llamaremos **QN1**.

Una de las moléculas de este grupo de investigación, más activas contra el agente causal de la Enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*, *T.cruzi*), es aquella diseñada y sintetizada por Mendoza, César. [73] Se trata

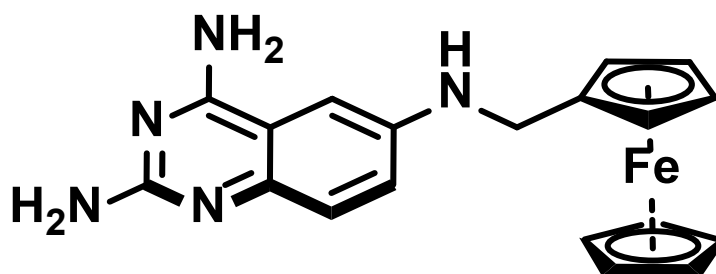


Figura 33. Estructura 2D de H2

de **H2**, una quinazolin-2,4-diamina modificada en la posición 6 con un *N*-ferrocenometil. La idea de esta molécula es inhibir la dihidrofolato reductasa de *Trypanosoma cruzi* además de provocarle estrés oxidante a través de la generación de especies reactivas de oxígeno gracias a la oxidación de ferroceno a ferricinio.

A partir de la idea de esta molécula, se planteó la modificación en posición 8 de **QN1** para incorporar un grupo funcional que genere especies reactivas y permita

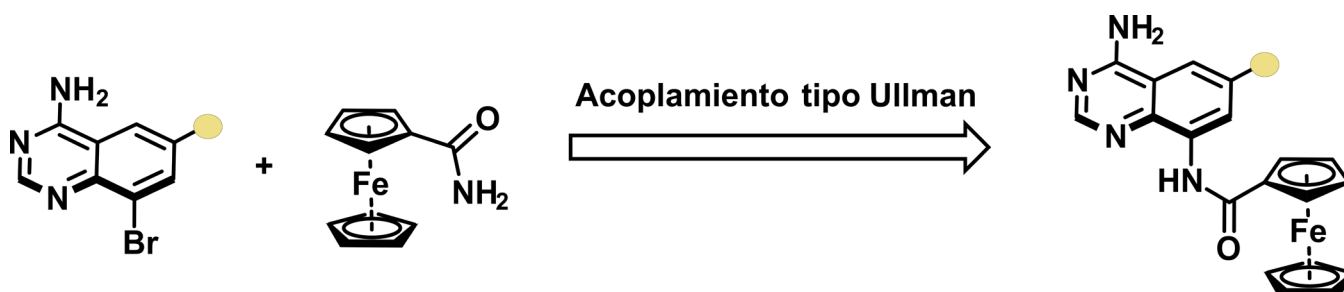
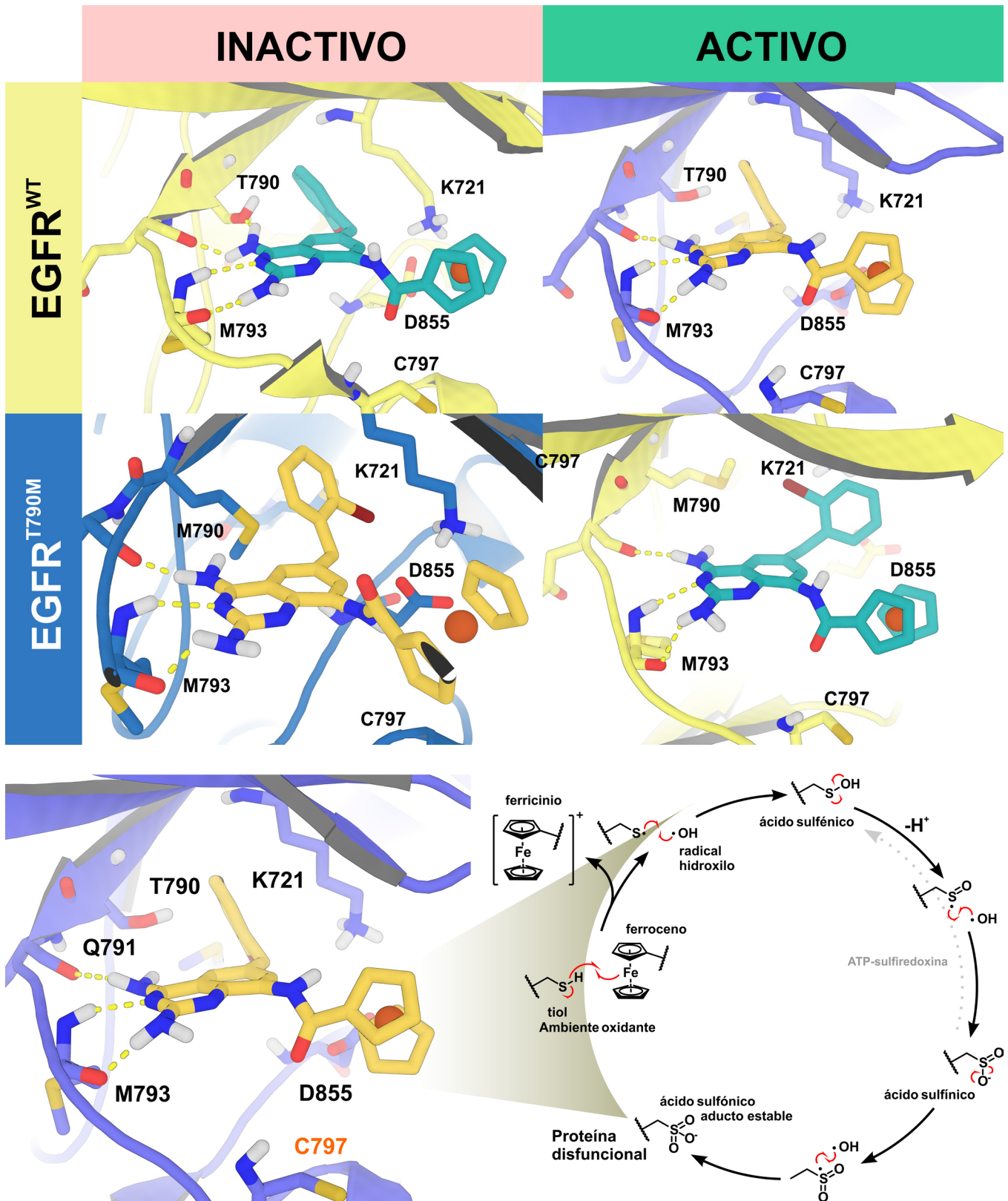


Figura 34. Acoplamiento carbono-heteroátomo tipo Ullmann

**Figura 35.** Modos de unión de **QN2** en EGFR<sup>WT</sup> activo e inactivo y EGFR<sup>T790M</sup> activo e inactivo



**Figura 36.** Mecanismo de acción propuesto para la inhibición de EGFR a través de radicales libres y EROS

la inactivación del receptor. Previamente, se ha estado trabajando con reacciones de acoplamiento carbono-heteroátomo tipo Ullmann, con buenos resultados; por ello, se decidió añadir la amida del ácido ferrocen carboxílico (ferrocenamida) de tal forma que su síntesis pueda ocurrir a través de un acoplamiento tipo Ullmann [74] como se esquematiza en la **Figura 34**.

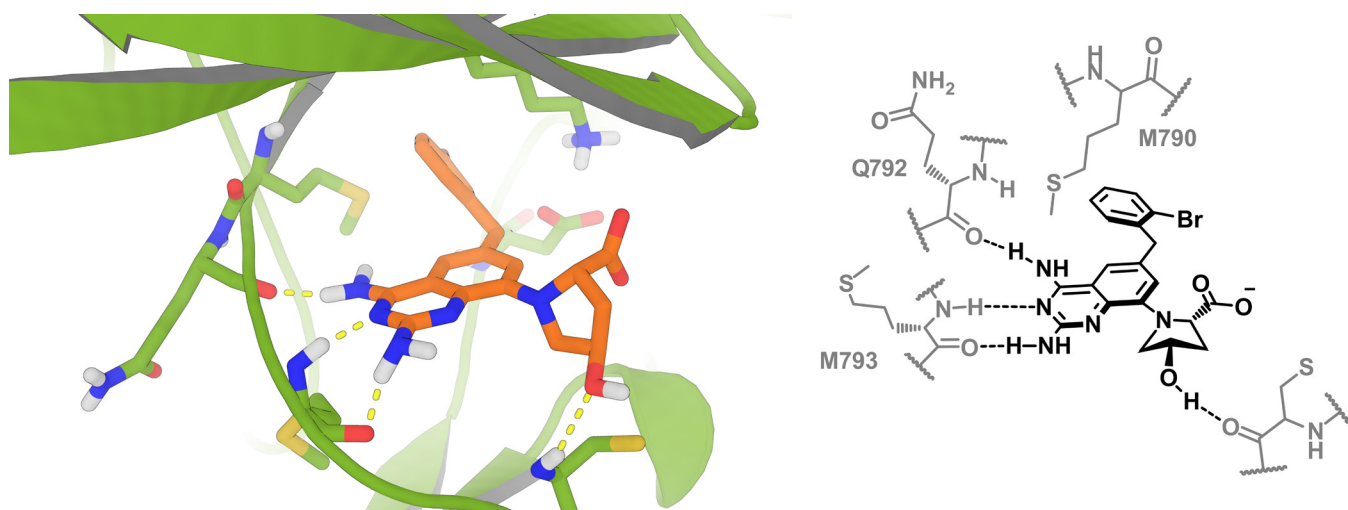
Así, de esta manera se obtiene el compuesto **QN2** al cual, se le realizaron estudios de acoplamiento molecular para verificar que el modo de unión coincida con el que se ha planteado en este trabajo. Los modos de unión se muestran en la **Figura 35**. Para este caso, se decidió ocupar nuevamente todas las conformaciones de EGFR<sup>WT</sup> y EGFR<sup>T790M</sup>, con el fin de verificar que el diseño se haya realizado correctamente. Las energías de unión de cada complejo se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Energías de unión de **QN2** en las distintas conformaciones de EGFR<sup>WT</sup> y EGFR<sup>T790M</sup>

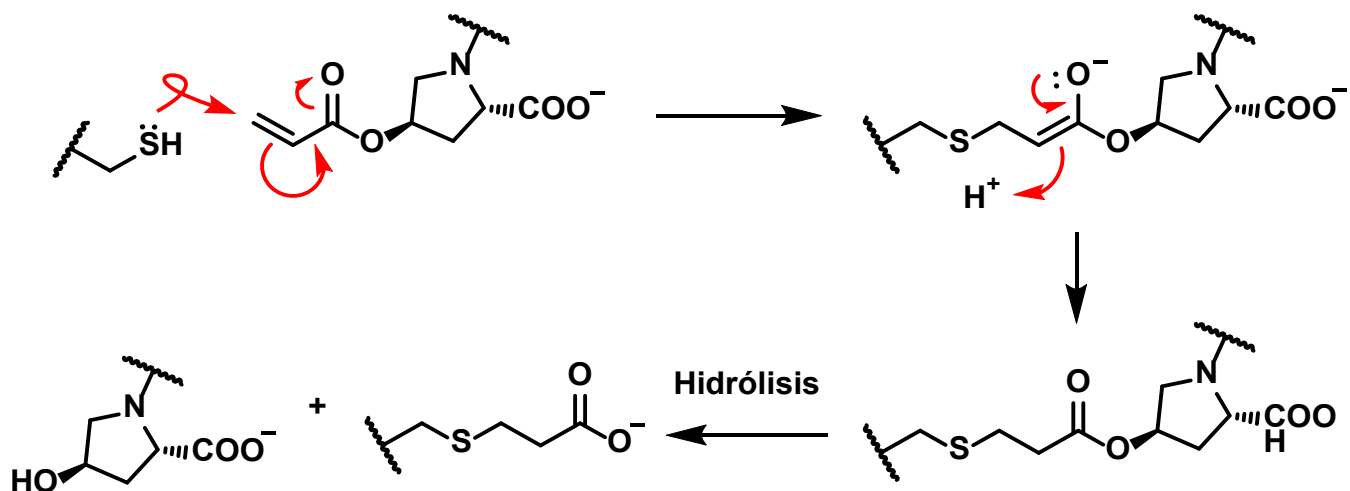
<b><math>\Delta G</math> de unión (kcal/mol)</b>				
Molécula	Inactiva		Activa	
	WT	T790M	WT	T790M
QN2	-10.80	-10.80	-9.50	-8.90

Se puede observar de la **Figura 34** que la parte de pirimidina de la quinazolina se une de la misma manera en las 4 variantes de EGFR. Tres de las cuatro conformaciones disponen al bromo del anillo de benceno hacia adentro de la parte hidrofóbica del sitio activo (posterior a la Thr790 y Met790). En EGFR<sup>T790</sup> activo, la disposición del

**Figura 37.** Modo de unión de **QN1** sustituido con trans-4-hidroxi-L-prolina







**Figura 38.** Mecanismo propuesto para inhibir EGFR con el compuesto **QN3**

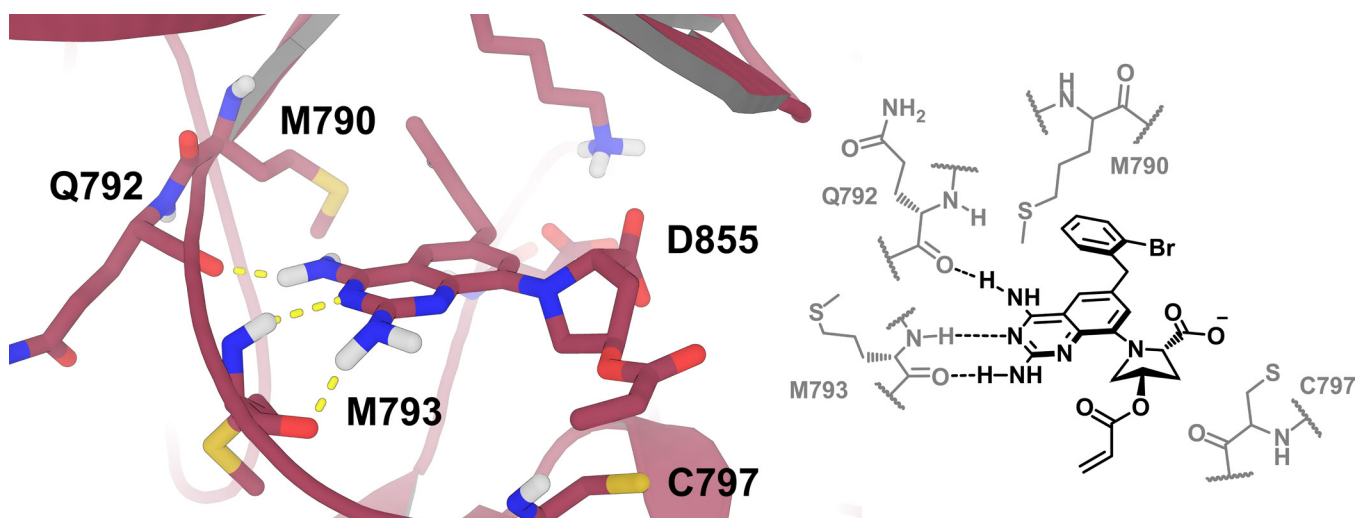
un ambiente de este tipo podría ocurrir la reacción planteada e ilustrada en la parte derecha de la [Figura 42](#).

Algunos estudios demuestran que la modificación del tiol de la cisteína por su especie oxidada, el ácido sulfónico de la cisteína, provocan disfunción y agregación en ciertas proteínas [79] e incluso, se llegan a observar en ciertas patologías como la esclerosis amiotrófica lateral.[79,80]

También, puede ocurrir que el ácido sulfínico de la cisteína se revierta gracias a la enzima sulfiredoxina dependiente de ATP.[81]

La [Tabla 7](#) continúa resaltando cómo hay una preferencia de las moléculas por la conformación inactiva, poco a poco confirmando que es necesario que la mayoría

**Figura 39.** Modo de unión de **QN1** sustituido con *trans*-4-hidroxi-L-prolina



de las moléculas se unan a esta conformación más que en la conformación activa. La energía de unión con la forma inactiva del receptor tiene el mismo valor en la silvestre y en la mutada; ello se debe a que bien, en la variante mutada pierde una interacción por puente de hidrógeno con la Thr790 pero gana una interacción con el Asp855.

Hasta aquí concluye lo realizado con la molécula **QN2**; en futuros estudios es deseable realizar la síntesis de este compuesto y comprobar este estudio teórico aquí resentedo, a través de ensayos de inhibición y cristalización del receptor; este último para comprobar la modificación al residuo de cisteína.

La necesidad de proponer nuevos mecanismos de inhibición de EGFR, resultaron en la idea de un híbrido entre las 3 generaciones de EGFR y que incluye una parte novedosa que promete ser el líder de otro grupo de moléculas.

En trabajos anteriores de este grupo de investigación, se había trabajado con modificaciones a prototipos, incrustando un aminoácido en sitios factibles para obtener cierta actividad biológica. Esto ayuda a mejorar las propiedades de solubilidad y de ingreso a las células a través de la membrana. Para este proyecto, se buscó el aminoácido adecuado y los sitios de modificación que ofrezcan la mejor solución a este problema.

A través de modelado molecular y visualización del receptor, se encontró que la trans-4-hidroxi-L-prolina era el mejor candidato a ser el sustituyente de **QN1**; esto porque es un sustituyente rígido en comparación con los otros aminoácidos y que el 4-hidroxi puede aún tener otra modificación posterior.

El acoplamiento molecular de este compuesto sobre la todas las conformaciones de EGFR posee las mismas interacciones vistas en las demás moléculas estudiadas.

Para este estudio, no fue necesario comparar energías de unión ya que solo se buscaba encontrar el modo de unión de este compuesto. Se debe notar cómo las partes que ya podemos considerar "farmacofóricas", se conservan. El sustituyente hidroxilo de la prolina genera un puente de hidrógeno con la amida de cadena principal de la Cys797 como se muestra en la **Figura 37**.

A partir de la última interacción mencionada se propuso que, debido a la cercanía de

ese hidroxilo con la cisteína, la adición de ácido acrílico como un éster, podría asemejar a este compuesto a un inhibidor de segunda o de tercera generación. La novedad de este compuesto se trata de que, al formar el aducto de Michael, el éster de la hidroxiprolina con el ácido acrílico se puede hidrolizar dejando un ácido etiltiopropiónico derivado de la cisteína; esto se ilustra en la **Figura 38**. La modificación realizada a la cisteína le conferiría inactividad a la proteína por impedimento para que ingrese ATP al sitio activo o bien, por agregación de la proteína debido a la carga negativa añadida; con ello, ya no es necesario que la quinazolina se quede en el sitio activo para inhibir a EGFR. Digamos que la quinazolina ya hizo su cometido y se fue. Esto ocurre tanto para **QN2** como para **QN3**, ambos realizan una modificación al residuo de cisteína que genera inactividad de la enzima independientemente de si la quinazolina se queda en el sitio activo o no.

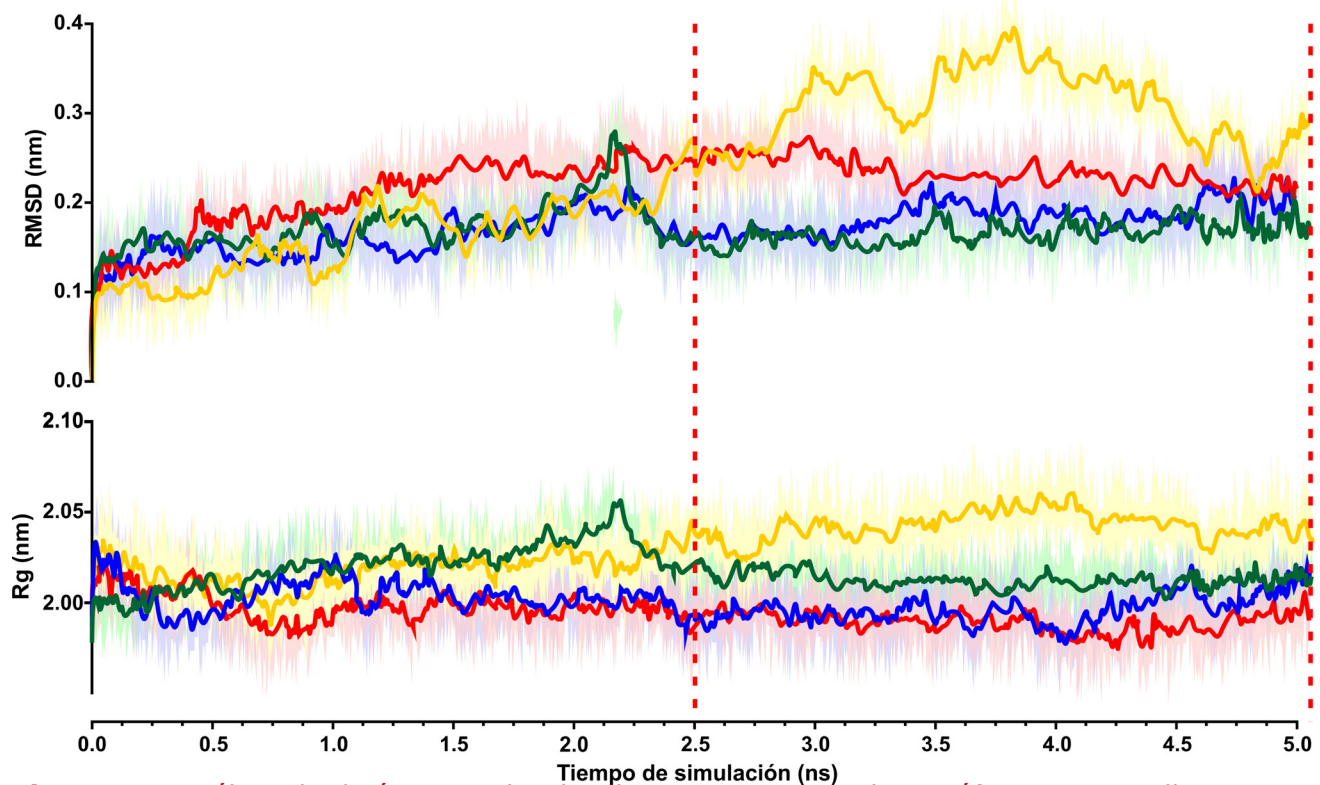
La **Figura 39** muestra el modo de unión predicho con acoplamiento molecular. Nótese la cercanía del aceptor de Michael (ácido acrílico) con la Cys797

### 7.3. ESTUDIOS DE DINÁMICA MOLECULAR

Los estudios de dinámica molecular se utilizaron para observar la estabilidad que posee la enzima en ausencia o bien, en presencia de distintos ligandos únicamente en el modelo silvestre. Se utilizaron las conformaciones y modos de unión predichos por los estudios de acoplamiento molecular.

Para estudiar el comportamiento del modelo silvestre, se calculó el RMSD por un periodo de 5 ns como se muestra en la **Figura 40**. De igual forma se determinó el radio de giro de ambos modelos para estudiar su compactación, dato que nos brinda información acerca de la apertura y cierre del sitio activo.

Podemos observar, de la **Figura 40**, la estabilidad de los modelos, cuantificados mediante el RMSD de la cadena principal; se considera que en una diferencia de RMSD menor a 2.0 Å o 0.2 nm no hay cambio significativo de la cadena proteica principal. A los 2.5 ns de tiempo de simulación se señala una separación entre los RMSD en el modelo sin ligando, esto ocurre por un desplazamiento del asa de activación y de la hélice C, como se muestra en la **Figura 47**.

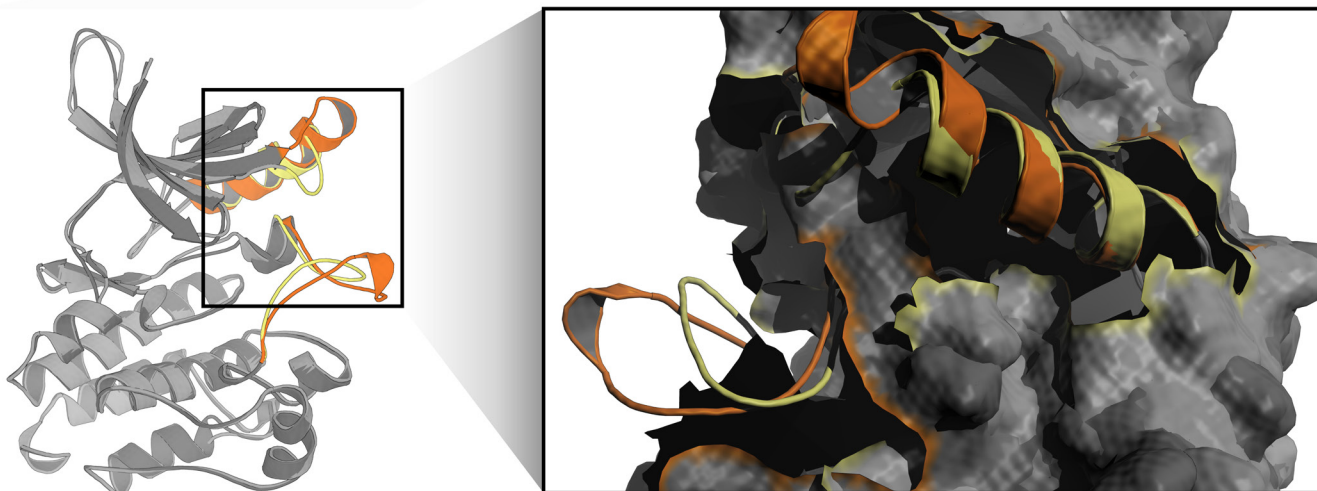
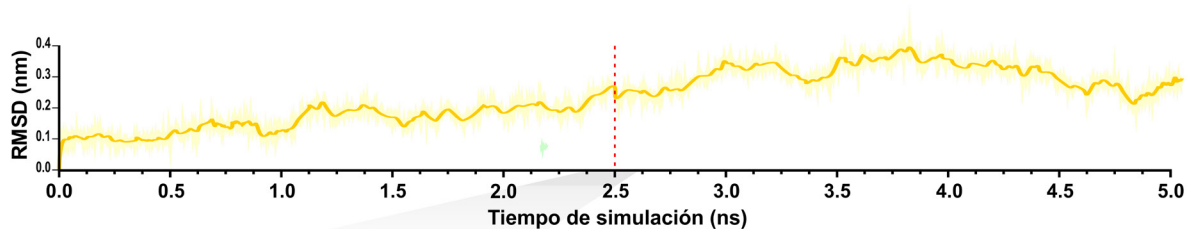


**Figura 40.** Análisis de dinámica molecular de EGFRWT; en ambos gráficos en amarillo se muestra el modelo sin ligando, en rojo se muestra el modelo en conformación activa, en azul se muestra el modelo con QN1 y en verde el modelo con erlotinib. Se muestra el RMSD de la cadena principal del dominio de cinasa de EGFR. y el Radio de giro de la cadena principal del domino de cinasa.

Aunque el tiempo de simulación no es adecuado para comprobar cambios conformacionales de las estructuras [82], el tiempo de simulación ocupado permite observar qué tan dinámico es este sistema.[64, 68, 83] Recordemos también, que los modelos ocupados en este trabajo solamente son uno de los tres dominios con los que cuenta EGFR, por lo que en futuros estudios sería necesario aumentar el tiempo de simulación, realizar un estudio con el receptor completo y ayudarse de equipo de supercómputo.

De las gráficas de la Figura 40 se puede rescatar la información acerca de la estabilidad que logra el receptor con los ligandos; dicha estabilidad de la proteína con los ligandos es incluso mayor que la de otras moléculas [68,83] estudiadas en el EGFR-TKD.

El radio de giro de la proteína es un dato que también nos brinda información sobre la apertura o cierres de sitios activos o huecos de las proteínas. En este caso, el



**Figura 41.** Desplazamiento de la hélice C y del asa de activación en el modelo de EGFR sin ligando

radio de giro va de la mano con la estabilidad de la proteína. Se observa que a 2.5 ns de tiempo de simulación, el radio de giro comienza a aumentar gradualmente. Esto quiere decir que la inestabilidad de la proteína, va de la mano con la apertura o extensión de alguna zona. En este caso, la extensión se debe a un movimiento del asa de activación.

A 2 ns de simulación, se logra observar cómo el modelo de EGFR activo con erlotinib sufre un cambio en la estabilidad. Los estudios muestran que el sustituyente etinil, desplaza la hélice C hacia atrás, creando una batalla con el receptor por regresar a su lugar como conformación activa y el erlotinib tratando de quedarse en el sitio activo. Posteriormente, se estabiliza la estructura desde 2.5 ns hasta los 5.0 ns.

El modelo con la conformación activa no tiene grandes cambios en el RMSD como muestra la línea roja, esto porque es su configuración más estable ya que ATP no se encuentra en el sitio activo y, por lo tanto, no hay activación de la actividad cinasa.

La estabilidad del receptor acoplada con la molécula **QN3** se logra apreciar en la línea azul de la **Figura 40**. El ácido carboxílico que tiene la prolina en posición 2, in-

teractúa con la Lys721 a través de un enlace iónico, esto estabiliza la conformación inactiva del receptor porque la carga positiva de la Lys721 distrae la atracción que tiene con el Asp855 de la hélice C. En la **Figura 41** se logra apreciar, en el corto tiempo de simulación, el desplazamiento de la hélice C y del asa de activación.

## 8. CONCLUSIÓN

Con los modelos de EGFR adecuados, se realizaron estudios bioinformáticos para determinar cuáles son las conformaciones que adquiere EGFR cuando se cristaliza con algún ligando. Se verificó que fármacos como erlotinib y afatinib se pueden unir a las dos conformaciones de EGFR. Complementando con estudios de acoplamiento molecular se encontró que todas las moléculas control se unen preferentemente por la conformación inactiva del receptor. Esto está relacionado con el tamaño de la cavidad modificada por dos factores, los aminoácidos de la hélice C y la Met790, responsable de una parte de la resistencia de EGFR a los inhibidores actuales. De las moléculas sintetizadas por este grupo de investigación, la mayor parte de la serie 1 se unen al EGFR-TKD en su estado inactivo, conservando las interacciones que mantienen a la adenina del ATP en el sitio activo. Estos estudios permitieron verificar que no es conveniente tener enlaces rígidos en la posición 6. La molécula **1c** tuvo los mejores valores promedio en los 4 modelos de EGFR ocupados. Mediante una modificación por isosterismo clásico, luego una homología de cadena y finalmente un diseño basado en el ligando, se obtuvo la molécula **QN1**. A partir de **QN1** se pensó en dos ideas para provocar cambios en el EGFR-TKD que permitan su inactivación: 1) Una adición de una ferrocenamida en posición 8 de la quinazolina de tal forma que se logre oxidar el residuo de Cys797 del tiol hasta el ácido sulfónico para causar agregación de esta proteína, todo esto con la molécula **QN2** y 2) La adición de *N*-4-hidroxi-L-prolina en posición 8 de la quinazolina para después formar el éster acrílico de la prolina y, con ello, generar un aceptor de Michael que pueda modificar covalentemente a la proteína sin necesidad de permanencia del ligando en el sitio activo, la molécula que permitirá verificar esta actividad biológica es **QN3**. Estudios de acoplamiento molecular determinan que esto es posible gracias a que el modo de unión de los ligandos propuestos tiene la distancia adecuada para llevar a cabo

estas modificaciones.

Finalmente, los estudios de dinámica molecular nos dieron una idea de la estabilidad EGFR<sup>WT</sup> sin ligando en la conformación activa e inactiva, con erlotinib y con **QN3**. El EGFR-TKD solo, tiene una modificación a los 2.5 ns de simulación y con erlotinib hay una modificación por desplazamiento de la hélice C gracias al grupo etinil del erlotinib. La molécula **QN3** mantiene estabilidad del EGFR-TKD gracias al ácido carboxílico de esta, que mantiene una interacción con la Lys721, importante para el regreso del asa de activación y de la hélice C a su forma inactiva.

## 9. PERSPECTIVAS

- Sintetizar las moléculas **QN2** y **QN3** de la forma propuesta anteriormente, o mediante otras técnicas que permitan obtener el compuesto puro y con buenos rendimientos.
- Evaluar la potencia de las moléculas, con un ensayo de inhibición de EGFR y en un modelo de líneas celulares con el receptor sobreexpresado.
- Purificar u obtener el dominio TKD de EGFR para cristalizarlo y determinar si existen las modificaciones propuestas sobre la Cys797. De igual forma, cocrystalizar EGFR con **QN2** y **QN3**.

## REFERENCIAS

### REFERENCIAS

1. WHO, W. H. O. WHO | Cancer. Who (2017).
2. Nelson, S. M., Ferguson, L. R. & Denny, W. A. DNA and the chromosome - Varied targets for chemotherapy. Cell and Chromosome 3, (2004).
3. America Cancer Society, A. & Society, A. C. Cancer Facts & Figures 2011. Am. Cancer Soc. 1, 1-68 (2011).
4. Tomatis, L. et al. Avoided and avoidable risks of cancer. Carcinogenesis 18, 97-105 (1997).
5. WHO. WHO | Cancer prevention and control. WHO (2014).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. The Hallmark of Cancer. Cell 60, 319-326 (2000).

7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
8. Weinstein, I. B. & Joe, A. Oncogene addiction. *Cancer Research* (2008). doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3293
9. Torre, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.* (2015). doi:10.3322/caac.21262.
10. Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E. & Adjei, A. A. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* (2008). doi:10.4065/83.5.584
11. Alberg, A. J. Cancer: Epidemiology of Lung Cancer. in *Encyclopedia of Human Nutrition* (2012). doi:10.1016/B978-0-12-375083-9.00038-6
12. Sun, S., Schiller, J. H. & Gazdar, A. F. Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nat. Rev. Cancer* (2007). doi:10.1038/nrc2190
13. Zhang, J. et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* (80-. ). (2014). doi:10.1126/science.1256930
14. Mazza, V. & Cappuzzo, F. Treating EGFR mutation resistance in non-small cell lung cancer - role of osimertinib. *Appl. Clin. Genet.* 10, 49–56 (2017).
15. National Cancer Institute. Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute. April 29 (2015).
16. Yong, W. P., Soo, R. & Innocenti, F. Pharmacogenomics and Personalized Medicines in Cancer Treatment. in *Cancer Drug Design and Discovery: Second Edition* 55–90 (2013). doi:10.1016/B978-0-12-396521-9.00002-4
17. Barker, A. & Andrews, D. Discovery and development of the anticancer agent gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. in *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development: Theory and Case Studies* (2013). doi:10.1016/B978-0-12-397176-0.00008-X
18. DB, D. & RS, H. Treatment of advanced non-small cell lung cancer in 2018. *JAMA Oncol.* (2018). doi:10.1001/jamaoncol.2017.5190
19. Schumacher, A. et al. Combined modality treatment for locally advanced non-small cell lung cancer: Preoperative chemoradiation does not result in a poorer quality of life. *Lung Cancer* (2004). doi:10.1016/j.lungcan.2003.10.004



20. Li, D. et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 27, 4702–11 (2008).
21. Copeland, R. A., Pompliano, D. L. & Meek, T. D. Drug–target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 730–739 (2006).
22. Smith, S. et al. Characterization of Covalent-Reversible EGFR Inhibitors. *ACS omega* 2, 1563–1575 (2017).
23. Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A. & Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 307–317 (2011).
24. Wang, S., Cang, S. & Liu, D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* 9, 34 (2016).
25. Xun, Q. et al. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Study of 2-Oxo-3,4-dihydropyrimido[4,5- d ]pyrimidines as New Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R) Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 61, 2353–2371 (2018).
26. Landi, L. & Cappuzzo, F. Irreversible EGFR-TKIs: dreaming perfection. *Transl. lung cancer Res.* (2013). doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2012.12.05
27. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. Blackwell Scientific Publications (1997). doi:http://dx.doi.org/10.1351/goldbook.I03352
28. Gorin, A. A., Zhurkin, V. B. & Olson, W. K. B-DNA twisting correlates with base-pair morphology. *J. Mol. Biol.* (1995). doi:10.1006/jmbi.1994.0120
29. Bierer, D. W. Bismuth subsalicylate: History, chemistry, and safety. *Rev. Infect. Dis.* (1990). doi:10.1093/clinids/12.Supplement\_1.S3
30. Jeon, K.-I., Byun, M.-S. & Jue, D.-M. Gold compound auranofin inhibits I $\kappa$ B kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKK $\beta$  subunit. *Exp. Mol. Med.* (2013). doi:10.1038/emm.2003.9
31. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed. Book (2013). doi:10.1016/j.jse.2011.03.016
32. Robinson, D. R., Wu, Y.-M. & Lin, S.-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* (2000). doi:10.1038/sj.onc.1203957
33. Ségaly, A. I., Tellez-Gabriel, M., Heymann, M. F. & Heymann, D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of Bone Oncology* (2015). doi:10.1016/j.jbo.2015.01.001

34. Davies, R. L., Grosse, V. A., Kucherlapati, R. & Bothwell, M. Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 4188–4192 (1980).
35. Carpenter, G. & Cohen, S. Epidermal Growth Factor. *Annu. Rev. Biochem.* (1979). doi:10.1146/annurev.bi.48.070179.001205
36. Gullick, W. J. et al. Expression of Epidermal Growth Factor Receptors on Human Cervical, Ovarian, and Vulval Carcinomas. *Cancer Res.* 46, 285 LP – 292 (1986).
37. Stamos, J., Sliwkowski, M. X. & Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M207135200
38. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. & Kuriyan, J. An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell* (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.05.013
39. Paez, J. G. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* (2004). doi:10.1126/science.1099314
40. Shigematsu, H. et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* (2005). doi:10.1093/jnci/dji055
41. Carey, K. D. et al. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res.* (2006). doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0453
42. Yun, C. H. et al. Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell* (2007). doi:10.1016/j.ccr.2006.12.017
43. Zhang, Z., Stiegler, a L., Boggon, T. J., Kobayashi, S. & Halmos, B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget* (2010). doi:10.18632/oncotarget.186
44. Yun, C.-H. et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2008). doi:10.1073/

pnas.0709662105

45. Inukai, M. et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* (2006). doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1951
46. UniProt Consortium, T. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* (2018). doi:10.1093/nar/gky092
47. Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.2.3. (2015).
48. Inc., C. C. G. Molecular Operating Environment (MOE), 2015.01. 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 (2015).
49. Case, D. A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* (2005). doi:10.1002/jcc.20290
50. Lovell, S. C. et al. Structure validation by Ca geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins-Structure Funct. Genet.* (2003). doi:10.1002/prot.10286
51. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. *Method. J. Comput. Chem.* (1989). doi:10.1002/jcc.540100208
52. Van Der Spoel, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* (2005). doi:10.1002/jcc.20291
53. Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D. & van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* (1995). doi:10.1016/0010-4655(95)00042-E
54. Lindahl, E., Hess, B. & van der Spoel, D. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of Molecular Modeling* (2001). doi:10.1007/S008940100045
55. Pronk, S. et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* (2013). doi:10.1093/bioinformatics/btt055
56. MacKerell, A. D., Banavali, N. & Foloppe, N. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers* (2000). doi:10.1002/1097-0282(2000)56:4<257::AID-BIP10029>3.0.CO;2-W
57. Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A. & Michielin, O. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.* (2011). doi:10.1002/jcc.21816

58. Jura, N. et al. Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment (DOI:10.1016/j.cell.2009.04.025). *Cell* (2009). doi:10.1016/j.cell.2009.07.028
59. Fabian, M. A. et al. A small molecule–kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 23, 329–336 (2005).
60. Park, J. H., Liu, Y., Lemmon, M. A. & Radhakrishnan, R. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochem. J.* 448, 417–23 (2012).
61. Eck, M. J. & Yun, C.-H. Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 559–566 (2010).
62. Aertgeerts, K. et al. Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. *J. Biol. Chem.* 286, 18756–65 (2011).
63. Sogabe, S. et al. Structure-based approach for the discovery of pyrrolo[3,2-d]pyrimidine-based EGFR T790M/L858R mutant inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* (2013). doi:10.1021/ml300327z
64. Al-Anazi, M., Al-Najjar, B. O. & Khairuddean, M. Structure-based drug design studies toward the discovery of novel chalcone derivatives as potential epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors. *Molecules* (2018). doi:10.3390/molecules23123203
65. Gajiwala, K. S. et al. Insights into the aberrant activity of mutant EGFR kinase domain and drug recognition. *Structure* (2013). doi:10.1016/j.str.2012.11.014
66. Zhou, W. et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* (2009). doi:10.1038/nature08622
67. Bhatt, P., Kumar, M. & Jha, A. Synthesis, docking and anticancer activity of azo-linked hybrids of 1,3,4-thia-/oxadiazoles with cyclic imides. *Mol. Divers.* (2018). doi:10.1007/s11030-018-9832-5
68. Yanuar, A., Chavarina, K. K. & Syahdi, R. R. Molecular Dynamic Simulation Analysis on Marine Fungi Compounds Against EGFR and VEGFR-2 Inhibitory Activity in Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Young Pharm.* (2018). doi:10.5530/jyp.2018.2s.6

69. Hanan, E. J. et al. 4-Aminoindazolyl-dihydrofuro[3,4-d]pyrimidines as non-covalent inhibitors of mutant epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* (2016). doi:10.1016/j.bmcl.2015.11.078
70. Zhang, K., Sawaya, M. R., Eisenberg, D. S. & Liao, J. C. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2008). doi:10.1073/pnas.0807157106
71. Reweastle, G. W. et al. Tyrosine Kinase Inhibitors. 5. Synthesis and Structure-Activity Relationships for 4-[(Phenylmethyl)amino]- and 4-(Phenylamino)quinazolines as Potent Adenosine 5'-Triphosphate Binding Site Inhibitors of the Tyrosine Kinase Domain of the Epidermal Growth Fa. *J. Med. Chem.* (1995). doi:10.1021/jm00018a008
72. Fedorov, O. et al. A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). doi:10.1073/pnas.0708800104
73. Mendoza-Martínez, C. et al. Antileishmanial activity of quinazoline derivatives: Synthesis, docking screens, molecular dynamic simulations and electrochemical studies. *Eur. J. Med. Chem.* 92, 314–331 (2015).
74. Jones, C. P., Anderson, K. W. & Buchwald, S. L. Sequential Cu-catalyzed amidation-base-mediated camps cyclization: A two-step synthesis of 2-aryl-4-quinolones from o-halophenones. *J. Org. Chem.* (2007). doi:10.1021/jo701384n
75. Sarsour, E. H. et al. Manganese superoxide dismutase regulates a metabolic switch during the mammalian cell cycle. *Cancer Res.* (2012). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1063
76. Pavlides, S. et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* (2009). doi:10.4161/cc.8.23.10238
77. Schumacker, P. Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. *Cancer Cell* (2015). doi:10.1016/j.ccell.2015.01.007
78. Narendhirakannan, R. T. & Hannah, M. A. C. Oxidative stress and skin cancer: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* (2013). doi:10.1007/s12291-012-0278-8
79. Fujiwara, N. et al. Oxidative modification to cysteine sulfonic acid of Cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* (2007). doi:10.1074/

jbc.M702941200

80. Valko, K. & Ciesla, L. Amyotrophic lateral sclerosis. in Progress in Medicinal Chemistry (2019). doi:10.1016/bs.pmch.2018.12.001
81. Poole, L. B. & Nelson, K. J. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. Current Opinion in Chemical Biology (2008). doi:10.1016/j.cbpa.2008.01.021
82. Karplus, M. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. Nature Structural Biology (2002). doi:10.1038/nsb0902-646
83. Reddy, P. S., Lokhande, K. B., Nagar, S., Reddy, V. D. & Swamy\*, P. S. M. and K. V. Molecular Modeling, Docking, Dynamics and Simulation of Gefitinib and its Derivatives with EGFR in Non-small Cell Lung Cancer. Current Computer-Aided Drug Design 14, 246–252 (2018).
84. Avendaño, C. & Menéndez, J. C. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs: Second Edition. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs: Second Edition (2015). doi:10.1016/C2012-0-03140-7

# ANEXO I. VALIDACION DE LAS ESTRUCTURAS PROTEICAS OCUPADAS EN ACOPLAMIENTO Y DINÁMICA MOLECULAR

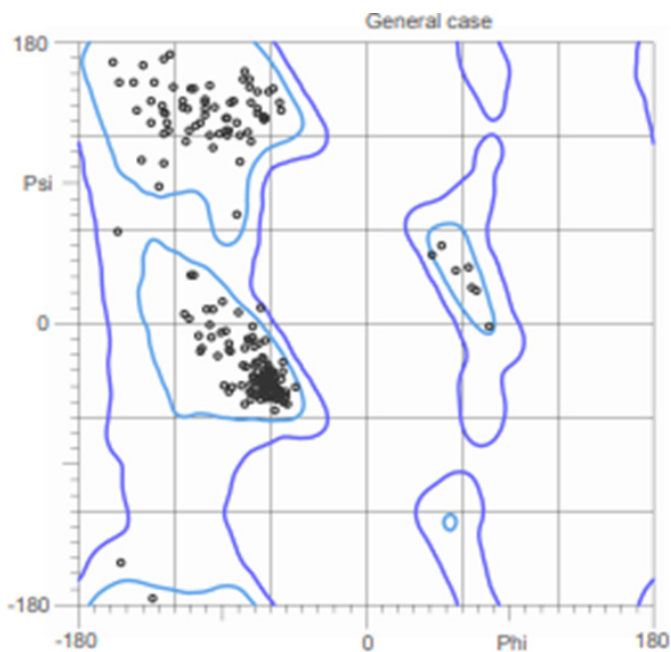


Figura A 1. Gráfico de Ramachandran de  
4HJO

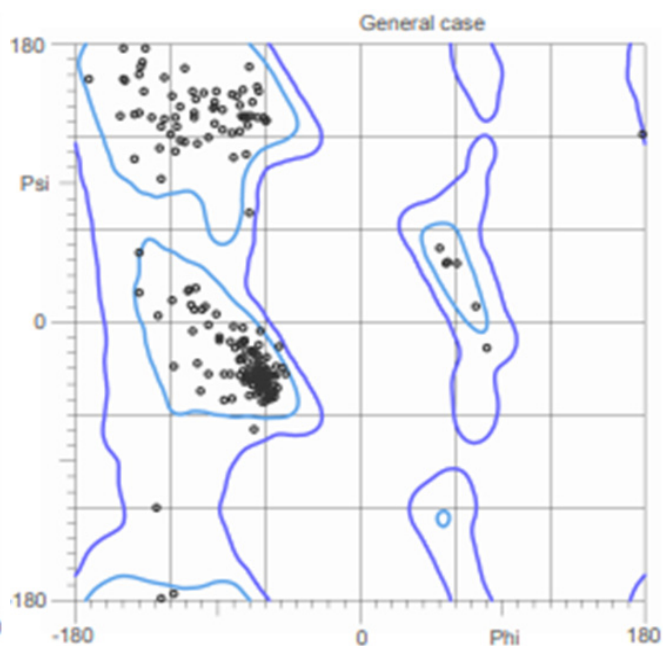


Figura A 2. Gráfico de Ramachandran de  
4I24

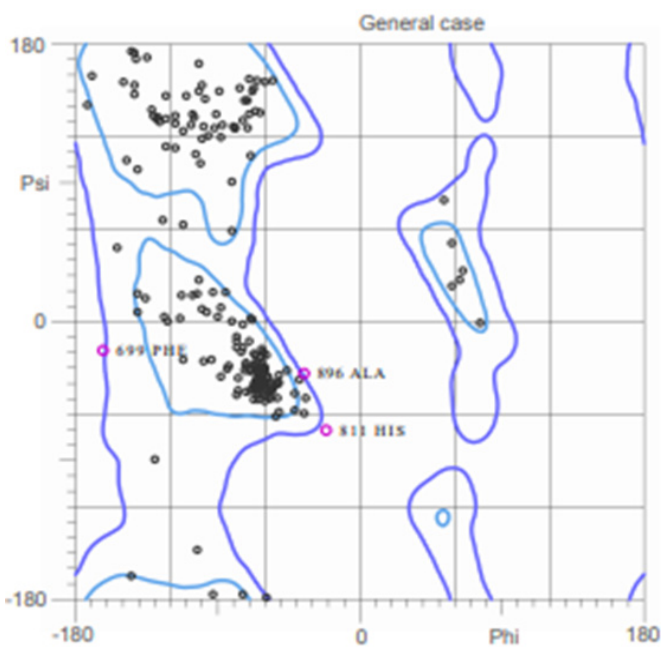


Figura A 1. Gráfico de Ramachandran de  
1M17

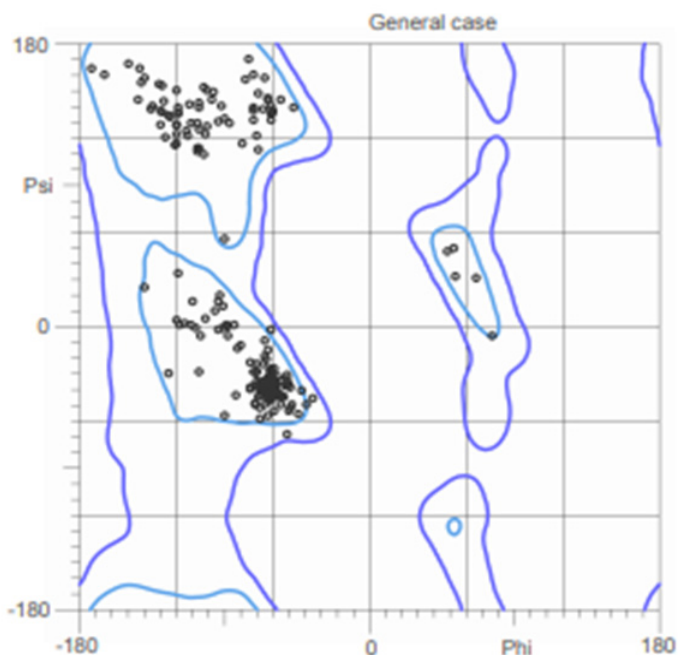


Figura A 1. Gráfico de Ramachandran de  
3IKA

## ANEXO II. SIMILITUD DE LAS ESTRUCTURAS OCUPADAS EN LOS RESULTADOS BIOINFORMÁTICOS

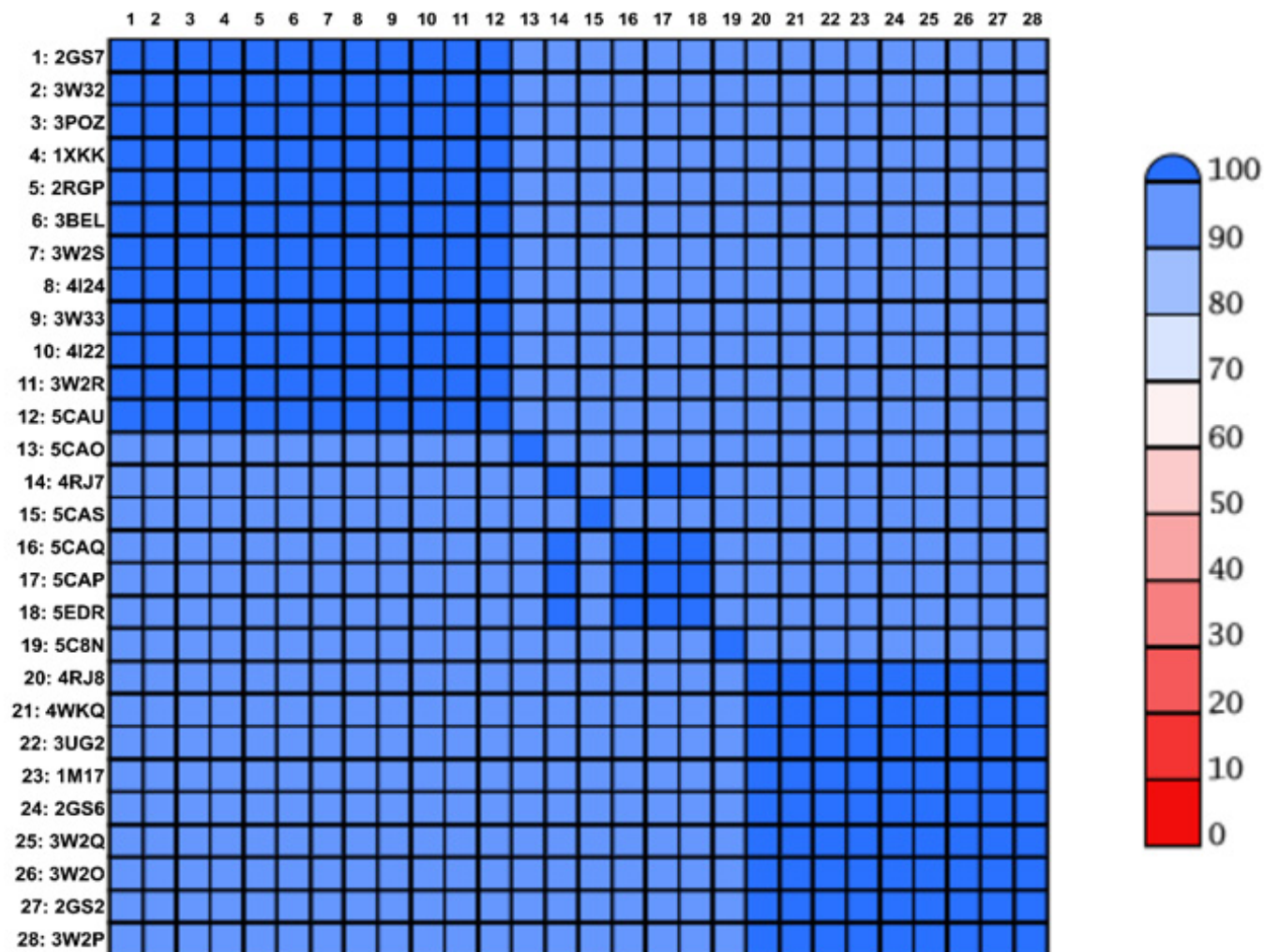


Figura A 3. Matriz de similitud de las secuencias de las estructuras ocupadas. Colores rojos indican cercanía al 0% de similitud; colores azules indican cercanía al 100% de similitud



