

Screening Virtual, Diseño y Evaluación *in silico* de Ligandos Duales de Proteínas ABC y de EGFR para el Tratamiento de Cáncer Multifármaco-Resistente

Astrid Bravo Jiménez, Carolina Gómez Suarez, Héctor González Álvarez, Liliana Jiménez Sánchez, Dante Juan Guadarrama, Marco A. Loza Mejía

Resumen- El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado de células y constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo un problema de salud pública especialmente en países con menor grado de desarrollo. Uno de los problemas que se presenta durante el tratamiento es la generación de resistencia. Uno de los mecanismos de resistencia es mediado por las proteínas ABC (ATP-binding-casette) que causan reflujo de fármacos, impidiendo que éstos lleguen a su sitio de acción. En el presente trabajo se presenta el diseño y la evaluación *in silico* de ligandos del receptor EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) y de las proteínas ABC, con la intención que el fármaco pueda de forma dual disminuir el reflujo de fármacos y la proliferación celular de forma simultánea. Se identificaron cuatro moléculas con mayor afinidad teórica hacia ambas dianas biológicas en comparación a ligandos conocidos de las mismas y con un buen perfil ADME/Tox *in silico* que las convierte en candidatas para estudios posteriores.

I. INTRODUCCIÓN

INCIDENCIA

El cáncer constituye un grave problema de salud pública ya que es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que en el año 2012 hubo 14.1 millones de nuevos casos, 8.2 millones de muertes debidas a alguno de los tipos de cáncer y que alrededor de 32.6 millones de personas vivían con este padecimiento con una prevalencia mayor a 5 años. De estos datos el 57% de los nuevos casos de cáncer, 65% de las muertes y 48% de los casos con prevalencia mayor a 5 años fueron reportados en países de tercer mundo. Se calcula que los casos nuevos reportados aumentarán hasta 22 millones dentro de las próximas 2 décadas. [1]

El cáncer está definido como un conjunto de enfermedades caracterizado por un crecimiento anormal de las células causado por cambios en la expresión de genes que llevan a un desequilibrio en la regulación de la proliferación y muerte celular, finalmente evolucionando hasta obtener una población de células que puede invadir tejidos conjuntos y producir metástasis a órganos y tejidos distantes, causando morbilidad

Astrid Bravo-Jiménez, Carolina Gómez-Suarez, Héctor González-Álvarez, Liliana Jiménez-Sánchez, Dante Juan-Guadarrama pertenecen a la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas y realizaron el proyecto dentro del curso de Farmacología Molecular (Email: elsa.gomez@lasallistas.org.mx).

El proyecto fue asesorado por Marco A. Loza-Mejía

significativa y en caso de no someterse a un tratamiento posiblemente provocar la muerte del huésped. [2]

SIGNOS Y SÍNTOMAS

La carcinogénesis, es la transformación progresiva de células normales a derivados altamente malignos, cuyas alteraciones se originan en el material genético. Las alteraciones genéticas se denominan oncogenes y su mutación es de tipo dominante, esto quiere decir, que solo basta que un alelo sufra una mutación para que la proteína que codifica, gane funcionalidad.[1]

De forma general el cáncer tiene 8 características: 1) Independencia de señales de crecimiento, 2) Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento, 3) Invasividad y metástasis, 4) Evasión de apoptosis, 5) Potencial ilimitado de replicación, 6) Angiogénesis sostenida, 7) Reprogramación del metabolismo energético y 8) Evasión de la destrucción inmune. [1]

TRATAMIENTO

La American Cancer Society clasifica los tratamientos para cáncer de mama en quirúrgicos, radioterapia y farmacológico. Dentro de esta última categoría, a su vez los divide en quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia. Las pautas de tratamiento típicos se basan en el tipo de cáncer, su etapa y cualquier situación especial como presencia de metástasis, embarazo, etc.[2]

La quimioterapia se refiere al uso de fármacos para eliminar el número de células tumorales. El mecanismo general de este tipo de fármacos suele afectar la proliferación celular. El gran problema de este tipo de tratamientos es la escasa selectividad que tiene contra otras células de rápida proliferación, lo que se refleja en una disminución en la calidad de vida del paciente. Suelen emplearse en casos donde ya hay metástasis y en algunos casos siguen siendo fármacos de primera línea.

En el caso de la inmunoterapia, solía incluir únicamente aquellos tratamientos encaminados a incrementar la respuesta inmune contra el tumor. Sin embargo, actualmente incluye el uso de anticuerpos monoclonales contra algún receptor, los cuales pueden inhibir la actividad de este receptor o activar los sistemas de defensa (como el sistema de complemento) para disminuir el crecimiento tumoral.

En los fármacos de terapia dirigida se emplea alguna molécula que afecta directamente una de las vías de señalización que se encuentren sobreexpresadas en el tumor, normalmente vías de señalización que están involucradas con factores de crecimiento. Normalmente suelen tener menores efectos adversos, sin embargo, dependen de una rápida detección e identificación oportuna de las vías que están sobreexpresadas.

Uno de los ejemplos más notables de este tipo de fármacos son los inhibidores de tirosín cinasas (TKIs, *tyrosine kinase inhibitors*). Este tipo de ligandos suelen unirse a la región catalítica o a una región alostérica del sitio de unión del ATP, molécula que aporta los grupos fosfato para iniciar la reacción de fosforilación. Hasta el 2015 se habían aprobado 26 TKIs distintos algunos de los cuales se enlistan en la Tabla 1. [2]

Tabla 1. Algunos TKIs usados en la clínica y su indicación terapéutica.[2]

Fármaco	Tipo de cáncer al que va dirigido
Afatinib	Cáncer de pulmón NSCLC (<i>non-small-cell lung cancer</i>)
Axitinib	Carcinoma renal
Bosutinib	Leucemia mieloide crónica, Cromosoma Filadelfia positivo
Cabozantinib	Cáncer tiroideo
Crizotinib	Cáncer de pulmón NSCLC (<i>non-small-cell lung cancer</i>) ALK positivo
Dabrafenib	Melanoma BRAF positivo
Dasatinib	Leucemia mieloide crónica, Cromosoma Filadelfia positivo
Erlotinib	Cáncer de pulmón NSCLC (<i>non-small-cell lung cancer</i>), cáncer pancreático en combinación con antimetabolitos
Gefitinib	Cáncer de pulmón NSCLC (<i>non-small-cell lung cancer</i>),
Ibrutinib	Leucemia linfocítica crónica
Imatinib	Leucemia mieloide crónica, Cromosoma Filadelfia positivo
Lapatinib	Cáncer de mama HER2 positivo
Lenvatinib	Cáncer tiroideo
Palbociclib	Cáncer de mama HER2 negativo, ER positivo
Pazopanib	Cáncer renal avanzado, sarcomas
Ponatinib	Leucemia mieloide crónica, Cromosoma Filadelfia positivo
Regorafenib	Cáncer gastrointestinal
Ruxolitinib	Mielofibrosis
Sorafenib	Cáncer renal
Sunitinib	Cáncer renal
Trametinib	Melanoma BRAF mutado positivo
Vandetanib	Cáncer tiroideo
Vemurafenib	Melanoma metastásico

Sin embargo, uno de los problemas principales de cualquier tratamiento enfocado a cáncer es la generación de resistencia lo cual puede conducir a una disminución del éxito terapéutico. Uno de los mecanismos principales de la generación de resistencia es el reflujo de fármacos mediado por los transportadores ABC (*ATP-Binding-Cassette*) que a continuación se describen.

TRANSPORTADORES ABC

La multi-resistencia a los fármacos es un fenómeno que causa una resistencia simultánea a diversos tipos de fármacos. El mecanismo principal por el cual se desarrolla la multi-resistencia es mediante la sobreexpresión de los transportadores de fármaco, también llamados ATP binding cassette o transportadores ABC.[3], [5]

Los transportadores ABC son la familia más grande de proteínas transmembranales que se encuentran en todos los organismos vivos. Estos transportadores son responsables del movimiento ATP-dependiente de una gran variedad de xenobióticos, lípidos y productos metabólicos a través de la membrana plasmática y la membrana intracelular hacia el medio extracelular. En células procariotas se han desarrollado transportadores ABC importadores y exportadoras, mientras que en células eucariotas solamente se han desarrollado transportadores ABC exportadoras.[3], [5]

En humanos, la mayoría de los transportadores ABC son transportadores activos, es decir, que mueven solutos a través de la membrana contra gradiente mediante la unión e hidrólisis de ATP.[3], [4]

El prototipo de los transportadores ABC se encuentra compuesto de dos dominios transmembranales y dos dominios de unión a nucleótidos. Algunos transportadores presentes en los humanos presentan un dominio transmembranal adicional. En la actualidad, se han identificado 48 miembros de los transportadores ABC, los cuales se han categorizado en 7 familias como ABC A-G, 16 transportadores ABC se encuentran relacionados con enfermedades en el humano, entre los cuales destacan los transportadores ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3 y ABCG2, estos transportadores se encuentran implicados principalmente en la multi-resistencia a fármacos en diferentes líneas de cáncer (pulmones, mama y páncreas).[3], [5]

En el presente estudio se pretende el diseño de moléculas con acción dual: por una parte actuar como inhibidores de tirosín cinasa para disminuir la proliferación celular y que por otra parte que sean antagonistas de las proteínas ABC para disminuir el reflujo de fármacos, lo cual pueda minimizar las probabilidades de generación de resistencia.

ELECCIÓN DE LAS DIANA BIOLÓGICAS ESPECÍFICAS

Los principales transportadores ABC que se sobre expresan en esta patología son los transportadores ABCB1, ABCC1, ABCC2 Y ABCC3. Entre ellos se seleccionó la proteína ABCC1, ya que entre los transportadores investigados se encontró que ésta es una de las proteínas con mayor relación a la resistencia de fármacos.

La tirosina cinasa seleccionada para llevar a cabo el estudio *in silico* fue aquella relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), debido a que ésta es una proteína que se encuentra implicada de forma determinante en varios tipos de cáncer, incluyendo mama, renal y pulmonar. Estudios recientes indican que todas las moléculas que inhiben a este receptor, interaccionan particularmente en el sitio alostérico donde se une normalmente el ATP para su activación.[6]

II. METODOLOGÍA

Para la selección de los ligandos iniciales se realizó a través de un estudio de *screening virtual* empleando la base de datos de ZINC.[7] Para ello, se descargaron aquellas moléculas que cumplieran el criterio *drug-like* resultando en una base de datos de 1.5 millones de moléculas. Con esta base de datos se realizaron los estudios de acoplamiento molecular usando el programa Molegro 6.0.1 con las estructuras tridimensionales descargadas del Protein Data Bank [8] de las proteínas ABC (código PDB: 5UJA) y de EGFR (código PDB: 4ZAU). La metodología empleada para el estudio fue la sugerida por el fabricante empleando un protocolo de búsqueda de algoritmo genético con 50 generaciones y 2500 iteraciones. El programa arroja valores de puntaje (*Rerank score*) que se relacionan con la potencial afinidad con el sitio de búsqueda, valores más negativos se asocian a una mayor afinidad.

La molécula ZINC91695404 (Figura 1) presentó valores de -110.050 en la proteína ABC transportadora y -106.469 en la proteína EGFR siendo la que presentó valores menores en ambas proteínas por lo que se seleccionó como molécula inicial. El hallazgo de esta molécula como potencial ligando resulta de interés ya que los inhibidores conocidos de EGFR típicamente son moléculas derivadas de quinazolina y quinolina, por lo que este sistema de 3 sistemas heterocíclicos no fusionados, podría constituir una nueva estructura base o *core* (Figura 1) para el diseño de nuevos TKIs.

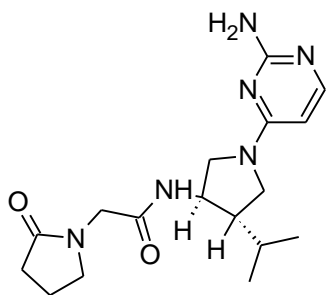


Figura 1. Molécula ZINC91695404

A esta molécula se le realizaron modificaciones tradicionales en la Química Farmacéutica para generar una nueva base de datos. Las moléculas de esta base de datos se construyeron usando el software ChemSketch de ACD Labs 10.0 y se almacenaron en formato mol. Esta base de datos se evaluó por métodos quimioinformáticos y nuevamente por acoplamiento molecular empleando Molegro 6.0.1 y usando el protocolo sugerido por el fabricante como se mencionó previamente.

Para el estudio quimioinformático se decidió hacer la determinación del perfil ADME/Tox *in silico*, mediante el programa ADMETSar.[9] Este programa realiza la predicción de algunos aspectos asociados con el perfil farmacocinético (absorción oral, capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, metabolismo por CYP450) y toxicológico (toxicidad aguda en rata y otras especies, unión a canales iónicos cardiacos).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en el estudio de acoplamiento molecular de la base de datos de modificaciones generada, se identificaron cuatro moléculas como potenciales inhibidores duales de transportadores ABC y tirosina cinasa. Las moléculas identificadas presentaron valores de score menores que el ligando original de la base de datos de ZINC con una mejora del 13.57% en la proteína transportadora ABC y de 28.5% en EGFR.

De las mejores moléculas encontradas se realizó un promedio de afinidad para identificar aquellas que pudieran actuar como inhibidores duales La Tabla 2 muestra los valores de las 4 moléculas (ver estructura en la Figura 2) que tuvieron menores valores de Rerank score. Estas cuatro moléculas mostraron valores menores de score que ligandos conocidos de ambas proteínas, lo cual sugiere que serían moléculas con alta afinidad a ambas dianas biológicas. Las Figuras 3 a 6 muestran el modo de unión de la molécula D03 y D10 a los sitios de búsqueda en ambos receptores. El modo de unión fue semejante en las otras cuatro moléculas con mayor afinidad.

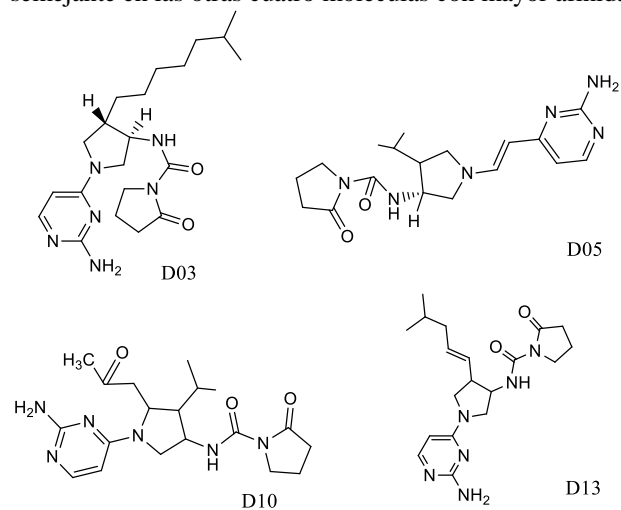


Figura 2. Estructura de las moléculas D03, D05, D10 y D13

Tabla 2. Resultados del estudio de acoplamiento molecular.

Ligando	Rerank score ABC	Rerank score EGFR	Promedio
D10	-120.6	-127.2	-123.9
D13	-114.5	-132.0	-123.3
D03	-122.6	-120.9	-121.8
D05	-115.6	-126.1	-120.9
Ligandos de referencia	-106.0	-94.5	No aplica

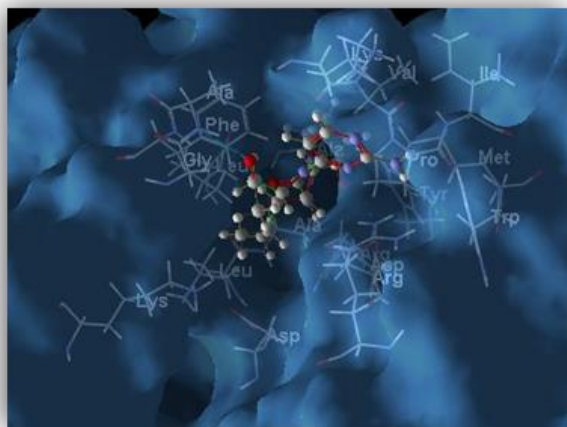


Figura 3. Interacción de la molécula D10 en el sitio alostérico al de unión al ATP del EGFR.

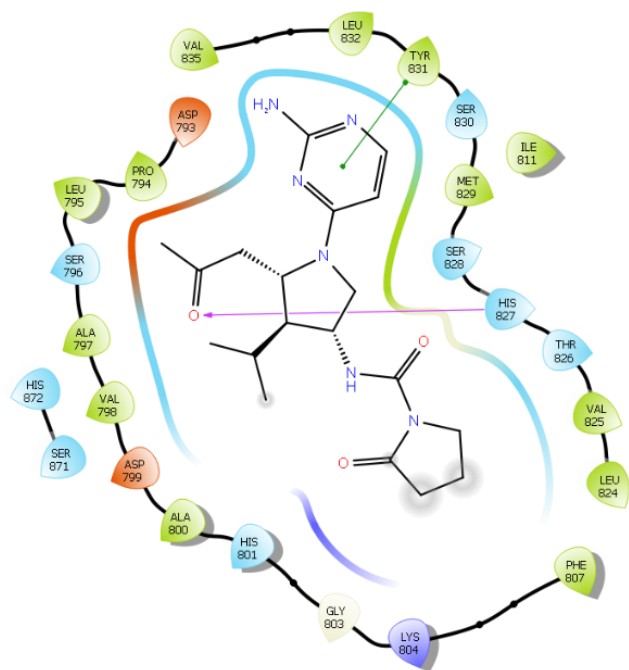


Figura 4. Interacción de la molécula D10 en el sitio alostérico al de unión al ATP del EGFR.

Una parte importante en el desarrollo de moléculas es la consideración de los aspectos farmacocinéticos y

toxicológicos. La predicción *in silico* realizada en el programa ADMETSar de las 4 moléculas evaluadas se muestra en la Tabla 3. Como se aprecia en esta tabla las cuatro moléculas candidato tendrían alta absorción intestinal vía oral, sin riesgo carcinogénico, pertenecerían a la clase III de riesgo de toxicidad y con una toxicidad prácticamente nula en ratas dado el elevado valor pronosticado para la dosis letal 50.

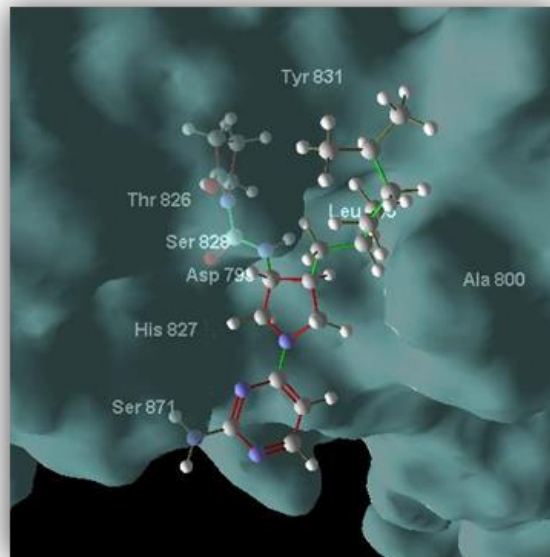


Figura 5. Interacción de la molécula D03 en el sitio de unión del transportador ABC.

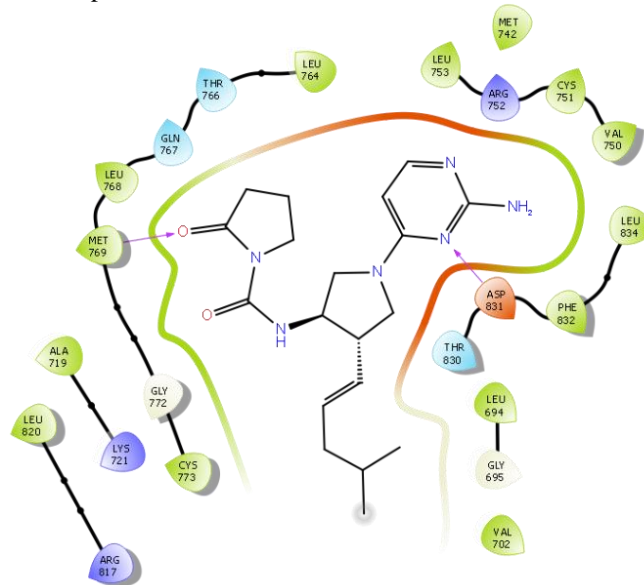


Figura 6. Interacción de la molécula D03 en el sitio de unión del transportador ABC.

De estos estudios se concluye que las cuatro moléculas con mejor perfil constituyen un punto de partida atractivo para el desarrollo de TKIs con actividad sobre las proteínas transportadoras ABC. En la figura 4 se observa que el ligando D10 tiene 2 tipos de interacciones importantes con el sitio alostérico del receptor EGFR, la primera de ellas es la formación de un puente de hidrógeno con la histidina 827 y la

segunda de ellas pertenece a una interacción π - π de la tirosina 831 con el anillo de pirimidina. En cuanto a las interacciones del ligando D03 con el sitio de unión del transportador ABC, se observa la formación de 2 interacciones de puente de hidrógeno, el primero con la metionina 769 y el segundo con el aspartato 831. Por lo tanto, el mecanismo dual que se propone permitiría reducir la proliferación celular al bloquear las vías de señalización del factor de crecimiento epidermal y por otra parte disminuir el reflujo de fármacos lo cual podría ayudar particularmente en tratamientos donde se administra más de un fármaco antitumoral.

Tabla 3. Principales resultados obtenidos en el estudio *in silico* realizado con ADMETSar

Ligando	Absorción oral	Riesgo de carcinogenicidad	Toxicidad aguda en ratas (LD50, g/kg)
D03			
D05			
D10	Alta >90%	Sin riesgo	>200
D13			

IV. CONCLUSIONES

En el presente estudio se identificaron, mediante acoplamiento molecular, cuatro ligandos a las proteínas EGFR y ABCC1, los cuales podrían ser inhibidores duales de la proliferación celular y el reflujo de fármacos. Estas cuatro moléculas no solo mostraron mayor afinidad teórica en comparación a ligandos conocidos de ambas proteínas, sino también un buen perfil ADME/Tox *in silico*.

La elección de la estructura de partida se hizo mediante un *screening virtual* usando la base de datos de ZINC, este ligando difiere estructuralmente de los ligandos típicos de EGFR por lo que puede constituirse como un nuevo *core* para el desarrollo de nuevos TKIs.

V. REFERENCIAS

- [1] H. M. Lee and A. Moon, "Amygdalin Regulates Apoptosis and Adhesion in Hs578T Triple-Negative Breast Cancer Cells," *Biomol. Ther. (Seoul)*, vol. 24, no. 1, pp. 62–6, Jan. 2016.
- [2] H. Gharwan and H. Groninger, "Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 13, no. 4, pp. 209–227, Dec. 2015.
- [3] V. Němcová-Fürstová *et al.*, "Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 310, pp. 215–228, 2016.
- [4] M. Falasca and K. J. Linton, "Investigational ABC transporter inhibitors," *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 21, no. 5, pp. 657–666, May 2012.
- [5] S. A. Balaji, N. Udupa, M. R. Chamallamudi, V. Gupta, and A. Rangarajan, "Role of the Drug Transporter ABCC3 in Breast Cancer Chemoresistance.," *PLoS One*, vol. 11, no. 5, p. e0155013, 2016.
- [6] M. K. Paul and A. K. Mukhopadhyay, "Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer.," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 101–115, 2004.
- [7] J. J. Irwin, T. Sterling, M. M. Mysinger, E. S. Bolstad, and R. G. Coleman, "ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 7, pp. 1757–1768, Jul. 2012.
- [8] H. M. Berman *et al.*, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, Jan. 2000.
- [9] F. Cheng *et al.*, "admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 11, pp. 3099–3105, Nov. 2012.
- [10] "Monoclonal antibodies for the treatment of cancer," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 3–13, Feb. 2012.
- [11] "Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy," *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 2, pp. 288–297, Jan. 2014.
- [12] "Third generation EGFR TKIs in EGFR-mutated NSCLC: Where are we now and where are we going," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 117, pp. 38–47, Sep. 2017.
- [13] "Comprehensive Analysis of EGFR-Mutant Abundance and Its Effect on Efficacy of EGFR TKIs in Advanced NSCLC with EGFR Mutations," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 9, pp. 1388–1397, Sep. 2017.