

## Optimització in silico de compostos antitumorals

Laura Delgado Soler

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

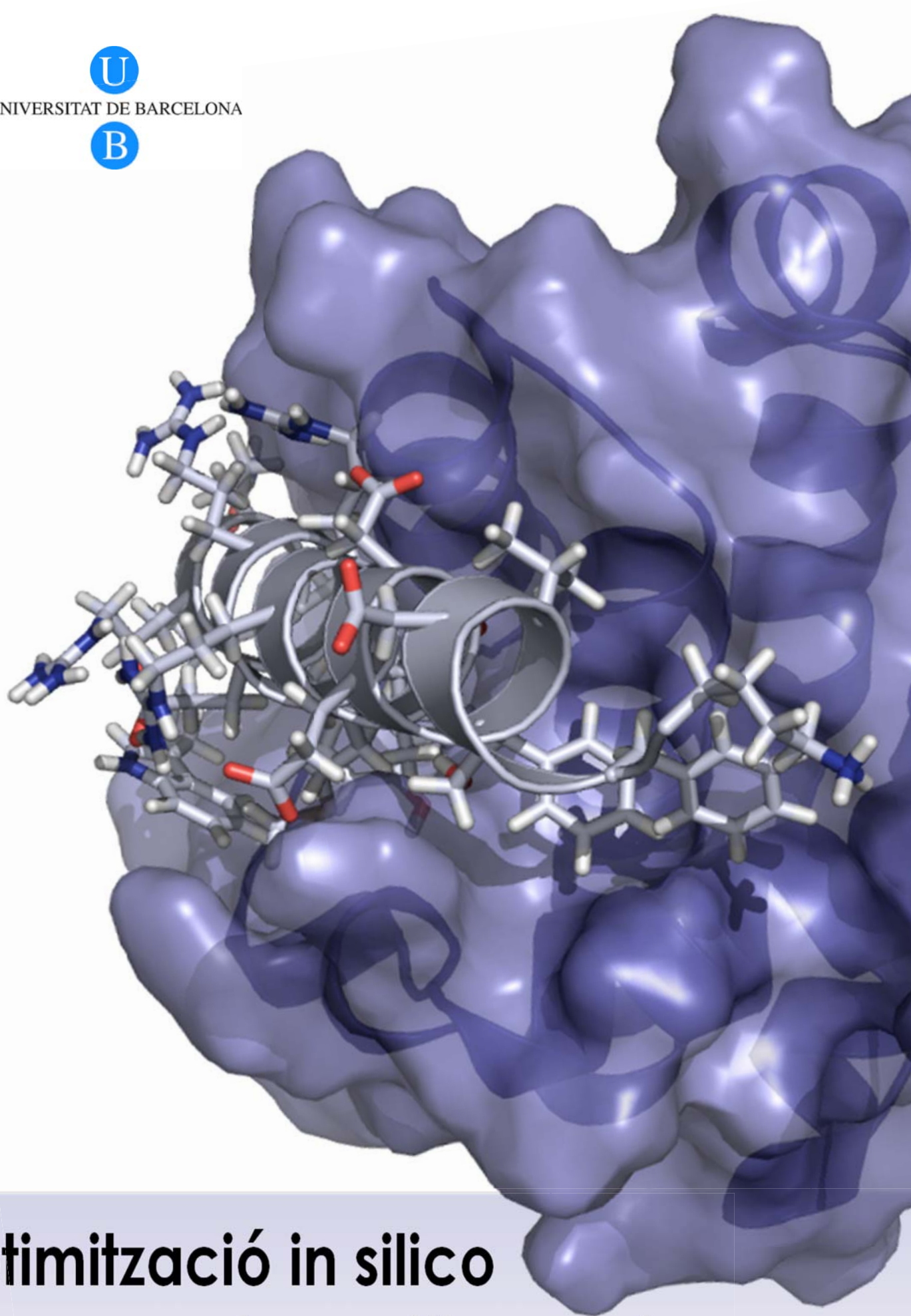
**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B



# Optimització in silico de compostos antitumorals

Laura Delgado – Maig 2011









# Universitat de Barcelona

Facultat de Química

Departament de Química Física

*Programa de doctorat de Biotecnologia*

*Línia de Recerca de Nanobiotecnologia*

## OPTIMITZACIÓ IN SILICO DE COMPOSTOS ANTITUMORALS

Memòria que, per optar al grau de doctor per la Universitat de  
Barcelona, presenta

**Laura Delgado Soler**

Barcelona, Maig 2011

**Director**

Prof. Dr. Jaime Rubio Martínez

Dept. Química Física, Universitat de Barcelona









# ÍNDEX

INTRODUCCIÓ .....	11
CAPÍTOL I. DISSENY RACIONAL DE FÀRMACS.....	21
1.1 Disseny de fàrmacs basat en la estructura .....	26
1.2 Disseny de fàrmacs basat en el lligand .....	28
1.3 Quimiogenòmica .....	30
CAPÍTOL II. DIANES ANTITUMORALS .....	37
2.1 Apoptosi: La família Bcl-2.....	41
2.2 El cicle cel·lular: Les Quinases Depenents de Ciclina 4 i 6. ....	47
CAPÍTOL III. RESTABLIMENT DE L'APOTOSI .....	57
3.1 Determinants moleculars de la unió del pèptid BimBH3 amb les proteïnes antiapoptòtiques .....	61
3.2 Cap al diseny de teràpies combinades per restablir l'activitat de BCL-2.....	67
3.3 Aproximació basada en la estructura al diseny de pèptids mimètics de BakBH3 amb una helicitat incrementada.....	75
CAPÍTOL IV. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR.....	85
CAPÍTOL V. APROXIMACIÓ QUIMIOTÒXICA.....	97
CONCLUSIONS.....	107
REFERÈNCIES.....	115
PUBLICACIONS .....	123





# INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ



# INTRODUCCIÓ

L'existència de l'ésser humà s'ha vist constantment amenaçada per nombroses malalties. Per aquest motiu, la cerca de substàncies amb propietats curatives ha estat una demanda permanent en la societat (1). Gran part de l'activitat científica actual es troba orientada a cobrir aquesta necessitat amb la finalitat d'obtenir fàrmacs cada cop més eficaços i segurs. Això es tradueix d'una banda en el descobriment de nous compostos amb propietats terapèutiques i d'altra, en la optimització d'aquestes substàncies per incrementar la seva eficàcia i reduir els efectes adversos que puguin presentar.

La utilització de xenobiòtics per al tractament de malalties ha estat una pràctica exercida des de temps immemorials, principalment compostos obtinguts de plantes o microorganismes. Tot i això, només gràcies als avenços en les tècniques de separació i caracterització, va ser possible identificar els compostos responsables d'aquest efecte terapèutic. Durant molts anys, el procés d'obtenció de substàncies amb propietats curatives s'ha basat en cicles d'aïllament i/o síntesis de compostos naturals obtinguts a partir d'un procés de cribratge experimental aleatori (2).

Durant el darrer segle s'ha produït un canvi en aquesta filosofia de treball. Els grans avenços científics que han tingut lloc han permès que l'estudi dels processos patològics pugui realitzar-se a des d'un punt de vista molecular. Així, avui dia és possible determinar quines són les vies metabòliques cel·lulars alterades en una determinada malaltia, quins són els metabòlits implicats, els mecanismes de senyalització que intervenen en aquests processos, així com la interacció d'aquestes vies amb altres sistemes de l'organisme.

## Optimització in silico de compostos antitumorals

Generalment, és possible trobar un punt del procés metabòlic on es pot intervenir i restablir el comportament normal de les cèl·lules. Es coneix com a dianes terapèutiques a aquelles biomolècules involucrades en la senyalització o desenvolupament de rutes metabòliques característiques d'un procés patològic i que son susceptibles de ser regulades(1, 2). El coneixement de les dianes terapèutiques implicades en una determinada patologia, permet una cerca racional de nous agents terapèutics per al desenvolupament de noves teràpies, procés que es coneix com a disseny racional de fàrmacs.

En general, els fàrmacs son petites molècules que interaccionen amb determinades dianes terapèutiques modulant la seva activitat biològica. Tradicionalment, aquestes substàncies eren obtingues directament de fonts naturals però amb l'aparició de noves disciplines científiques, com ara la biotecnologia, s'ha desviat l'atenció cap a una nova font de substàncies farmacològicament actives: els propis organismes en si. El desenvolupament de noves eines bioquímiques, ha permès l'aïllament de molts metabòlits secundaris de l'organisme, així com l'obtenció de proteïnes recombinants. Aquests noves substàncies biològiques o biosimilars, són capaces també d'intervenir el curs d'un procés patològic i constitueixen avui dia una branca molt important de la indústria farmacèutica (3).

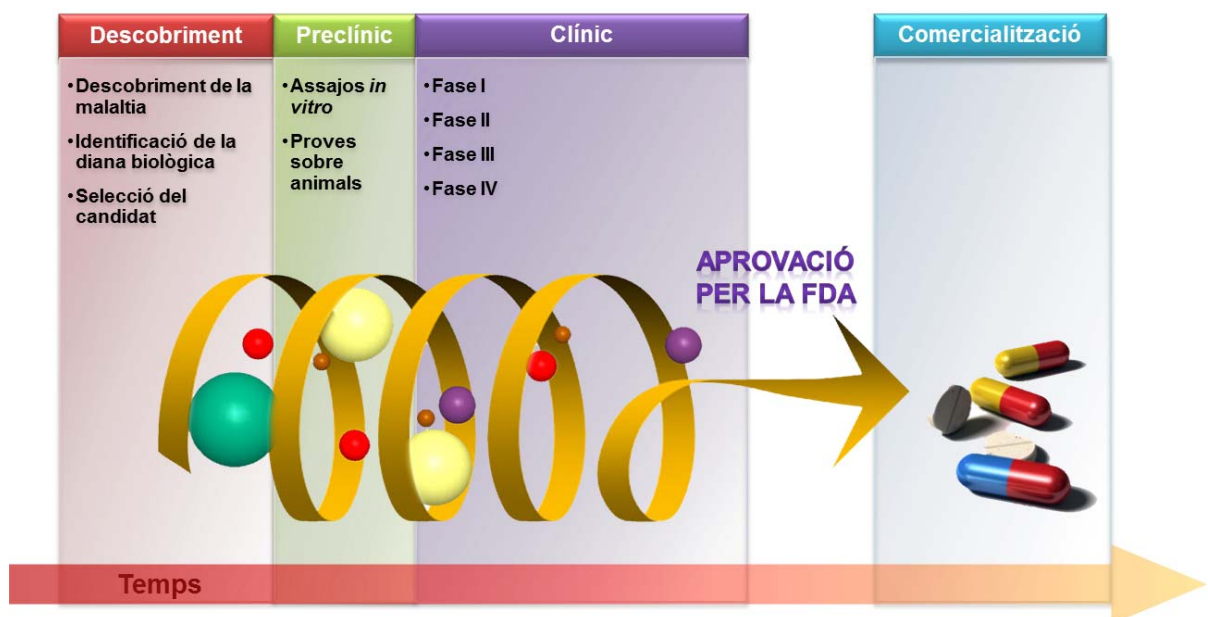
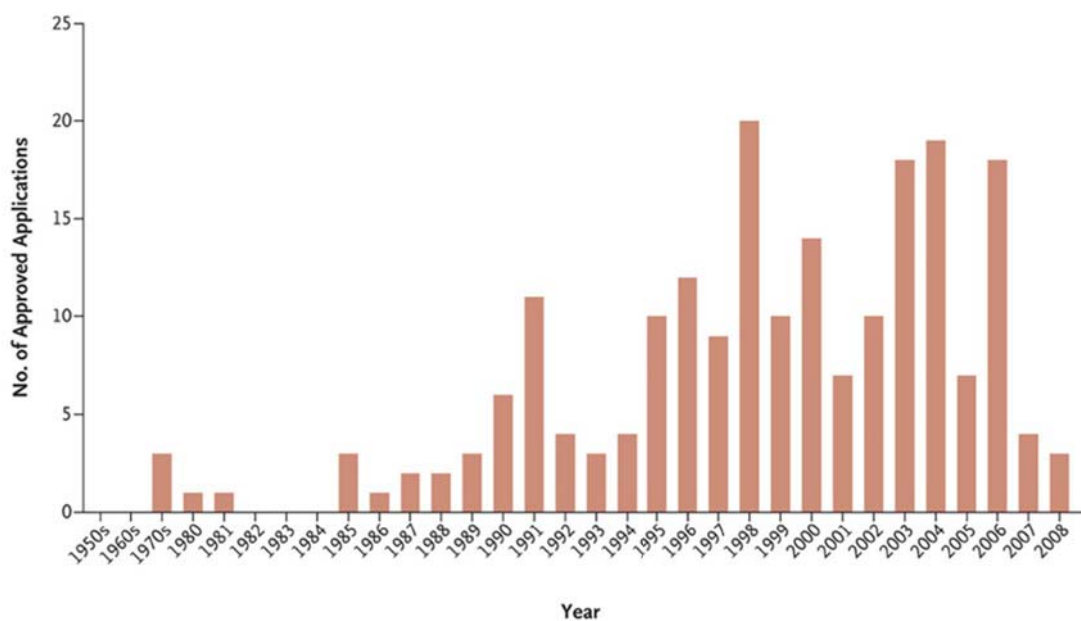


Figura 1. Etapes del procés de desenvolupament de fàrmacs.

La arribada dels fàrmacs al mercat resulta un negoci car i amb un risc elevat. En la majoria de casos, transcorren entre 7 i 12 anys des de la identificació d'un compost amb potencial activitat farmacològica fins a la seva distribució al mercat com a fàrmac (4, 5). De fet, valoracions del *Tufts Center for the Study of Drug Development* (6) apunten a que el cost de treure un únic fàrmac al mercat ronda els 802 milions de dòlars, i fins als 1.200 milions de dòlars per als nous productes biotecnològics. A més, s'estima que de cada 40.000 compostos avaluats sobre animals, només cinc arriben a assajos clínics sobre humans i només un d'aquests cinc, és finalment aprovat com a fàrmac (7).

Tot aquest procés representa, per tant, un elevat cost tant en termes de temps com de recursos, bé siguin econòmics o humans. De fet, el desenvolupament de nous fàrmacs (veure Figura 1) inclou la compra de compostos, els assajos biològics de milions de substàncies per tal d'identificar molècules actives i la seva optimització, que normalment implica síntesis química, fins a assolir les propietats farmacològiques desitjades. Per aquest motiu, avui en dia s'està dedicant un gran esforç en reduir el cost i temps necessaris de manera que s'incrementi el nombre de compostos que entren en fase clínica i, en última instància, el número final de compostos que arriben al mercat.



**Figura 2.** Número de fàrmacs anuals aprovats per la FDA (8).



## Optimització in silico de compostos antitumorals

La utilització d'eines computacionals està adquirint importància ràpidament en l'àmbit del disseny de fàrmacs (1, 7, 9-11). En l'actualitat, ocupa aproximadament un 10% de la investigació en les indústries farmacèutiques i es preveu que aquest percentatge es duplicarà cap a l'any 2016 (10). Aquesta expansió ha estat possible no només gràcies a les millores en les eines computacionals, sinó també gràcies a la identificació de noves dianes terapèutiques així com al gran creixement d'estructures tridimensionals conegudes (mitjançant raigs X o ressonància magnètica nuclear, RMN) per a biomolècules d'interès terapèutic. És en les primeres etapes del desenvolupament de nous fàrmacs on majoritàriament té lloc l'aplicació d'eines teòriques. La finalitat és enriquir el procés en compostos actius i així reduir la quantitat de molècules que entren en les fases de síntesi i avaluació biològica. Així doncs, és possible emprar mètodes computacionals per a la identificació de compostos actius, selecció d'aquelles amb millors propietats farmacològiques, optimització de les molècules candidates o fins i tot per a la predicció de les seves propietats farmacocinètiques (7, 11).

De fet, l'ús del disseny racional de fàrmacs queda reflectit en el notable increment de nous compostos amb activitat farmacològica apareguts durant els darrers anys. Tal i com s'aprecia a la Figura 2, cap als anys 90 i gràcies a l'aplicació d'aquestes tècniques, la tendència de fàrmacs anuals que arriben al mercat canvia radicalment. Tot i això, el desenvolupament de nous compostos candidats i fàrmacs efectius resulta encara una tasca difícil. Si bé és cert que les prediccions d'afinitat d'aquests compostos per a la seva diana biològica són prou acceptables, encara hi ha moltes altres propietats com la biodisponibilitat, el temps de vida o els efectes adversos d'aquests compostos que s'han de tenir en compte per a que un determinat compost pugui ser utilitzat com a fàrmac. Malgrat les millores que comporta el disseny racional de fàrmacs, aquestes característiques resulten encara molt difícils d'optimitzar, dificultant l'arribada d'aquests compostos al mercat.

Fins ara, s'han identificat experimentalment un gran nombre de dianes terapèutiques, la desregulació de les quals contribueix d'alguna manera a l'aparició o desenvolupament de una determinada patologia. Malauradament, degut a la complexitat dels processos metabòlics de l'organisme, únicament els resultats clínics

de compostos que actuïn selectivament sobre alguna d'aquestes biomolècules confirmaran la seva idoneïtat com a dianes terapèutiques. Precisament en aquest aspecte és on les tècniques de modelització molecular es presenten com una eina eficaç per a la obtenció de compostos selectius envers una determinada biomolècula, quimiogenòmica o inclús per determinar perfils farmacològics.

Les interaccions proteïna-proteïna intervenen en nombroses i molt diverses funcions biològiques. Per tant, es presenten com a punts d'intervenció atractius per al disseny de nous compostos amb activitat farmacològica. No obstant, les interaccions proteïna-proteïna generalment engloben un gran nombre d'interaccions dèbils que es produeixen al llarg de la gran superfície de contacte entre les proteïnes. És per aquest motiu, que la disrupció d'aquestes interaccions mitjançant l'ús de petites molècules no ha estat considerada per al disseny de fàrmacs fins fa relativament poc (12). En l'actualitat, s'han publicat nombrosos estudis corroborant que la disrupció d'interaccions proteïna-proteïna associades a processos patològics és possible mitjançant la unió a lligands peptídics (o no peptídics) obtinguts via modelització molecular (13-16).

Una de les aplicacions on aquestes tècniques han tingut més impacte, és a la recerca de nous fàrmacs antitumorals. La creixent incidència d'aquesta malaltia en la societat i el gran nombre d'efectes secundaris que presenten la majoria de teràpies existents ha creat la necessitat de dissenyar noves estratègies per al tractament d'aquesta patologia. És en aquesta línia d'investigació, on s'emmarca la present tesi que porta per títol *Optimització in silico de compostos antitumorals*.

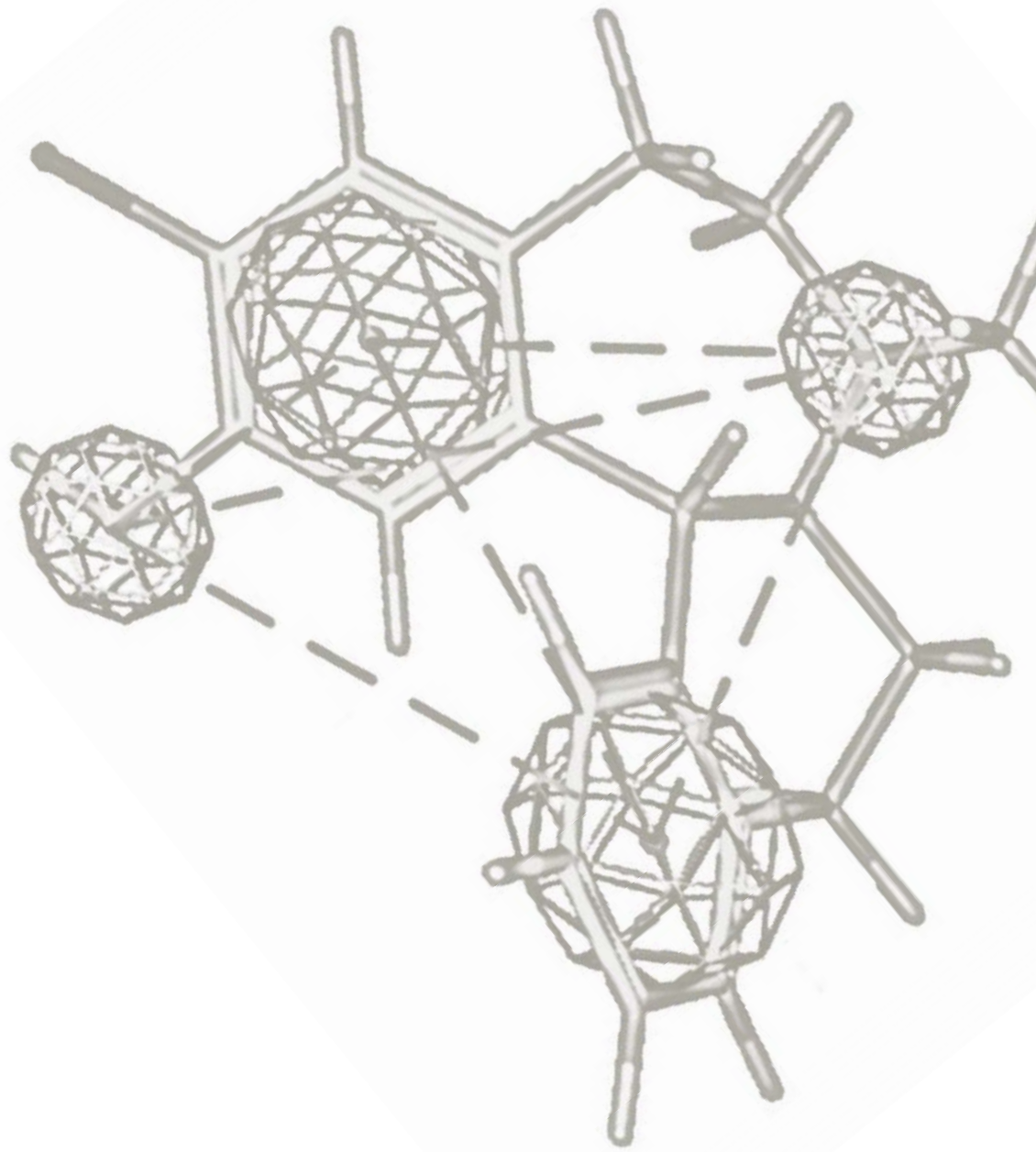
El projecte es planteja dos objectius bàsics. D'una banda, l'aplicació de tècniques computacionals per a l'anàlisi de les interaccions proteïna-proteïna implicades en processos tumorals. La intenció és trobar compostos capaços d'interaccionar selectivament amb aquestes proteïnes modulant la seva activitat biològica, de manera que puguin ser emprats com a principis actius en noves teràpies antitumorals. D'altra banda, es pretén desenvolupar noves eines teòriques per al descobriment de compostos anticancerígens sota un punt de vista diferent. Donada la dificultat de predir les propietats farmacocinètiques i els efectes adversos dels potencials fàrmacs, es lògic pensar que l'aproximació clàssica de que un únic compost interacciona amb

una única diana terapèutica resulta incompleta. En base a aquesta premissa, l'objectiu que es planteja es desenvolupar un nou mètode que, basant-se únicament en el lligand, permeti no només identificar nous compostos actius sinó també preveure els possibles efectes secundaris deguts a la interacció d'aquests compostos amb altres dianes biològiques o inclús, les seves propietats farmacocinètiques.

La memòria s'estructura en diferents apartats on es desenvolupen per un costat el marc teòric necessari per a la realització de la tesi, i per l'altre, els resultats obtinguts del treball i les conclusions més rellevants que es poden extreure. Finalment, es presenten unes conclusions de caràcter global sobre la investigació realitzada. En un primer capítol s'introdueix la metodologia emprada per a la realització del treball. Dins d'aquest es tracten les millores que ha suposat el disseny racional de fàrmacs *versus* l'aproximació clàssica, així com les avantatges de la utilització d'eines computacionals per agilitzar aquest procés. A més, es detallaran les diferents aproximacions al disseny racional de fàrmacs en base a la informació bioquímica disponible. Seguidament, s'expliquen les estratègies terapèutiques plantejades en aquest treball per a la cerca de nous compostos antitumorals. En aquest capítol s'introdueixen breument les característiques metabòliques del càncer així com quins son els principals processos cel·lulars que es troben desregulats ocasionant aquesta patologia. Dins de les rutes metabòliques desregulades, es fa una descripció d'aquelles seleccionades en aquest treball i el punt de regulació que s'ha decidit intervenir en cada cas. Un cop introduïda la metodologia emprada i el escenari biològic on s'emmarca l'estudi, es presenten els resultats obtinguts. Aquests s'estructuren en tres capítols d'acord amb l'estratègia seguida per al disseny de fàrmacs en cadascun d'ells. Així, primerament es presenten els resultats obtinguts mitjançant el restabliment dels nivells cel·lulars d'apoptosi, seguidament, els resultats obtinguts de la inhibició del cicle cel·lular i finalment, es presenten els resultats obtinguts del tractament del disseny de fàrmacs ampliant l'aproximació de una única diana que interacciona amb una molècula. Per finalitzar la tesi, es presenten conclusions globals dels diferents estudis que constitueixen el present treball. A més, s'inclouen com annexos altres articles relacionats amb la temàtica d'aquest projecte.







# **DISSENY RACIONAL DE FÀRMACS**



# CAPÍTOL I.

## DISSENY RACIONAL DE FÀRMACS

Tal com s'ha comentat a la introducció, el descobriment de fàrmacs és un procés arriscat i amb unes possibilitats d'èxit considerablement reduïdes (3). De fet, l'elevat nombre de compostos que fallen en etapes avançades desenvolupament de fàrmacs comporta importants pèrdues per a la indústria farmacèutica. Aquest fet ha manifestat la necessitat d'implementar mètodes d'assessorament en les etapes inicials del procés per tal d'incrementar les possibilitats d'èxit en etapes més costoses com poden ser la síntesi i/o l'avaluació biològica o clínica (4, 7).

El punt de partida per a la recerca de nous compostos actius implica, generalment, un cribratge experimental d'una col·lecció de molècules sobre una determinada diana biològica. Aquesta selecció inicial de compostos resulta ser una de les etapes més arriscades del descobriment de fàrmacs i esdevé crucial per a l'èxit de les següents etapes (17), no només des del punt de vista de la efectivitat i selectivitat dels compostos sobre la diana seleccionada, sinó també des del punt de vista de les propietats farmacocinètiques i toxicitat de les molècules candidates.

L'aplicació d'eines computacionals per a la resolució d'aquest tipus de problemes ha suposat un punt d'inflexió en la recerca de fàrmacs agilitzant principalment les etapes inicials del procés que comporten el processat d'un gran nombre d'estructures. Es coneix com a disseny de fàrmacs assistit per ordinador a la utilització de recursos computacionals per a l'emmagatzemament, anàlisi i/o modelització de compostos d'ús terapèutic (18). Dins d'aquesta disciplina es poden trobar aplicacions molt diverses que



inclouen el desenvolupament de llibreries de compostos per a realitzar estudis estructura-activitat, programes per a dissenyar compostos amb les propietats desitjades així com programes per a la selecció de potencials compostos actius prèvia a la síntesi o avaluació biològica (11, 17, 18).

El coneixement d'una patologia a nivell molecular permet determinar quines són les molècules implicades i la seva interacció amb les diferents rutes metabòliques. Així, és possible identificar un punt sobre el qual es pot intervenir per a modificar el curs del procés patològic (19). Generalment, aquest punt resulta ser una proteïna (usualment enzims o receptors de membrana) la funció específica de la qual pot ser regulada mitjançant la unió a un compost químic i, per tant, resulta una diana idònia per al disseny de nous agents terapèutics (1, 2).

El coneixement de l'efecte que exerceix la estructura tridimensional de les biomolècules en la seva activitat biològica resulta imprescindible per a l'estudi dels sistemes biològics i els processos metabòlics que hi tenen lloc. Des d'un punt de vista físic, la predicció d'estructures tridimensionals de les molècules implica el coneixement de la relació que existeix entre la energia del sistema i les posicions relatives dels àtoms que el componen. Aquest tipus d'estudis és el que es coneix com a càlcul de la superfície d'energia potencial i, atenent a l'escala de treball, s'han desenvolupat diferents tipus de mètodes aplicables. Bàsicament se'n poden distingir dos grans grups, els que treballen a nivell subatòmic, coneguts com a mètodes de mecànica quàntica, i els que treballen a nivell atòmic/molecular, que reben el nom de mecànica molecular.

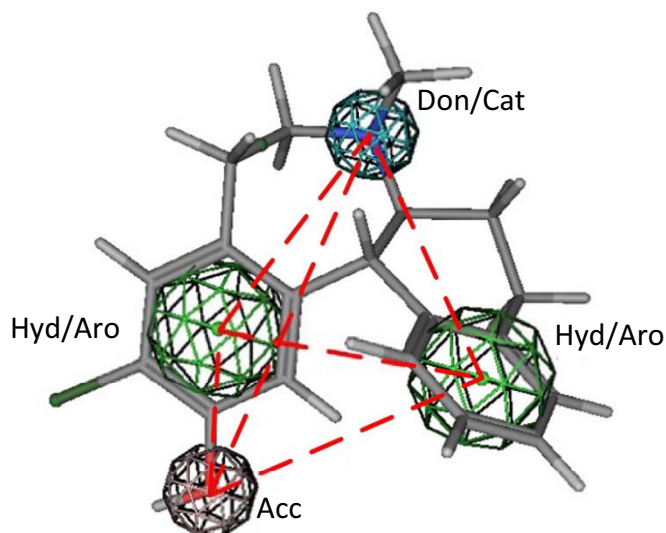
En aquest context, el disseny racional de fàrmacs és una de les aplicacions més esteses de les tècniques de modelització molecular, ja que generalment no necessiten descriure la formació o trencament d'enllaços covalents, sinó simplement interaccions intermoleculares. El concepte de modelització molecular comprèn totes aquelles pràctiques que fan ús de la informàtica per visualitzar, descriure o avaluar les propietats energètiques d'una determinada molècula en base a la seva estructura (20). La modelització molecular combina els fonaments de la química física teòrica, com ara la química quàntica o la mecànica molecular, i resultats experimentals amb la finalitat d'estudiar les propietats moleculars i, posteriorment, ser capaços de predir-les.

L'increment del nombre d'estructures tridimensionals disponibles per a proteïnes d'interès biològic experimentat recentment ha contribuït a la ràpida expansió de l'ús del disseny racional de fàrmacs per a la identificació de compostos actius. Quan es selecciona una diana per al disseny de nous fàrmacs, poden plantejar-se diferents estratègies en funció de la informació experimental disponible (17, 21, 22) que s'expliquen amb més detalls a les següents seccions.

El millor dels casos consisteix en disposar d'informació estructural sobre el complex receptor-fàrmac o, en la seva absència, sobre el receptor amb algun lligand natural. Si es disposa d'informació sobre la funció i estructura de la diana biològica, l'aproximació més emprada és el **disseny de fàrmacs basat en la estructura** (o disseny de fàrmacs directe) (23). En determinats casos, aquesta estructura tridimensional de la diana biològica es pot obtenir directament de manera experimental (per raigs X o RMN) però, si no es disposa d'aquesta informació, és possible obtenir un model per homologia utilitzant proteïnes similars com a patró.

Malauradament, el més habitual es conèixer únicament dades experimentals sobre la activitat de compostos amb una activitat farmacològica que es vol reproduir, sense disposar d'estructura alguna. En aquests casos cal enfocar el problema des d'un punt de vista completament oposat, el **disseny de fàrmacs basat en el lligand** (o disseny de fàrmacs indirecte). Existeixen eines computacionals capaces de predir quina és la informació estructural rellevant a partir d'un conjunt de molècules i les dades experimentals sobre la seva activitat. Aquestes molècules s'utilitzen com a patró per a obtenir compostos similars i que, en principi, haurien de conservar el perfil farmacològic desitjat.

Independentment de la estratègia considerada, existeix una elevada probabilitat de que la escassa informació estructural disponible no es correspongui amb la conformació bioactiva de les molècules. Durant la formació del complex actiu, aquestes biomolècules poden presentar variacions estructurals que cal tenir en compte a l'hora de dur a terme estudis funcionals. Inclús quan no es disposa de la estructura experimental del receptor, el coneixement de la conformació bioactiva d'alguns lligands similars permet treballar amb el concepte de **farmacòfor**.



**Figura 1.1.** Model tridimensional d'un farmacòfor.

La utilització pràctica d'aquest concepte de manera eficaç no va ser possible fins a l'arribada dels sistemes computacionals al món del disseny de fàrmacs, assolint la seva plenitud cap als anys 90, amb el desenvolupament de motors de cerca en bases de dades tridimensionals (24). En química computacional, es coneix com a farmacòfor al model tridimensional definit pels grups funcionals mínims que ha de tenir una molècula i les seves posicions relatives en l'espai per a que resulti activa (veure Figura 1.1). No obstant, a la pràctica se sol denominar farmacòfor a qualsevol model amb aquestes característiques, sense comprovar que realment sigui el conjunt mínim (25).

Cal tenir present que la utilització del mínim número de grups funcionals en la cerca de nous compostos, permet el descobriment d'un conjunt de molècules més divers. Això suposa una gran avantatge a la hora d'esperar que alguna d'aquestes s'ajusti a les característiques essencials que ha de tenir un bon fàrmac (bioabsorció, penetració cel·lular, baixa toxicitat, etc...)(26) o més, és d'esperar que les molècules petites siguin més fàcilment modificables per assolir aquestes característiques.

Alhora s'ha de ser conscient que certes propietats essencials per a la interacció entre dues molècules no es consideren en el model de farmacòfor, com ara la pèrdua d'entropia en el receptor i lligand per a la formació del complex o els impediments estèrics. Aquests aspectes es poden introduir en definir el model d'interacció tot i que tradicionalment no s'associen amb la idea de farmacòfor.

Clàssicament, el disseny de fàrmacs s'ha centrat en la identificació i optimització de compostos actius per a una única diana terapèutica. Tot i això, la simplicitat d'aquesta aproximació es posa de manifest en que són molts els compostos abandonats en etapes avançades del procés d'obtenció de fàrmacs degut als efectes adversos que presenten per interacció amb altres biomolècules de l'organisme.

La recent seqüenciació del genoma humà (27, 28) ha obert noves perspectives en l'àmbit del disseny de fàrmacs. La identificació de tots els gens que codifiquen per a les proteïnes humanes ha permès estimar que amb tots els fàrmacs existents en el mercat, tan sols es possible actuar sobre una petita proporció del conjunt de potencials dianes terapèutiques trobades al genoma humà. A més la majoria de fàrmacs que es troben avui dia al mercat son derivats de productes naturals (29-32), la qual cosa suposa que l'espai químic cobert per aquests compostos es molt reduït (33).

Tots aquests fets posen de manifest que tan sols una mínima proporció de l'espai químic sintetitzable ha estat avaluada sobre una petita proporció de les dianes terapèutiques de l'organisme humà (34) i per aquest motiu, el disseny racional de fàrmacs s'ha plantejat nous reptes durant els últims anys. La quimiogenòmica és una nova aproximació interdisciplinària que, en un principi, tracta de determinar tots els possibles compostos capaços d'interaccionar amb qualsevol diana terapèutica o, equivalentment, identificar totes les possibles dianes terapèutiques sobre les que actua un determinat compost (35). Aquest nou punt de vista converteix la cerca de nous fàrmacs en un procés encara més complex i costós que requereix de la integració d'altres disciplines com la biologia molecular, genètica o bioinformàtica per a intentar donar una resposta global al problema.

En les següents seccions s'intenta detallar cadascuna de les aproximacions al disseny racional de fàrmacs comentades descrivint els diferents mètodes que engloba cadascuna d'elles que han estat utilitzats per a la realització del treball que es presenta en aquesta tesi.

## 1.1 DISSENY DE FÀRMACS BASAT EN LA ESTRUCTURA

Donada la resolució atòmica de la estructura d'una macromolècula és possible dissenyar noves molècules que s'hi uneixin, modulant la seva activitat. Amb el desenvolupament de les tècniques de raigs X i RMN, la quantitat d'estructures tridimensionals de biomolècules caracteritzades s'ha incrementat notablement, afavorint així la ràpida expansió de les tècniques de disseny racional de fàrmacs basat en el receptor.

La cristal·lització de biomolècules amb els seus respectius lligands ha permès la identificació dels seus llocs d'unió, el que es coneix com a centre actiu o regulador de la proteïna. En certs casos, la informació estructural del receptor de la que es disposa es incompleta i, malgrat que s'hagi determinat la estructura de la molècula, no es coneix quin és el punt d'interacció dels lligands. Per resoldre aquest inconvenient, s'han desenvolupat eines computacionals que permeten identificar les cavitats en la superfície de les biomolècules i així suggerir quines són aquelles que poden actuar com a potencials llocs d'unió (36, 37).

Existeixen certes proteïnes que són difícilment cristal·litzables (típicament receptors de membrana, com ara els acoblats a proteïna G) i, tot i l'interès terapèutic, no és possible disposar d'una estructura tridimensional sobre la qual treballar. En aquests casos, una manera efectiva d'obtenir una estructura tridimensional per a la diana d'interès és a partir de la informació estructural d'altres biomolècules relacionades. Aquest procediment es coneix amb el nom de modelat per homologia i va ser descrit per primera vegada per Sutcliffe i col·laboradors al 1987 (38, 39). Tot i la gran utilitat d'aquests mètodes, els models per homologia requereixen d'una validació exhaustiva abans de ser utilitzats per a la cerca de nous compostos.

El coneixement del lloc d'unió d'una biomolècula és el punt de partida per la identificació de noves molècules actives. Donat el mode d'unió d'un dels seus lligands, és possible realitzar un cribratge virtual de col·leccions de molècules per identificar aquelles que son capaces de reproduir-lo i, per tant, tindran una efecte similar (1). La gran avantatge d'emprar bases de dades de molècules és que aquest compostos es troben disponibles comercialment i, per tant, es redueix considerablement la quantitat

de síntesi necessària per a la obtenció de nous fàrmacs. A més, la majoria de molècules contingudes en aquestes col·leccions han estat prèviament seleccionades en base les seves propietats físico-químiques (40) de manera que es minimitzin els problemes en etapes posteriors del desenvolupament. Així, imposant aquests tipus de filtres als lligands, junt amb la imposició les restriccions tridimensionals del lloc d'unió del receptor, la selecció de compostos realitzada en el procés de cribratge hauria d'incrementar notablement les possibilitats d'èxit de trobar nous compostos actius.

Els compostos resultants d'una primera selecció es sotmeten a un procés d'avaluació més rigorós que l'emprat per al tractament de bases de dades. Actualment existeix una gran diversitat de algorismes d'ancoratge o *docking* que permeten posicionar els lligands en el centre actiu de la proteïna i, per estimar l'afinitat dels compostos, implementen funcions d'avaluació empíriques. La majoria d'ells treballen sota l'aproximació de receptor rígid (com ara Glide (41) o Gold (42)) i tan sols en alguns casos s'ha introduït la flexibilitat del receptor, permetent la mobilitat dels àtoms del centre actiu (Induced Fit Docking (43), FlexX (44) o Autodock (45)).

Un gran nombre de publicacions avalen la gran utilitat d'aquest tipus de tècniques per a la obtenció de nous compostos actius (46-48) però la baixa precisió de les funcions d'avaluació empíriques implementades en aquests programes, encara suposa grans dificultats per a la selecció de molècules (47, 49). Alguns estudis suggereixen l'ús d'un criteri consens englobant els resultats derivats de les diferents funcions (50, 51). En alguns casos, les millors molècules predites per aquests mètodes es sotmeten a un procés d'avaluació més acurat mitjançant tècniques de dinàmica molecular i funcions d'avaluació que combinen termes de mecànica molecular junt amb estimacions dels efectes de solvatació per a determinar l'energia d'unió com ara el MM-PBSA o MM-GBSA (acrònim de *Molecular Mechanics–Poisson Boltzmann/Generalized Born Surface Area*) (52, 53).

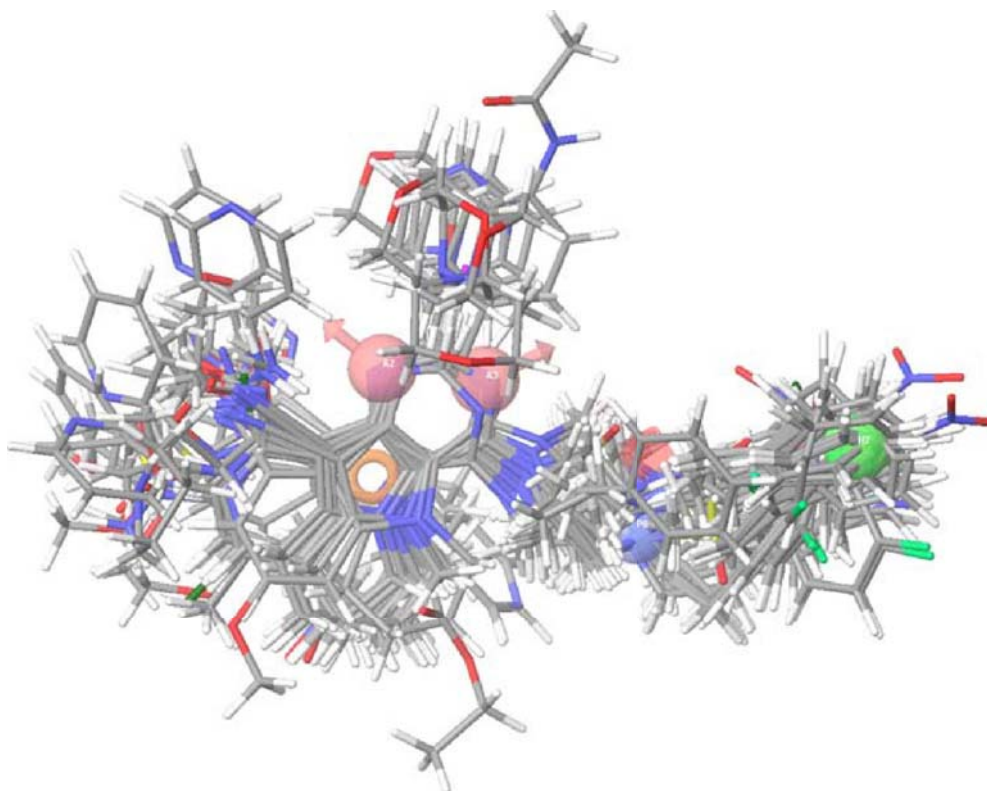
En alguns casos ja es disposa de compostos potencialment actius i el que es desitja es incrementar la seva afinitat i/o selectivitat per la seva respectiva diana biològica. En aquests casos, un cop determinat quin es el mode d'unió de la molècula en el centre actiu, es suggereixen possibles modificacions en base a la estructura del receptor que permetin millorar la seva interacció amb el receptor.

## 1.2 DISSENY DE FÀRMACS BASAT EN EL LLIGAND

La situació més comú en el disseny de fàrmacs és disposar d'un grup molècules amb un determinat comportament farmacològic que es vol reproduir. En la majoria de casos, no es disposa d'informació estructural sobre la diana biològica sobre la qual actuen aquests compostos o, fins i tot, es desconeix el mecanisme d'acció que poden tenir sobre aquesta. En aquests casos, s'utilitzen tècniques de disseny de fàrmacs basades en el lligand. Aquestes es basen en el principi de similitud molecular (54) segons el qual molècules amb estructura similar són propenses a compartir propietats similars. Per tant, les aproximacions *in silico* basades en el lligand per assignar el perfil farmacològic a un determinat compost tenen tres components bàsics (35): les molècules de referència amb el perfil farmacològic desitjat (o no, ja que les molècules inactives també són de gran utilitat), la base de dades on s'esperen identificar noves molècules i el mètode emprat per a comparar les estructures, que alhora inclou la representació molecular emprada i la mesura de similitud.

Una aproximació per aprofitar la informació inherent a les molècules actives reportades es derivar-ne un model de farmacòfor. És possible determinar quins són els punts d'interacció necessaris per a que les molècules presentin activitat i en base a aquests, establir el farmacòfor sobre el lligand (a la Figura 1.2 s'il·lustra un exemple de farmacòfor obtingut a partir d'un conjunt de lligands). Aquest farmacòfor pot ser utilitzat posteriorment per obtenir un pseudo-farmacòfor del receptor constituït per les interaccions complementaries (55) que pot ser utilitzat per a la cerca de noves molècules, de manera equivalent als mètodes descrits en l'apartat anterior per al disseny de fàrmacs basat en el receptor.

L'obtenció d'un pseudo-farmacòfor per al receptor permet treballar també en aquest cas amb la estratègia més habitual, ja que la majoria d'eines de disseny de fàrmacs estan basades en el coneixement del receptor. Alternativament el mateix model de farmacòfor del lligand pot emprar-se directament per a obtenir o dissenyar molècules que compleixin aquestes restriccions. El problema d'aquestes estratègies és que cal que tots els lligands comparteixin un mode d'interacció equivalent per a que el model de farmacòfor obtingut sigui fiable.



**Figura 1.2.** Exemple d'obtenció d'un farmacòfor en base a molècules d'activitat coneguda (56).

Una aproximació diferent consisteix en intentar correlacionar determinats motius estructurals dels lligands amb la seva activitat, el que es coneix com a QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*). En base a una col·lecció de lligands amb activitat coneguda, s'intenta estimar quina és la contribució dels diferents motius estructurals a la seva afinitat d'enllaç. Així, a partir del model establert és possible estimar l'afinitat de noves molècules i proposar compostos anàlegs més efectius (57, 58).

Tot i que els models farmacofòrics són la metodologia més estesa, a banda de les tècniques descrites, existeixen nombrosos mètodes per a la obtenció de molècules similars. Les estructures poden ser descrites mitjançant diversos tipus de descriptors, no només tridimensionals. Establint una mètrica adequada per a comparar aquests descriptors és possible trobar molècules similars al conjunt de referència. Una visió més detallada d'aquest tipus de metodologia es detalla en la següent secció.



### 1.3 QUIMIOGENÒMICA

En l'actualitat, les teràpies existents actuen sobre menys de 500 dianes biològiques. D'aquestes, aproximadament un 45% són receptors acoblats a proteïna-G, un 38% enzims, un 11% son hormones, un 5% canals iònics i un 2% receptors nuclears. Els estudis de genòmica funcionals realitzats sobre el genoma humà apunten a que aquestes suposen una ínfima part del nombre total de dianes terapèutiques presents en l'organisme i que, per tant, moltes dianes terapèutiques més viables romanen encara esperant a ser descobertes (3).

L'objectiu bàsic de la quimiogenòmica es podria plantejar com completar una matriu bidimensional (veure Figura 1.3) on les dianes representen les columnes i els lligands, les files, on els valors numèrics són generalment mesures de la seva afinitat d'enllaç ( $K_i$  o  $IC_{50}$ ) o efectes funcionals ( $EC_{50}$ ). Donat que generalment els valors d'aquesta matriu coneguts mitjançant tècniques experimentals són escassos, la quimiogenòmica *in silico* ha de ser capaç de completar els buits existents, predient els seus valors (35).

IC50 (nM)	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36	T37	T38	
C01	1050																																						
C02	1370					3480	1160					1120	2240	195	776	988	996	995	1030						1020		715			3380	2280	1440	702		1720	1350	3520		
C03	147	284	2530		2640	1780	1340		3020	1040		7580				4890							1740		4420	4650	708							2220				2380	
C04	2480	1740			344	3330																																	
C05																																							
C06	2590	1060																																					
C07	1235	797	5640																																				
C08	1200																																						
C09	960	4030					2010																																
C10	12	11	374	38			1330						1910							630	518	1910								762									
C11	235	507	3330				174					2500		429																									
C12	1050	32	264																																				
C13	19,3	311	1040																																				
C14	16,3	32	620	434										6550	1520															4420									
C15	154	926	117	283			4920																												663		1710		
C16	16	230	1840	1910			1150					2740	480	154	1690					1380	1570													349			1340		
C17	5070																																						
C18	179	333	1763													3660																							
C19	1380	2185				5470																																1830	
C20	3285	2235																																					
C21	1480																																						
C22	1810					1510																																	
C23	1470	617												3180				2940																				652	
C24	3530																																						345
C25	2280																																						
C26																																							
C27																																							
C28	4955	7240																																					
C29	2285																																						
C30	1010																																						
C31	2890																																						
C32	5	5	138	97												2120																							
C33	15	7	114	38									2100	1890																									
C34	16,7	56,1	1190	340												557	160	947																					
C35	24,9	104	4120	758			4250								123	29	1880																						
C36	83,5	101	1840	2420				2830	3590	2810					538	149																							
C37	735	4930																																					
C39	4015	4230				4210	1640						3620	456	338	1550	1650	1280	1250							1140	1060	3450			1530	726					2730		
C40	3660	2820	9380			5080	1170								977	716	3020	1280	1660	1340						1110	1030			1350	1170						4300		
C41	800															1410																							
C42	197																																						
C43	1690					4180																																	
C44	4545	4120	8570			2460	993						967	2890	341		1480	994	1820	757																		438	
C45	310	2140	3710				2180						2750	378	240	1840	954	1930	1980							839	5180			311	1820						438		
C46	6345	1980	5770																																				2590
C47	2300																																						559
C48	3950	3580				3730																																	105
																																							4840
																																							1480

Figura 1.3. Matriu d'interacció receptor-ligand amb els lligands representats per files i els receptors en columnes. Els valors numèrics son típicament constants d'interacció que en la majoria de casos encara es troben per determinar

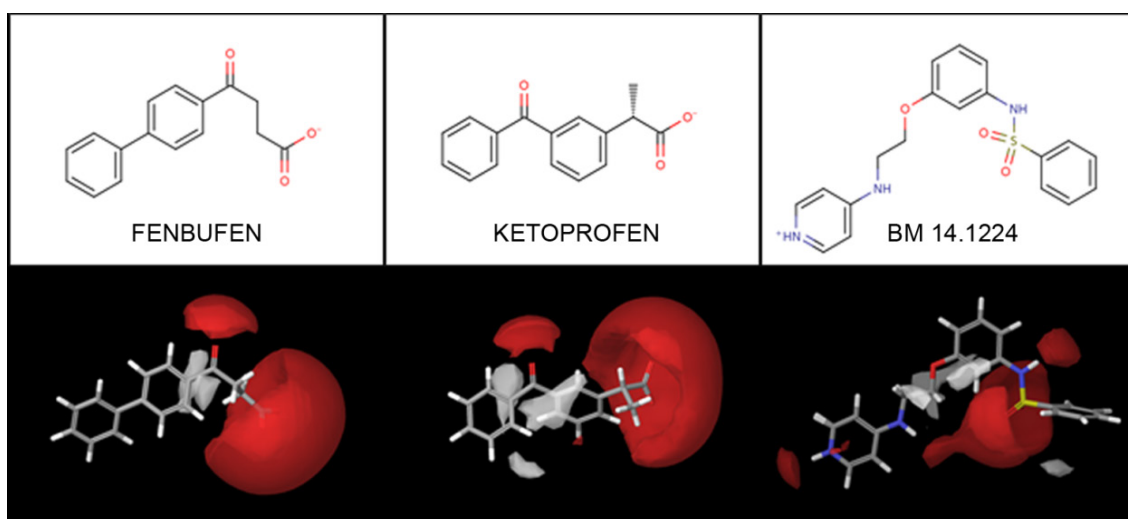
Una eina fonamental en aquest camp és el tractament de la informació biològica i estructural disponible a la bibliografia. Així, per tal d'omplir de la millor manera possible aquesta matriu i poder predir els valors desconeguts, resulta imprescindible disposar de bases de dades anotades, és a dir, informació estructural, biològica i bibliogràfica sobre lligands i els seus corresponents receptors (59, 60).

Per predir de manera teòrica les afinitats desconegudes, la quimiogenòmica es basa en el principi de similitud química mencionat anteriorment (35, 61). Segons aquesta premissa, lligands químicament similars s'uniran a dianes terapèutiques semblants; o equivalentment, dianes terapèutiques que uneixen lligands similars, comparteixen un patró d'unió equivalent. La principal qüestió del problema radica, per tant, en la selecció de la mesura de similitud que s'ha d'emprar per comparar diferents lligands o dianes terapèutiques.

La similitud de lligands i receptors pot definir-se mitjançant diversos mètodes, però tots ells es basen en l'assignació d'una representació numèrica a cada molècula denominada conjunt de descriptors. Aquests han de reflectir la informació essencial del compost considerat, bé sigui estructural, química o biològica. Un cop escollida la representació molecular, s'ha d'establir una mètrica per a comparar els vectors de descriptors. Típicament es treballa amb la distància euclidià o similitud de Tanimoto, tot i que poden emprar-se diversos tipus de mètriques que permetin quantificar la similitud entre els vectors de descriptors assignats a un determinat parell de molècules. Respecte als descriptors, generalment s'utilitzen diferents representacions moleculars quan es tracta de receptors i lligands. Existeixen molts tipus diferents de descriptors que generalment es classifiquen en funció de la dimensionalitat de les propietats que inclouen (35, 61, 62).

Els lligands poden estar representats per descriptors monodimensionals (com poden ser el pes molecular, càrrega, solubilitat, etc.) que deriven de la pròpia fórmula molecular i generalment s'associen a propietats farmacocinètiques com ara l'absorció, distribució o metabolisme dels compostos. Tot i això, els descriptors bidimensionals són els més utilitzats en la descripció d'aquest tipus de sistemes, coneguts també com a descriptors topològics. Aquests es basen en la comparació de fragments o motius estructurals de la molècula, però a diferència dels descriptors tridimensionals, no

depenen de la distribució espacial d'aquests sinó de la connectivitat dels motius. Això permet eliminar els problemes associats a la conformació del lligand escollida i flexibilitat de les molècules a l'hora de comparar estructures. Malgrat tot, els descriptors tridimensionals també són molt utilitzats, especialment els farmacòfors, els que descriuen la forma de la molècula o els que descriuen els camps generats per la mateixa (61). Un exemple de descriptors moleculars per als lligands es troba en la Figura 1.4 on s'il·lustren les representacions moleculars i camps d'interacció per a tres fàrmacs coneguts: dos inhibidors de COX-1, el Fenbufen i el Ketoprofen, i un inhibidor de la trombina, BM 14.1224. Com es pot apreciar per a qualsevol dels descriptors, els dos inhibidors de COX-1 presenten descriptors molt similars entre ells i completament diferents als de l'inhibidor de la Trombina.



**Figura 1.4.** Exemple de descriptors bidimensionals i tridimensionals per als compostos Fenbufen, Ketoprofen i BM 14.1224. A dalt, representacions moleculars (bidimensionals) i a sota, els corresponents camps d'interacció hidrofílica (vermell) e hidrofòbica (blanc) com a exemple de descriptor tridimensional.

Els receptors es descriuen típicament en base a la seva seqüència o estructura (35). Així, és freqüent treballar amb descriptors monodimensionals que fan al·lusió a la seqüència d'aminoàcids de la proteïna. La dificultat radica en que, fins i tot dins d'una mateixa família, aquesta descripció no es una tasca senzilla. En molts casos es realitza una comparació de motius de seqüència característics de certes famílies de proteïnes, insercions o deleccions. Resulta per tant més útil treballar amb descriptors bidimensionals que inclouen la estructura secundària de la proteïna, es a dir, la

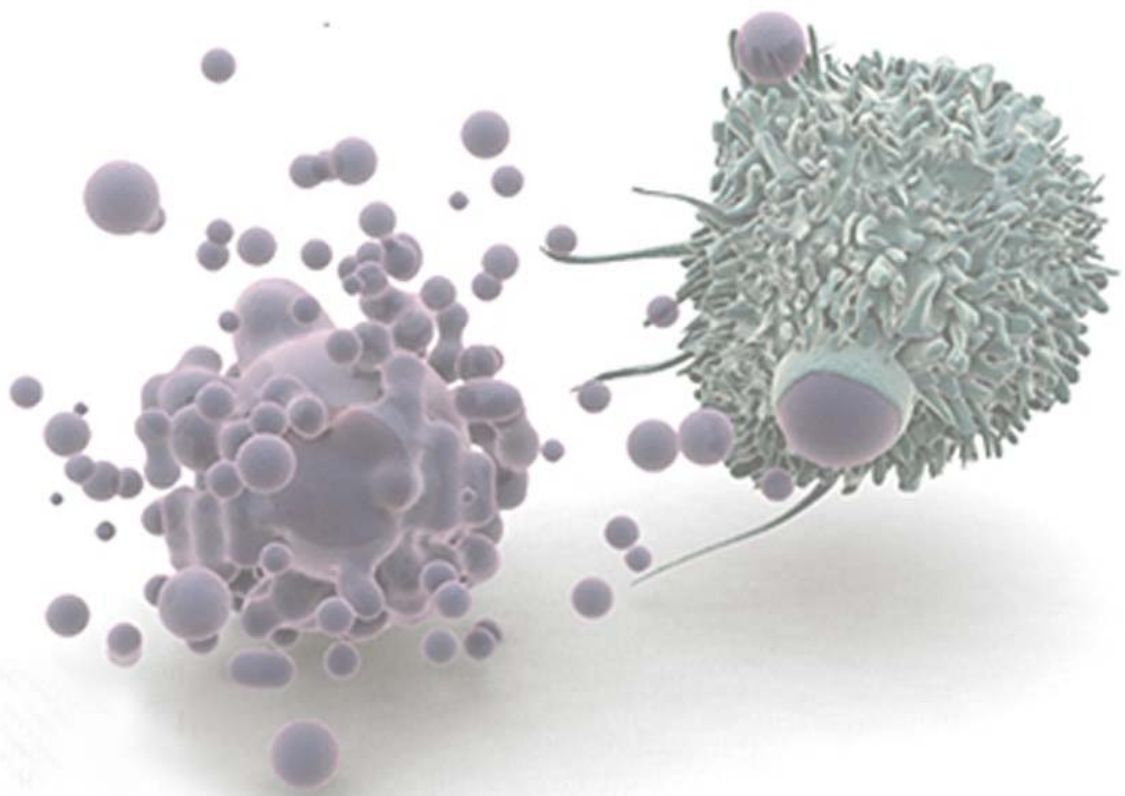
distribució dels motius estructurals. Tot i això, el principal determinant de l'activitat biològica d'una proteïna és la seva estructura tridimensional, especialment en el lloc actiu, i per aquest motiu, els descriptors tridimensionals són els més emprats. De fet, per tal de simplificar l'estudi, aquest tipus de descriptors generalment fan referència únicament a motius del lloc d'unió o a les regions de les biomolècules.

Mitjançant una representació simplificada de receptors i lligands podem ampliar la visió clàssica del disseny de fàrmacs on un únic compost interaccionava amb una diana terapèutica, per incloure possibles interaccions colaterals del mateix compost. Això permet, d'una banda, preveure interaccions no desitjades entre un fàrmac i una determinada diana terapèutica i, d'altra, establir potencials interaccions entre dianes i lligands no vinculats per similitud a altres complexos coneguts (63, 64).

El control de la selectivitat d'un compost en les etapes inicials de disseny de fàrmacs resulta crucial per a l'èxit del procés (35, 65, 66). De fet, la variabilitat o conservació del centre actiu d'un determinat grup de proteïnes és un clar indicador de la permissivitat o selectivitat del lloc d'unió. Així, si el que es busca es el disseny de lligands amb un ampli espectre d'acció per a un determinat grup de proteïnes caldrà considerar per a l'anàlisi aquells residus compartits per aquestes proteïnes. Si pel contrari es busquen compostos altament selectius, tan sols s'hauran d'incloure aquelles regions més conservades.

Aquest tipus d'anàlisi permet, entre altres aplicacions, la classificació i anàlisi funcional dels llocs d'unió. El coneixement de les regions compartides o conservades per un determinat grup de proteïnes o lligands permet identificar també quines son aquelles interaccions (residus o grups funcionals) indispensables per a una determinada funcionalitat biològica. Així, és possible arribar a una millor comprensió dels processos que hi tenen lloc i predir possibles efectes no desitjats.





**DIANES ANTITUMORALS**



## **CAPÍTOL II. DIANES ANTITUMORALS**

Durant els darrers anys, la incidència del càncer en la societat actual s'ha anat incrementant considerablement. De fet, el número de nous casos de càncer diagnosticats es troba actualment entorn els 1.5 milions per any (67, 68). El principal responsable d'aquest augment és l'envelliment general de la societat. No obstant, les millores en els mètodes de diagnosi i la major supervivència dels malalts de càncer també ha contribuït notablement a incrementar la població de malalts de càncer. Afortunadament, gràcies a les tècniques de detecció precoç i el desenvolupament de noves teràpies més efectives, l'augment morbiditat ha vingut acompanyat per un notable descens del número de morts, que actualment es troba al voltant dels 600.000 anuals. Així doncs, per millorar encara més aquestes perspectives, actualment s'està fent un gran esforç científic en la investigació per al desenvolupament de nous tractaments per al càncer.

El càncer és un grup de malalties que es caracteritzen per una proliferació descontrolada de cèl·lules anormals que tenen la capacitat d'invasió d'altres teixits de l'organisme (67). En un organisme sà, les cèl·lules es divideixen de manera estrictament controlada fins assolir el creixement tissular necessari per un bon funcionament de l'organisme (homeòstasi). Quan les cèl·lules envelleixen o resulten danyades, aquestes moren per a ser substituïdes per altres noves garantint així un creixement i funcionament adequat dels teixits.



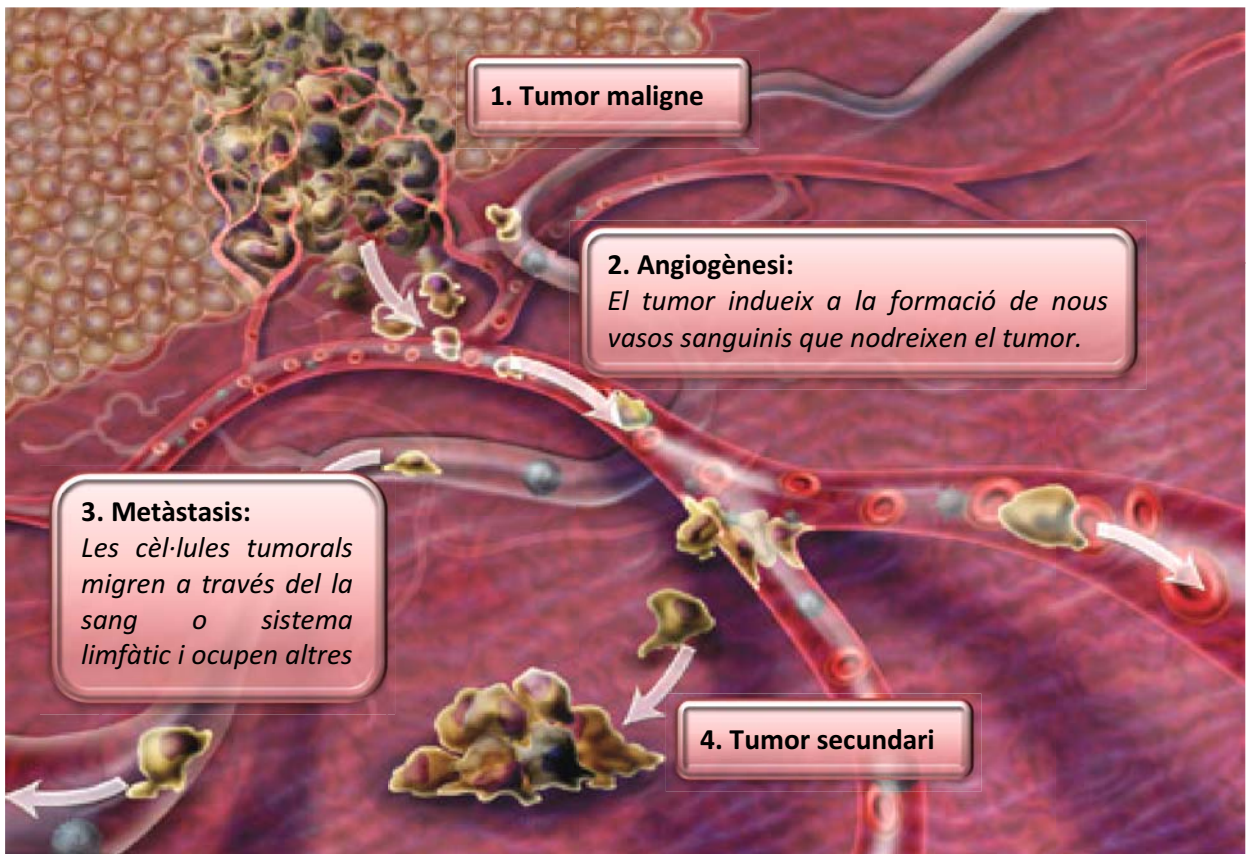
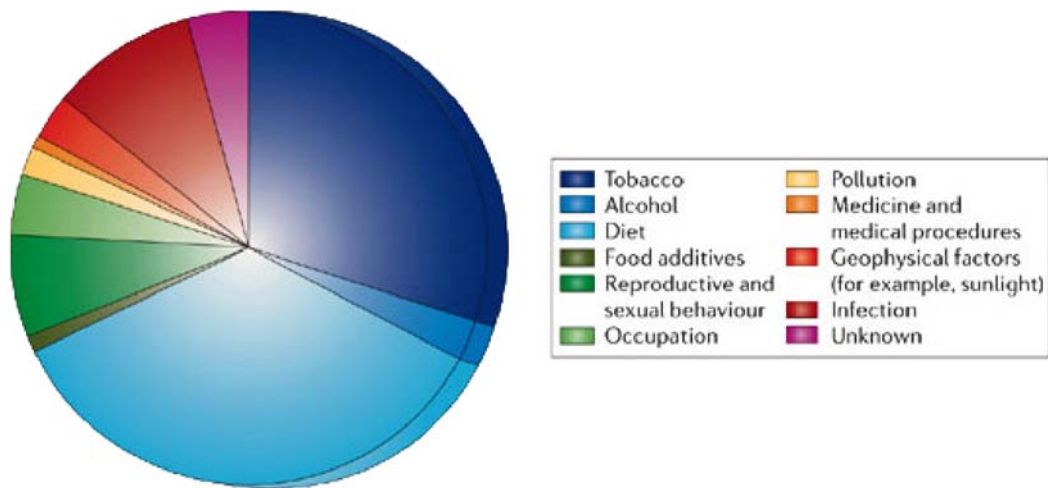


Figura 2.1. Desenvolupament d'un procés cancerigen maligne.

En determinats casos, aquest procés es pot veure alterat i produir-se mutacions en el material genètic d'alguna cèl·lula que afectin els mecanismes de proliferació i/o de mort cel·lular. Quan això succeeix, aquests processos esdevenen independents de les senyals de regulació i es continuen formant cèl·lules defectuoses que l'organisme no necessita. Així, s'acaba generant una massa de cèl·lules extra anomenada **tumor** (veure Figura 2.1) (68).

Cal considerar però que no tots els processos tumorals són malignes. Podem trobar tumors benignes, que poden eliminar-se per cirurgia i generalment no tornen a aparèixer. Els tumors malignes a més de la capacitat de proliferació il·limitada i evasió dels mecanismes d'apoptosi, tenen la capacitat de migrar a través del torrent sanguini o sistema limfàtic, envaint i destruint altres teixits de l'organisme. Aquest procés es coneix com amb el nom de metàstasi i ocasiona la formació de nous tumors secundaris.

El càncer pot ser ocasionat tant per factors externs (veure Figura 2.2) o interns com podrien ser mutacions heretades, sistema immune, hormones o altres factors del metabolisme, factors als que generalment ens referim com a susceptibilitat genètica de l'individu. En la majoria de casos, l'inici del procés tumoral té lloc per una combinació d'ambdós factors, tot i que un cop iniciat el càncer, generalment són els factors genètics els que en determinen la seva evolució.



**Figura 2.2.** Principals causes del càncer (69).

El càncer no és una patologia única sinó que engloba més de 100 malalties que totes elles es caracteritzen per un creixement tissular descontrolat en algun punt de l'organisme. Pot originar-se a partir de qualsevol tipus de cèl·lula en qualsevol teixit corporal. Així, és possible trobar una gran varietat de formes de càncer, depenent del teixit del qual deriven i la morfologia de les cèl·lules cancerígenes. Típicament, els tipus de càncer es divideixen en cinc categories més amples (68). Els carcinomes s'inicien en teixits epitelials com ara la pell o els epitelis que recobreixen les cavitats i òrgans. Els sarcomes procedeixen de óssos, cartílags, greix, teixit muscular, vasos sanguinis o qualsevol teixit connectiu o de suport. Es parla de leucèmia quan el càncer s'inicia en teixits hematopoiètics, com la medul·la òssia, produint cèl·lules sanguínies anormals. Els limfomes i mielomes són càncers del sistema immune. Finalment, ens referim com a càncers del sistema nerviós central a aquells que s'inicien al cervell o a la medul·la espinal.

## Optimització in silico de compostos antitumorals

Tot i els grans coneixements que s'han anat adquirint durant els darrers anys entorn a aquesta patologia, nombrosos assajos realitzats amb diferents línies cel·lulars tumorals demostren que, fins i tot dins d'un mateix tipus de càncer, és possible trobar comportaments molt diversos. Aquest fet dificulta enormement el desenvolupament d'una teràpia única efectiva per a qualsevol tipus de càncer. De fet, la investigació farmacèutica que es desenvolupa avui dia es troba orientada, majoritàriament, al disseny racional de nous agents terapèutics per a un determinat tipus de càncer, el que es coneix com a teràpia dirigida. Aquesta intervé sobre rutes metabòliques desregulades en processos tumorals que permetin actuar selectivament sobre cèl·lules cancerígenes.

En l'actualitat, es coneix poc sobre el mode d'acció dels fàrmacs que s'utilitzen en les teràpies anticancerígenes existents. La majoria dels compostos actuen sobre l'ADN o el citoesquelet. La principal problemàtica d'aquests tractaments radica en que actuen de manera inespecífica, danyant així tant la cèl·lula tumoral com la sana. Per tant, la millora en la selectivitat és un atribut especialment desitjable per al disseny de noves teràpies més efectives. Precisament en aquest aspecte és on el disseny racional de fàrmacs esdevé una eina de gran utilitat.

La present tesi doctoral es centra en l'estudi de diverses proteïnes que presenten una marcada desregulació en determinats tipus de càncer i per a les quals existeixen nombrosos estudis experimentals que les avalen com a potencials dianes terapèutiques per al desenvolupament de nous tractaments. Aquestes proteïnes es troben implicades en dos processos cel·lulars bàsics, especialment alterats en cèl·lules tumorals, el cicle cel·lular i l'apoptosi. Aquests mecanismes es troben detallats en les següents seccions així com la rellevància de les dianes seleccionades i la seva implicació en el desenvolupament de processos tumorals.

## 2.1 APOPTOSI: LA FAMILIA BCL-2

L'**apoptosi**, també denominada mort cel·lular programada, és un procés altament conservat al llarg de l'evolució en organismes pluricel·lulars essencial per al desenvolupament embrionari i homeòstasi dels teixits (70). La mort cel·lular és un procés fisiològic necessari per a eliminar cèl·lules no desitjades o danyades que s'activa en resposta a una gran varietat d'estímuls tan intra- com extracel·lulars. Irregularitats en la maquinària apoptòtica cel·lular poden desencadenar diferents patologies. Així, poden conduir a un increment no desitjat del número de cèl·lules, com és el cas del càncer, o a una disminució, com s'observa a les malalties neurodegeneratives, autoimmunes o cardiovasculars. Per tant, el restabliment dels mecanismes apoptòtics cel·lulars resulta una aproximació terapèutica atractiva per al tractament de patologies diverses en general i, en particular, del càncer (71-74).

El control del l'apoptosi es realitza mitjançant dues cascades de senyalització (veure Figura 2.3) que de fet, no són completament independents entre sí: la via dels receptors de mort (o mecanisme extrínsec) i la via mitocondrial (o mecanisme intrínsec) (72). Independentment de la via a través de la qual té lloc la apoptosi, ambdós mecanismes convergeixen en l'activació d'unes proteïnes intracel·lulars anomenades caspases, responsables tant de l'inici com de l'execució de l'apoptosi.

En el mecanisme extrínsec, l'activació de les caspases està mediada per una família de receptors denominada TNF-R (*Tumor necrosis Factor Receptors*) i el conjunt dels seus respectius lligands, designat com TNF-L (*Tumor necrosis Factor Ligands*). Aquests receptors es localitzen en la superfície cel·lular i estan constituïts per dos dominis característics. El domini extracel·lular, ric en cisteïnes (pel que és conegut com a CRD pel seu acrònim anglès *Cysteine Rich Domain*), adopta una estructura terciària molt conservada per tota la família dels TNF-R i és el responsable de identificar els senyals proapoptòtics externs. Aquests són transferits a un domini intracel·lular, conegut com a domini de mort (en anglès *Death Domain* o DD), responsable d'iniciar la cadena d'activació de les caspases.

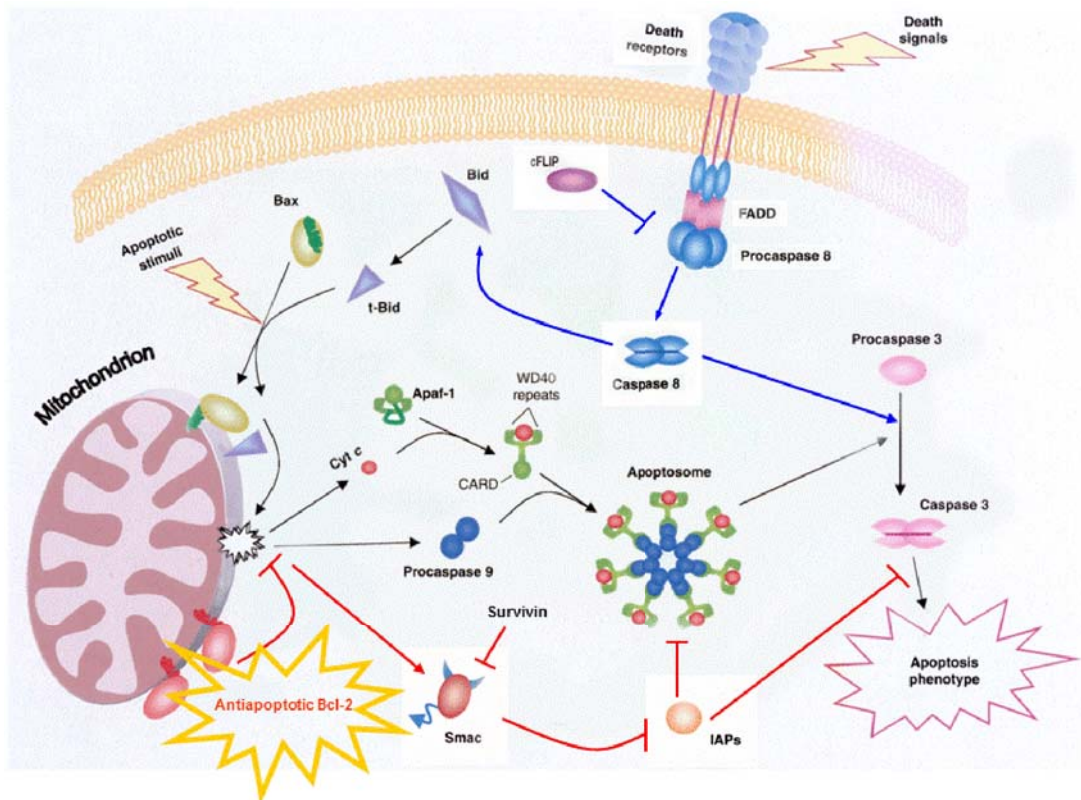


Figura 2.3. Mecanismes que desencadenen la mort cel·lular.

El mecanisme intrínsec s'inicia a la mitocòndria, el centre bioenergètic i metabòlic de les cèl·lules eucariotes. Aquest es troba regulat per la família de proteïnes Bcl-2 (en anglès *B-Cell Lymphoma 2*), principals responsables de la integritat de la membrana mitocondrial externa (75). La permeabilització de la membrana desencadena l'alliberament de factors proapoptòtics al citosol que acaben desencadenant l'activació de les caspases. De fet, aquest procés està considerat com una etapa irreversible que acaba induint l'apoptosi cel·lular (73, 76). És per aquest motiu que la regulació de les proteïnes de la família Bcl-2 es presenta com una estratègia prometedora per al disseny de nous fàrmacs antitumorals (74, 77).

En l'actualitat, es coneixen més de vint proteïnes que pertanyen a la **família de Bcl-2**. Aquestes poden dividir-se en pro- o antiapoptòtics segons la seva funció biològica i es caracteritzen perquè totes presenten al menys un dels quatre dominis conservats al llarg de tota la família, coneguts com a dominis BH1-4 (en anglès, *Bcl-2 Homology domains*). Des d'un punt de vista estructural, aquestes proteïnes es classifiquen generalment en tres subclasses en base al número de dominis d'homologia BH que

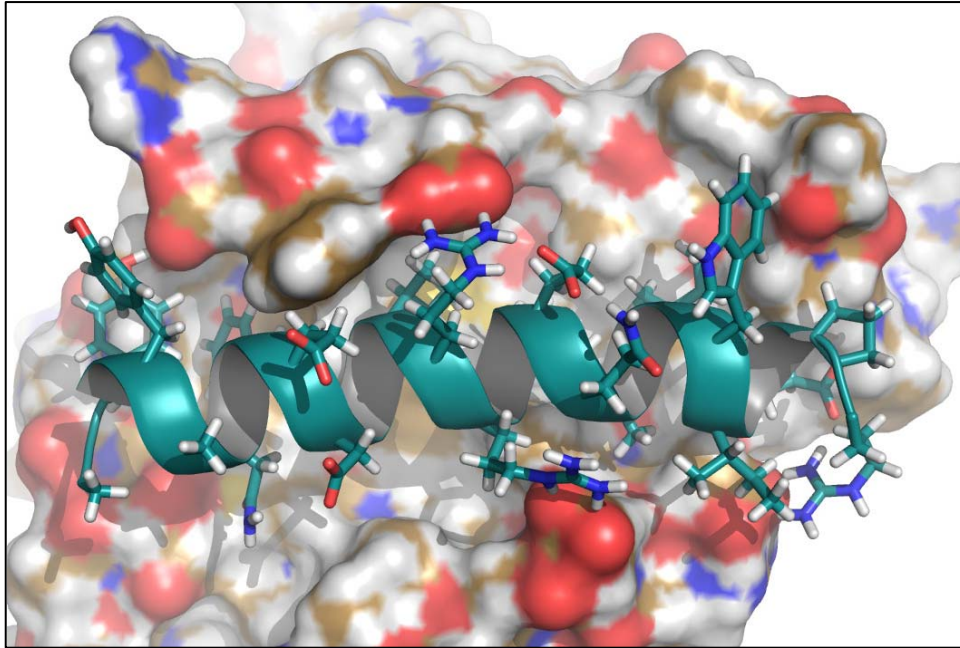
comparteixen (73, 78, 79). Els membres antiapoptòtics, on s'inclouen les proteïnes Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 i A-1 conserven els quatre dominis d'homologia. Els proapoptòtics, en canvi, es divideixen en els que comparteixen més d'un domini (com ara Bax, Bak i Bok) i aquells que únicament conserven el domini BH3 (entre altres Bad, Bik, Bid, Noxa i Puma), denominats també proteïnes *BH3-only*. Tot i que aquesta és la classificació més estesa, estudis recents apunten a la existència d'un domini BH4 en la proteïna Bax, tot i no pertànyer al grup de les antiapoptòtiques (80).

Les interaccions entre els membres de la família Bcl-2 juguen un paper crucial en la regulació de la mort cel·lular programada. Una característica fonamental d'aquestes proteïnes és la seva habilitat per formar dímers, tant homodímers com heterodímers entre proteïnes pro- i antiapoptòtiques, on s'antagonitzen les respectives funcions. De fet, la concentració relativa de membres pro- i antiapoptòtics en la membrana mitocondrial externa resulta és la que determina la susceptibilitat de la cèl·lula de patir apoptosi (72, 81).

El mecanisme intrínsec d'apoptosi (veure Figura 2.4) s'inicia com a resposta a un estres cel·lular que pot ser degut a una gran varietat d'estímuls, com ara danys en el material genètic, radiacions o inclús determinats agents químics. Aquest desencadena la expressió de proteïnes del tipus BH3-only, responsables de l'activació de Bax i Bak (anomenats efectors de l'apoptosi), i amb ella, la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (82). El procés pel qual té lloc aquesta activació i permeabilització de la membrana cel·lular és encara avui dia motiu d'una gran controvèrsia (76, 83). El mecanisme més acceptat consisteix en que existeixen dos tipus de proteïnes BH3-only. Les primeres activen els membres efectors de l'apoptosi per unió directa mentre que les del segon tipus activen Bak i Bax per inhibició dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2, que s'encarreguen de retenir aquestes proteïnes inhibint la seva funció (82). En qualsevol dels casos, l'activació dels efectors acaba conduint a la seva inserció en la membrana mitocondrial externa i un canvi conformacional que permet la formació d'oligòmers. Són aquests oligòmers els que comprometen la integritat de la membrana mitocondrial i permeten l'alliberament de factors proapoptòtics com el citocrom C o la proteïna Smac/Diablo, que inicien la cadena d'activació de les caspases i amb ella, la mort cel·lular.







**Figura 2.5.** Interacció típica entre el membres de la família Bcl-2. La figura il·lustra el complex entre el pèptid proapoptòtic Bim i la proteïna antiapoptòtica Bcl- $x_L$

La comprensió de les interaccions que s'estableixen en el procés de dimerització dels membres de la família de Bcl-2 resulta crucial per poder intervenir en la regulació de la apoptosi. Les estructures disponibles experimentalment revelen un patró d'unió conservat per a la formació de dímers entre membres de la família Bcl-2, tant per a les proteïnes BH3-only com les multidomini. Els membres antiapoptòtics presenten un lloc d'unió hidrofòbic, constituït per les hèlixs dels dominis BH1, BH2 i BH3, on s'uneix la cara hidrofòbica de la hèlix que constitueix el domini BH3 del segon monòmer (74, 79). La Figura 2.5 il·lustra un exemple d'interacció típica d'aquest tipus de dímers entre la proteïna antiapoptòtica Bcl- $X_L$  i el pèptid proapoptòtic Bim, que s'inclou dins de les proteïnes del tipus *BH3-only*.

Nombrosos estudis apunten que reproduir les interaccions que s'estableixen entre els membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 i el domini BH3 dels membres proapoptòtics resulta crucial per al restabliment de l'apoptosi. En aquest sentit, l'habilitat de pèptids sintètics basats en el domini BH3 de membres proapoptòtics per dimeritzar amb els membres antiapoptòtics i produir apoptosi ha estat demostrada en diversos treballs (16, 72, 83, 85).



## Optimització in silico de compostos antitumorals

Malauradament, la utilització de pèptids amb finalitat terapèutica presenta encara certes limitacions. Degut al seu elevat pes molecular, en la majoria de casos presenten una baixa solubilitat i permeabilitat limitada. A més, solen tenir un temps de vida curt dins de l'organisme degut a la baixa estabilitat davant la degradació proteolítica. És per aquest motiu que la majoria d'esforços en aquest camp van orientats a la obtenció de petites molècules mimètiques d'aquests dominis BH3.

Seguint aquesta estratègia, diferents grups han demostrat la efectivitat de petites molècules inhibidores de la família Bcl-2 (86, 87). Les metodologies emprades en la seva obtenció han estat diverses, des del cribratge massiu experimental, cribratge virtual de bases de dades, utilització de productes naturals que mimetitzen les hèlixs alfa, combinació d'aproximacions estructural i computacionals, estudis de RMN, etc. Actualment, tots els compostos descrits presenten activitat inhibidora de l'ordre del micromolar, llevat d'un que presenta activitat nanomolar (88). Existeix també un antisentit contra el gen Bcl-2 en fase III del desenvolupament clínic i varies petites molècules en fase preclínica i fase clínica I (89).

## 2.2 EL CICLE CEL·LULAR: LES QUINASES DEPENDENTS DE CICLINA 4 I 6.

A dia d'avui, un gran nombre de publicacions científiques ressalten la implicació d'una mala coordinació del procés de divisió cel·lular en el desenvolupament de processos tumorals (90). La suma d'alteracions en el control del cicle cel·lular acaba desencadenant no només una proliferació incontrolada, sinó també un augment d'alteracions genètiques en l'ADN d'aquestes cèl·lules, que contribueix a l'evolució del tumor i la seva malignitat.

El cicle cel·lular permet la reproducció de les cèl·lules i la transmissió del seu material genètic cap a la següent generació. Aquest procés es basa en una sèrie de reaccions enzimàtiques coordinades que es troben sotmeses a estrictes mecanismes de regulació per tal de disminuir el risc d'aberracions cromosòmiques i mantenir la estabilitat del ADN al llarg de les generacions filles (91-93). En les cèl·lules eucariotes aquest procés es compon de quatre fases diferenciades (veure Figura 2.6): la fase mitòtica (M), una etapa de síntesi d'ADN (S) i dues fases de transició entre elles (en anglès, *gap phases*:  $G_1$  i  $G_2$ ) durant les quals la cèl·lula sintetitza, reuneix i organitza els elements necessaris per a dur a terme la següent fase.

El procés de proliferació s'inicia amb un creixement de la cèl·lula, conegut com a fase  $G_1$ , durant el qual té lloc una duplicació del contingut cel·lular (llevat dels cromosomes) necessària per a la replicació del material genètic. Després del període de preparació, la cèl·lula entra en la fase S, etapa en que té lloc el procés de duplicació de l'ADN, quedant cada cromosoma constituït com a dues cromàtides idèntiques. Seguidament, es succeeix la fase  $G_2$ , període durant el qual la cèl·lula pot reparar els errors sorgits en la duplicació del ADN, evitant així la seva transmissió a les cèl·lules filles. A més, durant aquesta etapa continua la síntesi de ARN i proteïnes necessàries per a poder avançar cap a la etapa final: la mitosi. Durant la fase M, la cèl·lula es separa fins a dividir-se en dues cèl·lules filles, en un principi, idèntiques a la progenitora. Un cop finalitzat el procés de divisió, cadascuna de les noves cèl·lules pot tornar a dividir-se entrant en fase  $G_1$  o bé sortir del cicle cel·lular i entrar en un estat de latència (anomenat fase  $G_0$ ).

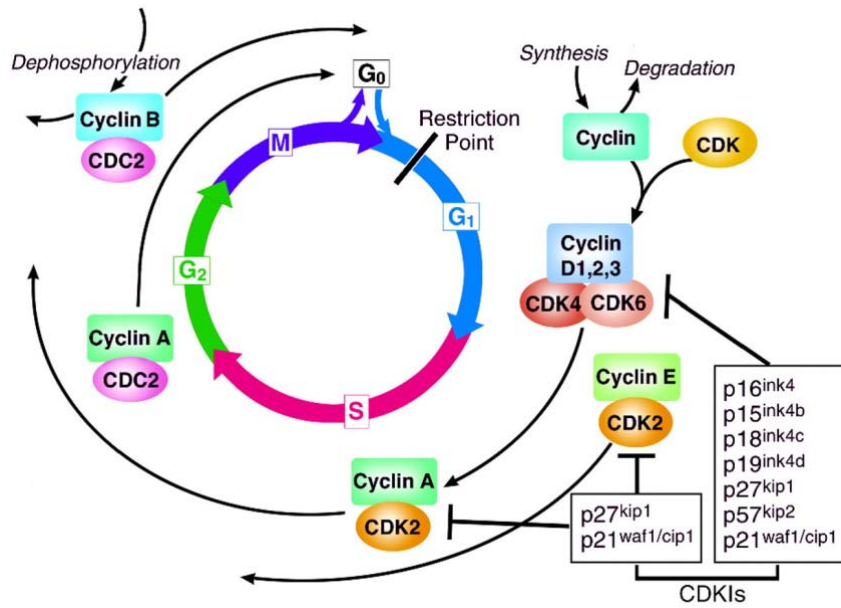


Figura 2.6. Procés de divisió cel·lular en organismes eucariotes (94).

L'existència d'etapes de preparació prèvies als processos principals permet una progressió del cicle cel·lular estrictament regulada. La presència de nombrosos punts de control distribuïts en les diferents etapes de les que es compona el cicle determina si el procés de divisió pot prosseguir o, pel contrari, s'ha detenir ja que no es compleixen els requisits necessaris per una proliferació cel·lular adequada (95, 96). La regulació del cicle cel·lular té lloc mitjançant l'activació de complexes cascades de senyalització on, per a cada transició, intervenen holoenzims específics. Els complexos de Quinases Dependents de Ciclina (en anglès, *Cyclin-Dependent Kinases* o CDKs) estan presents en diversos punts de control i es podria considerar que aquestes proteïnes són les principals responsables de l'entrada i coordinació del cicle cel·lular.



Figura 2.7. Formació del complex actiu de les proteïnes CDK4/6.

Les CDKs són petites proteïnes d'entre 3 i 40 kDa que pertanyen a la família de les Serina/Treonina Quinases. Aquestes proteïnes, són inactives com a monòmers ja que constitueixen únicament el domini catalític del complex actiu (veure Figura 2.7). La seva activació requereix d'una banda, la fosforilació d'un determinat residu per part de la Quinasa Activadora de CDKs (en anglès *Cyclin-dependent Activating Kinase* o CAK) i d'altra, la formació d'un complex heterodimèric amb les seves respectives subunitats reguladores, conegudes com a ciclines (97). Les ciclines són una família molt diversa de proteïnes que es caracteritzen perquè són sintetitzades i degradades en moments específics del cicle cel·lular. La unió amb la corresponent CDK activa la seva funció catalítica i amb ella, la progressió del cicle cel·lular. Existeixen també les corresponents proteïnes inhibidores (anomenades CDKI, de *CDK Inhibitors*) actuen com a reguladors negatius del cicle cel·lular i detenen la progressió de la cèl·lula cap a la següent fase(98). Dins d'aquesta categoria, trobem les proteïnes de la família de INK4 (principalment p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> i p19<sup>Ink4 days</sup>), que s'uneixen per inhibir les CDKs associades a ciclina D (CDK2, CDK4 i CDK6), i les proteïnes de la família CIP/KIP (entre les quals trobem p21<sup>waf1</sup>, p27<sup>kip1</sup> o p57<sup>kip2</sup>) que actuen sobre altres complexos de CDK2. Així, la dinàmica del procés de proliferació cel·lular vindrà determinada per les formes actives o inactives dels complexos CDK-Ciclina.

Un millor coneixement dels mecanismes de regulació del cicle cel·lular permet seleccionar noves dianes per al desenvolupament racional de nous fàrmacs antitumorals (99). La transició entre les fases G<sub>1</sub> a S és un punt del cicle cel·lular freqüentment afectat en els processos tumorals. De fet, els gens que codifiquen per a proteïnes involucrades en aquesta transició, coneguda com la via de ciclina/CDK/pRb, es troben alterats en un 80% de neoplàsies humanes (100). Aquesta transició resulta d'especial importància ja que, durant la fase G<sub>1</sub>, el procés de divisió cel·lular es veu controlat per senyals mitogènics extracel·lulars però un cop la cèl·lula entra en fase S, el procés de divisió esdevé independent i prossegueix fins completar-se (101, 102). En aquest cas, únicament errors greus en la duplicació de l'ADN conduïrien la cèl·lula a la mort, detenint el procés de proliferació (103). Per tant, la intervenció d'aquesta transició resulta necessària per a detenir el procés de replicació cel·lular.

A l'inici de la fase  $G_1$ , com a conseqüència de factors de creixement extracel·lulars, es promou la síntesi de ciclins de tipus D que s'uneixen selectivament a les proteïnes CDK4 i CDK6 (104). Per a l'assemblatge del complex actiu CDK-Ciclina és necessària la intervenció de les proteïnes de la família Cip/Kip, alhora inhibidores de CDK2 (105, 106), i del complex CDK7-Ciclina H (més conegut com a CAK) que fosforil·la un determinat residu de treonina (Thr172 i Thr177 per CDK4 i CDK6, respectivament) (107). La successió d'aquest processos induïx uns canvis conformacionals en la CDK necessaris per a exercir la seva activitat quinasa (108-110).

El procés de divisió cel·lular esdevé independent de les senyals mitogèniques externes en el moment en que el supressor de tumors pRb (proteïna Retinoblastoma), substrat de CDK4 i CDK6, s'inactiva per fosforilació (veure Figura 2.8). En la seva forma activa (no fosforil·lada), el pRb reté els factors de transcripció de la família E2F i HDAC (111). Quan la proteïna és hipofosforil·lada per CDK4 o CDK6, allibera els factors de transcripció HDAC que induïxen la transcripció de ciclins de tipus E. Aquestes s'uneixen amb CDK2 per a donar un complex actiu que hiperfosforil·la el pRb. Arribat aquest punt, s'alliberen els factors E2F i el cicle entra definitivament en la fase de síntesi de ADN (102).

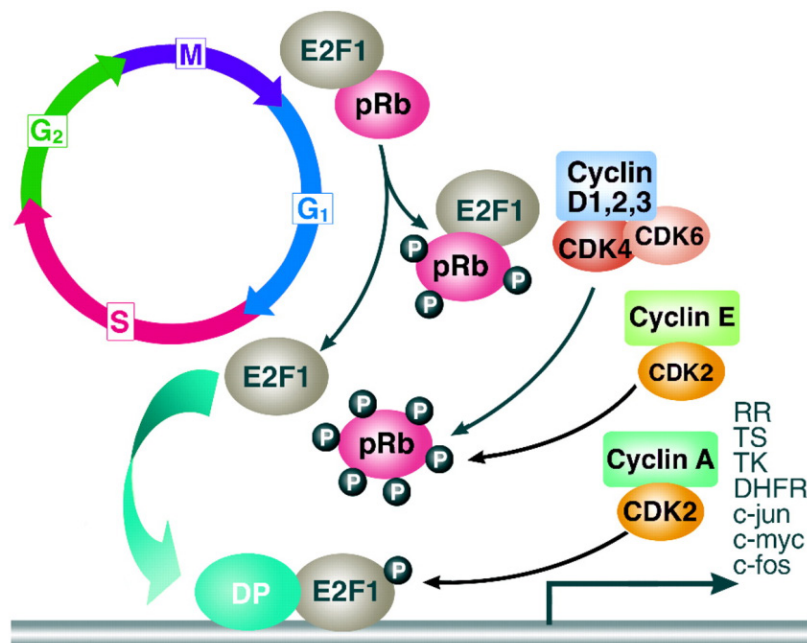


Figura 2.8. Regulació de la transició de fases  $G_1/S$  (94).

El fet de que únicament les cèl·lules aturades en fase G<sub>1</sub> presentin la possibilitat de sortir de cicle cel·lular fa de les proteïnes implicades en la transició cap a la següent fase un objectiu terapèutic idoni per al disseny de fàrmacs. Existeixen nombroses evidències experimentals que apunten a que les proteïnes CDK4, CDK6 i CDK2 no són essencials per al cicle cel·lular dels mamífers ja que, quan qualsevol d'aquestes proteïnes és inhibida de manera independent, la cèl·lula desenvolupa vies compensatòries per a completar el cicle de divisió (112). Afortunadament, aquestes proteïnes resulten imprescindibles per a la proliferació de determinats tipus de cèl·lules, entre elles, les tumorals (90). El potencial de CDK2 com a diana antitumoral ha quedat patent en nombroses publicacions (113-115). No obstant, els estudis més recents, han desviat l'atenció cap a les proteïnes CDK4 i CDK6, ja que actuen en etapes anteriors de la regulació del cicle cel·lular. A més, és possible assolir una selectivitat més alta per aquestes proteïnes que per altres com CDK1 o CDK2 (116), el que suposaria una reducció dels efectes adversos.

Existeixen dues estratègies per impedir l'activitat quinasa d'aquestes proteïnes: atacar directament la subunitat catalítica o intervenir en els mecanismes naturals de regulació. La primera consisteix en trobar petites molècules que competeixin amb l'ATP pel centre catalític de la proteïna i, avui dia, és la que es troba més avançada. De fet, la majoria d'inhibidors de CDKs existents, alguns d'ells en fase clínica, són competidors de l'ATP (117). Tot i això, degut a la gran quantitat de quinases existents en l'organisme, les interaccions amb altres proteïnes són molt freqüents en aquest tipus de compostos i cap d'ells ha estat aprovat per a l'ús comercial pel gran nombre d'efectes secundaris que presenten (118). Malgrat aquest inconvenient, s'han produït grans avenços en aquest camp i s'han sintetitzat molècules que presenten una elevada selectivitat cap a CDK4 i CDK6 (119-125).

Una segona estratègia, és imitar l'acció de l'inhibidor natural p16<sup>INK4A</sup>, que s'uneix a aquestes proteïnes en una zona diferent de l'ATP, distorsionant el centre actiu (126). Avui dia només es coneixen complexos d'aquest inhibidor amb les proteïnes CDK4 i CDK6, el que fa pensar que la utilització d'aquesta estratègia és altament específica per inhibir selectivament aquestes proteïnes. A més, es coneix que la disminució o anul·lació total dels nivells normals de p16<sup>INK4A</sup> en les cèl·lules es troba implicada en

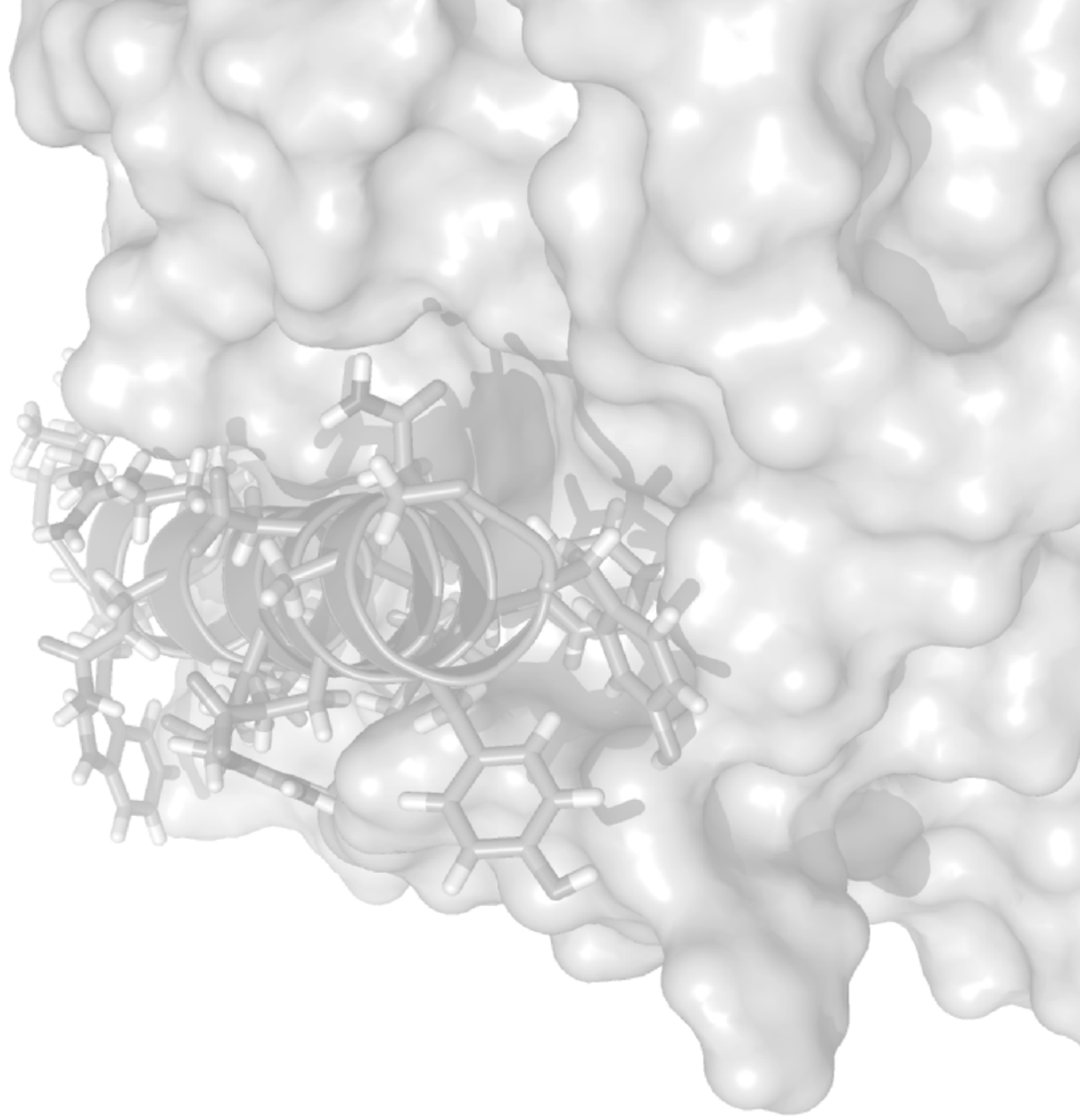
molts processos tumorals (96, 127). Tot i que aquesta alteració no és suficient per induir un procés tumoral, el restabliment dels nivells normals mitjançant la introducció de p16<sup>INK4A</sup> exògen permet detenir la cèl·lula en fase G<sub>1</sub> i, amb això, el procés de proliferació cel·lular (128). Aquests fets, inciten a pensar que aquestes molècules podrien ser no només selectives per a les proteïnes CDK4 i CDK6, sinó a més, per cèl·lules on els nivells de p16<sup>INK4</sup> fossin inferiors a l'estàndard, és a dir, cèl·lules tumorals. Seguint aquesta estratègia, a partir de la seqüència del p16<sup>INK4A</sup> humà, s'han desenvolupat pèptids agonistes que exerceixen la mateixa funció que el inhibidor natural en el control de la transició G<sub>1</sub>/S (13, 14). Actualment, encara no s'ha trobat cap petita molècula capaç d'imitar la forma d'unió de p16<sup>INK4A</sup>.

Així doncs, segons la selectivitat que presenten, s'han descrit diferents tipus d'inhibidors de CDKs. A més, encara avui dia existeix una gran controvèrsia sobre la necessitat d'inhibidors selectius per a certs membres de la família. El principal problema de dissenyar inhibidors selectius és que la cèl·lula pot desenvolupar vies alternatives per a completar el cicle cel·lular. No obstant, per als pan-inhibidors freqüentment s'han reportat problemes de toxicitat. Algunes referències apunten, fins i tot, a les teràpies combinades de inhibidors de CDKs amb altres agents citotòxics com la estratègia més efectiva per al tractament del càncer (118).









**RESTABLIMENT DE L' APOPTOSI:**

**LA FAMÍLIA BCL-2**



## CAPÍTOL III. RESTABLIMENT DE L'APOTOSI

L'evasió dels mecanismes d'apoptosi és una de les principals característiques dels processos tumorals, freqüentment deguda a una activitat excessiva dels membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2. En conseqüència, la regulació de l'activitat d'aquestes proteïnes s'ha presentat durant els darrers anys com una estratègia interessant en el disseny de noves teràpies antitumorals (129, 130).

Aquestes proteïnes es caracteritzen perquè totes elles comparteixen al menys un dels quatre dominis d'homologia (BH1-4, en anglès, *Bcl-2 Homology domains*) presents en tots els membres de la família i, segons la seva funció, es poden classificar en anti- i proapoptòtiques. Així, algunes d'aquestes proteïnes (com ara Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1 i A-1) promouen la supervivència cel·lular mentre que altres (entre que les s'inclouen Bad, Bak, Bax, Bid, Bik, Bim, Hrk, Noxa o Puma) afavoreixen la mort cel·lular.

Les proteïnes de la família Bcl-2 estan considerades com a punts clau en la regulació dels mecanismes d'apoptosi (74, 77). Tot i que el mecanisme pel qual té lloc aquesta regulació encara no es coneix amb exactitud, el fet de que els membres anti- i proapoptòtics de la família de Bcl-2 regulen la seva funció per heterodimerització (131) es troba extensament acceptat. L'anàlisi de les estructures experimentals disponibles per a complexos dels membres antiapoptòtics amb altres proteïnes de la família revela un patró d'unió altament conservat. Els membres antiapoptòtics presenten una cavitat d'unió hidrofòbica on la hèlix corresponent al domini BH3 dels membres proapoptòtics s'uneix (132-134).

## Optimització in silico de compostos antitumorals

Sota aquesta premissa, petites molècules capaces d'imitar les interaccions establides en aquests dímers haurien de ser capaces d'unir-se als membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, inhibint així la seva funció. En el disseny d'aquestes molècules, un dels principals aspectes a tenir en compte és que els dominis BH3 dels diferents membres proapoptòtics presenten certa selectivitat envers les proteïnes antiapoptòtiques (veure Taula 3.1) (85). Alguns pèptids BH3, com Bim o Puma, s'uneixen als cinc membres antiapoptòtics de la família amb una afinitat similar, mentre que altres, presenten certa preferència per els membres d'alguna de les subfamílies. Així, per exemple, Bad s'uneix amb gran afinitat a Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w, però no a Mcl-1 i A-1. Contràriament, Noxa té unes constants d'afinitat de l'ordre del nanomolar per Mcl-1 i A-1, però no presenta activitat detectable per als altres membres de la família.

<b>Pèptid BH3</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>Bcl-x<sub>L</sub></b>	<b>Bcl-w</b>	<b>Mcl-1</b>	<b>A-1</b>
<b>BimBH3</b>	2.6	4.6	4.3	2.4	4.3
<b>BadBH3</b>	16	5.3	30	>100.000	>15.000
<b>NoxaBH3</b>	>100.000	>100.000	>100.000	24	180

**Taula 3.1.** Valors experimentals de l'afinitat d'enllaç (Ic50 en nanomolar) envers els cinc membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 per als pèptids BH3 objecte del present estudi Bim, Bad i Noxa.

Malauradament, diferents teixits de l'organisme poden sobreexpressar de manera diferent les proteïnes antiapoptòtiques, per tant, el disseny de compostos capaços d'imitar determinats pèptids BH3 com agents antitumorals selectius d'un determinat teixit es presenta com una estratègia interessant (135). Existeixen una gran quantitat de treballs experimentals que intenten correlacionar la selectivitat d'aquests pèptids amb la seva seqüència d'aminoàcids. De fet, la determinació de les afinitats experimentals de pèptids basats en el domini BH3 d'aquestes proteïnes per als diferents membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 és un camp de recerca molt actiu (85, 136, 137).

Les seqüències dels pèptids BH3 coneguts a dia d'avui són molt variables, però encara no ha estat possible extreure conclusions rellevants sobre la seva influència en la selectivitat. En aquest punt, estudis teòrics sobre el seu mode d'unió poden ajudar

considerablement a elucidar el patró d'unió característic dels diferents tipus de pèptids.

Tot i la importància de dissenyar pèptids mimètics del domini BH3 selectius per al restabliment dels mecanismes d'apoptosi en un determinat teixit, alguns estudis apunten a que únicament la combinació de determinats pèptids BH3 és capaç de produir la mort cel·lular (85). En aquest marc es plantegen dues possibles estratègies: dissenyar compostos inhibidors que actuïn sobre tots els membres antiapoptòtics o bé, utilitzar una teràpia combinada d'inhibidors selectius de cadascuna de les subfamílies que pot ser adaptada en cada cas.

En aquest marc, donat que el pèptid BimBH3 s'uneix amb afinitat similar a tots els membres antiapoptòtics de la família Bcl-2, la finalitat del primer treball contingut en aquest capítol es determinar quines són les interaccions implicades en aquesta unió per tal de poder utilitzar-les com a patró en la cerca de petites molècules inhibidores que serien efectives davant tota la família de proteïnes. Paral·lelament, es van analitzar les interaccions específiques establertes entre els pèptids selectius BadBH3 i NoxaBH3 amb les respectives proteïnes antiapoptòtiques per al disseny de teràpies combinades, objectiu del segon estudi presentat. Els resultats obtinguts en base a cadascuna d'aquestes estratègies es presenten en les seccions 3.1 i 3.2 d'aquest capítol.

Alguns estudis experimentals recolzen la idea de que les interaccions intermoleculares establides entre aquestes proteïnes no són suficients per a explicar els valors experimentals trobats per a les afinitats d'enllaç. De fet, després d'analitzar l'habilitat de diferents pèptids derivats del domini BH3 de la proteïna proapoptòtica Bax de trencar la seva heterodimerització amb Bcl-2 i Bcl-x<sub>L</sub>, Shangary i col·laboradors van arribar a la conclusió de que un alt contingut helicoidal d'aquests pèptids estava implicat en un increment en la seva activitat biològica, tot i no ser l'únic factor determinant (79).

En aquest marc, existeixen diferents estudis que corroboren l'increment de l'afinitat de pèptids mimètics dels dominis BH3 a causa d'estratègies d'estabilització de la conformació helicoidal (138-140). Entre elles, l'aminoàcid sintètic  $\alpha$ -aminoisobutíric (Aib) és considerat habitualment com un residu altament helicogènic per la seva

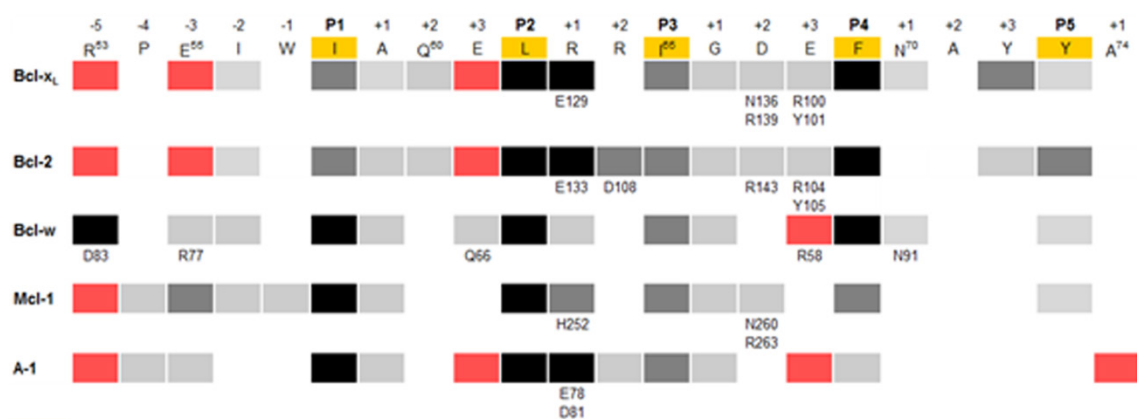
habilitat de induir plegaments helicoïdals en seqüències tant natural com sintètiques (141-143). Així, la substitució dels residus que no interaccionen d'un pèptid derivat d'un domini BH3, hauria d'afavorir la helicitat i amb això, incrementar la seva afinitat per unir-se a les proteïnes antiapoptòtiques.

Dins d'aquest context, les tècniques computacionals permeten assolir una millor comprensió d'aquests efectes tan complexos. Mitjançant simulacions teòriques és possible revelar el comportament dinàmic d'aquests pèptids, tant naturals com sintètics, així com la seva habilitat per interaccionar amb els membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2. A partir d'aquestes simulacions es pot analitzar l'espai conformacional explorat pels pèptids així com predir les corresponents afinitats d'enllaç. Amb aquests coneixements adquirits, els millors pèptids candidats, predits teòricament, poden ser posteriorment sintetitzats i avaluats experimentalment.

L'objectiu de la tercera part d'aquest capítol consisteix en obtenir pèptids derivats del domini BH3 de la proteïna proapoptòtica Bak i tractar d'incrementar la seva afinitat per la proteïna Bcl-X<sub>L</sub> afavorint a la formació d'hèlixs. Amb aquest propòsit, s'han emprat eines computacionals per analitzar el complex entre la proteïna Bcl-X<sub>L</sub> i el pèptid natural Bak així com per identificar les interaccions determinants en la unió. Posteriorment, s'han proposat pèptids sintètics derivats de la substitució dels residus prescindibles de Bak per residus de Aib amb l'objectiu d'incrementar la propensió a la helicitat. S'han realitzat també simulacions teòriques del comportament d'aquests pèptids sintètics i dels seus complexos amb Bcl-X<sub>L</sub>. A partir d'elles, s'ha estimat l'afinitat teòrica per aquests i aquells predits amb una millor afinitat que Bak, han estat sintetitzats i estudiats experimentalment. A més la helicitat del pèptid natural i derivats sintètics s'estudiarà tant a nivell teòric com experimental per a tractar d'extreure conclusions sobre la seva implicació en l'afinitat dels pèptids.

### 3.1 DETERMINANTS MOLECULARS DE LA UNIÓ DEL PÈPTID BIMBH3 AMB LES PROTEÏNES ANTIAPOPTÒTIQUES

Els resultats obtinguts en aquest estudi apunten a que la unió entre Bim(BH3) i les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1 i A-1 ve principalment governada per interaccions de tipus hidrofòbic. Aquestes provenen majoritàriament de quatre residus hidrofòbics del pèptid (situats en posicions P1-P4) que ocupen les quatre cavitats hidrofòbiques característiques del lloc d'unio d'aquestes proteïnes. En els diferents complexos estudiats s'ha observat que mentre que la contribució dels residus en posició P2 i P3 és relativament constant en tota la família, la participació del aminoàcids en posició P1 i P4 varia en els diferents complexos (veure Figura 3.1).

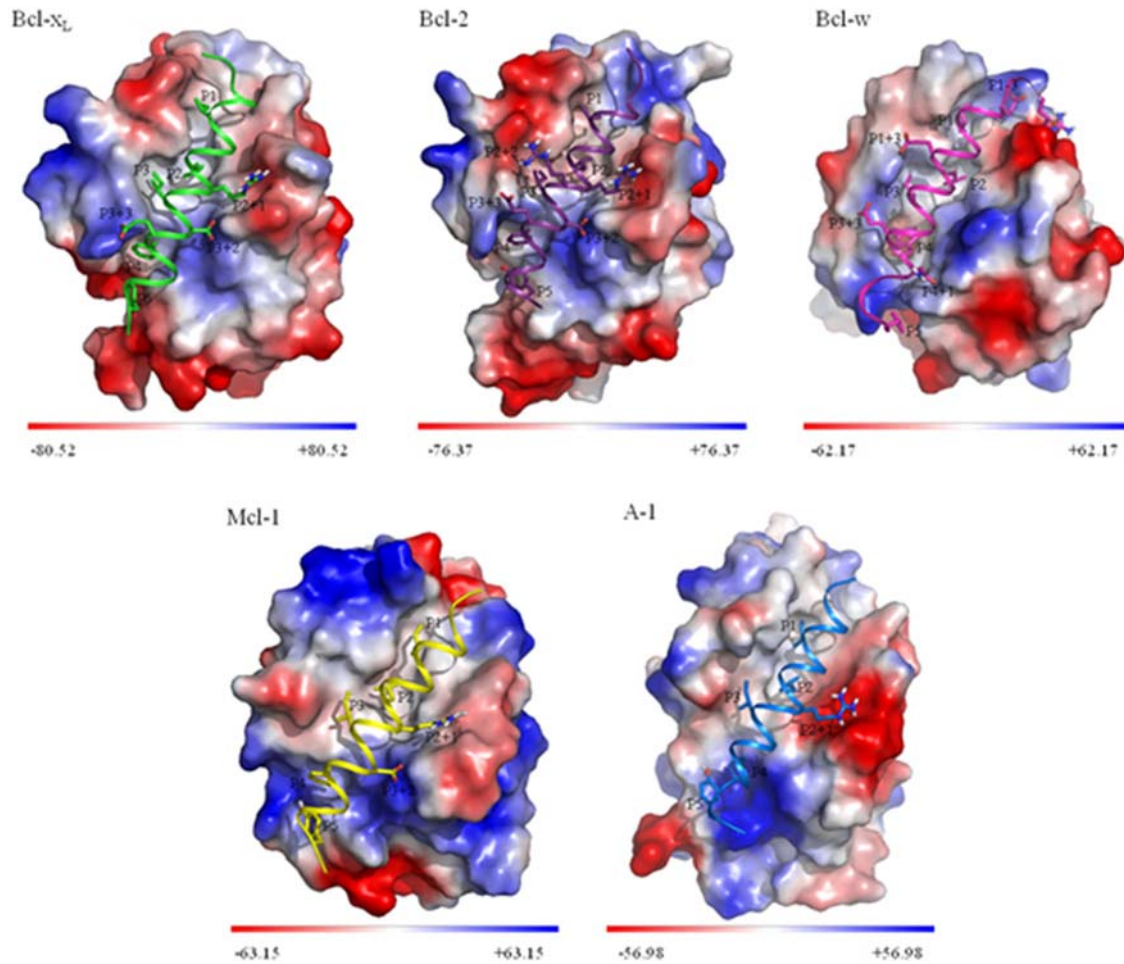


**Figura 3.1.** Contribucions dels residus de Bim(BH3) a la formació dels complexos amb les diferents proteïnes antiapoptòtiques. En vermell es mostren els residus amb una contribució desfavorable mentre que aquells que contribueixen favorablement es mostren en escala de gris: en negre (> 5 kcal/mol), gris fosc (entre 3 i 5 kcal/mol) i gris clar (entre 1.2 i 3 kcal/mol). Es mostren també els residus de la proteïna que es troben formant ponts d'hidrogen amb el pèptid.

La contribució més gran d'aquests quatre residus ve per part de la posició P2, corresponent a una leucina altament conservada en la seqüència de tots els pèptids BH3 coneguts fins a dia d'avui. De fet, estudis experimentals demostren que la mutació d'aquest residu resulta determinant en la pèrdua d'afinitat per aquestes proteïnes (86, 132, 144, 145). Contràriament la contribució dels residus en posició P1 i P4 sembla ser característica de cada subfamília de proteïnes i mentre que el residu P1 és més important en Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 i Bcl-w, la contribució del residu en P4 sembla ser més important per a Mcl-1 i A-1. Tot i això, els residus en posició P1 i P4 no semblen ser els



únic responsables de la selectivitat ja que Bim(BH3) i Bmf(BH3) contenen els mateixos aminoàcids en aquestes posicions i mentre Bim uneix tota la família de Bcl-2, Bmf s'uneix dèbilment a Mcl-1 i A-1 (85).



**Figura 3.2.** Interaccions electrostàtiques més importants en els complexos de Bim(BH3) amb les cinc proteïnes antiapoptòtiques. Es mostren les superfícies electrostàtiques calculades amb PyMol(146) i els residus del pèptids més rellevants.

Malgrat que la unió de Bim(BH3) a les proteïnes antiapoptòtiques és majoritàriament hidrofòbic, les interaccions electrostàtiques contribueixen a incrementar la força de l'enllaç. Per aquest tipus d'interaccions, no s'ha trobat un patró d'interacció definit per a totes les proteïnes de la família, ni tan sols per a les diferents subfamílies. Així, fins i tot la contribució del residu d'aspàrtic corresponent al doblet GD conservat en els pèptids BH3 només sembla rellevant en la formació dels complexos de Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 i Mcl-1 (veure Figura 3.2). És d'esperar, per tant, que aquest tipus d'interaccions es trobin involucrades, a llarga distància, en processos de

reconeixement entre aquestes proteïnes o fins i tot, en assolir la orientació del pèptid adequada per a la unió.

Un altre aspecte important derivat del present treball és que tot i que les interaccions rellevants per a la formació dels complexos de proteïnes antiapoptòtiques amb Bim(BH3) es troben distribuïdes al llarg de tot el pèptid, les interaccions en el extrem C-terminal semblen tenir més pes per als complexos de Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-2, mentre que les del extrem N-terminal són més importants per a Mcl-1 i A-1, trobant-se Bcl-w en una situació intermitja entre ambdós casos. Aquestes distincions poden ser característiques de la diferent selectivitat que presenten aquestes proteïnes per als diferents pèptids BH3.

En conclusió, podríem dir que la contribució dels diferents residus del pèptid no només depèn de les característiques del lloc d'unió de la proteïna a la que es troba unit sinó també dels residus pròxims del propi pèptid. Aquest fet posa de manifest la dificultat de dissenyar inhibidors que siguin capaços d'interaccionar amb totes les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2. Tot i això, els resultats obtinguts en aquest treball apunten que reproduir les interaccions dels residus en posició P2 i P3 juntament amb la càrrega negativa que es troba en posició P3+2 donaria un patró d'interacció compartit per en tots els complexos estudiats.

Els resultats obtinguts s'inclouen en el **article 1**:

**Molecular Determinants of Bim(BH3) Peptide Binding to Pro-Survival Proteins**

Laura Delgado-Soler, Marta Pinto, Jaime Rubio-Martínez,

*Computed-Aided Molecular Design*, (2011), *enviat*.



# Molecular determinants of Bim(BH3) peptide binding to pro-survival proteins

Laura Delgado-Soler, Marta Pinto and Jaime Rubio-Martínez\*

## ABSTRACT

*Proteins of the Bcl-2 family regulate apoptosis through the formation of heterodimers between antiapoptotic or pro-survival proteins and proapoptotic or pro-death proteins. Overexpression of antiapoptotic proteins not only contributes to the progression of many cancers, but also confers resistance to the chemo- and radiotherapeutic treatments. It has been demonstrated that peptides containing the BH3 domain of proapoptotic Bcl-2 family members are able to bind and inhibit antiapoptotic proteins. This is the reason why in the last years, the design of small molecules mimicking the BH3 domain of proapoptotic proteins has emerged as a promising therapeutic strategy for cancer treatment. However, BH3 domains exhibit different affinities for binding to antiapoptotic proteins; whereas Bim(BH3) and Puma(BH3) are able to bind all antiapoptotic proteins, others like Bad(BH3) and Bmf(BH3) show preference for some proteins over others. Consequently, the ability of a BH3-mimetic to kill tumor cells will depend on the BH3 peptide used as template. In order to overcome this limitation, the present work was aimed to elucidate the molecular determinants of Bim(BH3) binding to Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1 and A-1 antiapoptotic proteins. For this purpose, we used the MM-PB/GBSA approaches to calculate the binding free energy of the different complexes studied and to determine which residues of the peptide have the largest contribution to complex formation. Results obtained in the present work show that the binding of Bim(BH3) to pro-survival proteins is mainly hydrophobic and that specific interactions are fully distributed along the peptide sequence.*

**Computed-Aided Molecular Design, (2011), enviat.**



### 3.2 CAP AL DISENY DE TERÀPIES COMBINADES PER RESTABLIR L'ACTIVITAT DE BCL-2

Diferents estudis suggereixen la necessitat d'intervenir al menys un membre de cada subfamília de Bcl-2 per a desencadenar els mecanismes d'apoptosi cel·lular. Malgrat això, depenent del tipus de càncer o teixit, és possible trobar diferents nivells de proteïnes antiapoptòtiques. Per aquest motiu, identificar les interaccions rellevants per a la inhibició dels diferents tipus de proteïnes antiapoptòtiques resulta imprescindible per al disseny d'inhibidors selectius de cadascuna d'aquestes subfamílies. Aquests compostos podran posteriorment ser utilitzats en teràpies combinades personalitzades d'acord amb el perfil proteic d'un determinat procés tumoral. Dins d'aquest propòsit, el present estudi s'orienta a l'anàlisi de les interaccions establertes entre pèptids BH3 selectius per a cadascuna de les subfamílies (Bad i Noxa) i les corresponents proteïnes antiapoptòtiques.

Tal i com s'ha descrit en nombrosos treballs experimentals (81, 85, 135) la unió dels pèptids BH3 ve governada principalment per interaccions de van der Waals. A més, l'energia d'unió estimada teòricament (veure Taula 3.2) es troba totalment correlacionada amb les afinitats experimentals mostrades a la Taula 3.2.

Receptor	VDW	ELE	PBSUR	PBCAL	PBTOT
Bcl-2	-111.62	-319.37	-12.75	360.78	-82.96
Bcl-x <sub>L</sub>	-117.75	-398.01	-13.24	429.32	-99.68
Bcl-w	-104.26	-227.05	-12.83	282.96	-63.68
Mcl-1	-105.85	-190.75	-12.81	228.99	-80.41
A-1	-71.89	-187.78	-10.40	208.87	-61.20

**Taula 3.2.** Diferents termes (en kcal/mol) de la equació de MM-PBSA utilitzada per a estimar l'energia d'unió dels diferents membres antiapoptòtics amb els respectius pèptids BH3: Bad per Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w; i Noxa per Mcl-1 i A-1.

Tot i treballar amb pèptids selectius, els resultats mostren que els punts d'interacció més importants són comuns per a tota la família de Bcl-2 (les contribucions de cada residu dels pèptids es mostren a la Figura 3.3). Les quatre cavitats hidrofòbiques característiques del lloc d'unió es troben ocupades per quatre residus hidrofòbics, en aquest cas Y110, L114, M117 i F121, per Bad, i C25, L29, F32 i L36 per Noxa. En la

## Optimització in silico de compostos antitumorals

majoria de casos, els residus propers també contribueixen a ocupar aquestes cavitats i presenten contribucions hidrofòbiques importants a la formació dels complexos. A més, la arginina en posició central (R115 per Bad i R30 en Noxa) contribueix considerablement a l'energia d'unió degut no només a la formació d'un pont d'hidrogen amb el receptor, sinó també a la contribució hidrofòbica de la cadena lateral del residu.

a)

Bad res	W105	A106	A107	Q108	R109	Y110	G111	R112	E113	L114	R115	R116	M117	S118	D119	E120	F121	V122	D123	S124	F125	K126
Bcl-2	-5.79	-2.60	-3.67	-1.37	-3.28	-8.20	-2.23	-1.07	-2.00	-4.96	-3.75	-0.65	-3.98	-1.98	-0.37	-0.40	-4.56	-0.32	-0.91	-2.53	-1.01	-0.17
Bcl-x <sub>L</sub>	-3.44	-1.39	-3.77	-3.59	-0.60	-5.92	-2.90	-1.58	-0.66	-5.02	-5.36	-0.67	-4.63	-4.07	-0.11	-0.79	-6.93	-2.49	-0.27	-0.86	-3.24	-0.59
Bcl-w	-4.52	-0.63	-1.90	-1.50	-0.65	-6.41	-1.59	-0.63	-1.25	-4.81	-3.71	-0.37	-3.53	-1.79	-0.28	-1.04	-6.45	-3.02	-0.56	-3.92	-1.70	-1.87
Noxa res	E20	L21	E22	V23	E24	C25	A26	T27	Q28	L29	R30	R31	F32	G33	D34	K35	L36	N37	F38	R39	Q40	K41
Mcl-1	-0.39	-2.55	-3.14	-1.66	-1.15	-4.42	-2.97	-1.07	-2.89	-5.98	-5.80	-0.53	-3.84	-2.02	-1.26	-0.29	-2.52	-0.56	-6.15	-2.90	-0.57	-0.31
A-1	-0.31	-3.40	-2.55	-0.51	-1.08	-2.94	-2.06	-0.41	-2.40	-4.69	-1.12	-0.36	-5.02	-1.56	-0.50	-0.36	-3.34	-2.24	-0.17	-0.85	-0.04	-0.05

b)

Bad res	W105	A106	A107	Q108	R109	Y110	G111	R112	E113	L114	R115	R116	M117	S118	D119	E120	F121	V122	D123	S124	F125	K126
Bcl-2	-61.05	0.06	-0.77	1.13	-72.14	-2.54	-2.38	-72.67	69.98	-1.21	-94.21	-69.52	-0.90	-2.70	61.35	63.19	-0.38	0.37	25.05	-1.00	0.04	0.81
Bcl-x <sub>L</sub>	-77.22	0.40	-0.22	-1.65	-60.45	-5.18	-1.80	-93.58	55.04	-2.16	-99.86	-51.88	1.48	1.10	48.20	29.43	0.96	1.58	61.18	-0.42	1.22	-5.18
Bcl-w	-22.76	-0.10	-0.06	-1.30	-24.93	-2.93	-2.61	-41.24	25.53	-2.43	-39.71	-25.35	-0.69	-0.67	17.72	10.88	-1.52	-0.67	19.21	-1.52	-0.85	-17.51
Noxa res	E20	L21	E22	V23	E24	C25	A26	T27	Q28	L29	R30	R31	F32	G33	D34	K35	L36	N37	F38	R39	Q40	K41
Mcl-1	-3.65	-2.64	-42.39	0.08	-27.88	-1.04	-0.53	1.23	-7.04	-0.79	1.55	18.13	0.47	-0.78	-33.91	18.02	-1.63	0.21	0.19	0.41	-0.34	-13.06
A-1	-5.35	0.02	34.81	1.37	22.99	-1.42	-1.28	-1.39	-1.94	-1.97	-86.69	-24.77	-1.84	-2.21	16.92	-22.00	-1.45	-5.24	0.03	-10.66	-0.13	-1.71

c)

Bad res	W105	A106	A107	Q108	R109	Y110	G111	R112	E113	L114	R115	R116	M117	S118	D119	E120	F121	V122	D123	S124	F125	K126
Bcl-2	-1.52	-2.27	-3.22	-0.12	-3.64	-4.21	-0.95	-0.93	-0.24	-4.90	-6.50	-0.79	-3.31	-1.71	1.26	1.15	-3.19	0.01	-1.02	-0.47	-0.53	0.76
Bcl-x <sub>L</sub>	0.82	-0.73	-2.90	-2.32	-0.75	-4.71	-1.72	-5.78	0.56	-4.69	-7.07	-0.44	-3.21	-0.33	-1.21	-0.33	-4.99	-2.31	1.12	0.01	-1.96	0.52
Bcl-w	-2.72	-0.23	-1.30	-0.95	-0.02	-5.21	-1.00	-1.13	0.26	-4.52	-2.04	-0.22	-2.70	-0.18	0.71	1.15	-4.44	-2.33	0.94	-1.96	-0.44	0.01
Noxa res	E20	L21	E22	V23	E24	C25	A26	T27	Q28	L29	R30	R31	F32	G33	D34	K35	L36	N37	F38	R39	Q40	K41
Mcl-1	2.07	-2.66	-0.85	-1.49	-0.3	-3.19	-2.53	-0.39	-1.37	-5.5	-4.92	0.41	-2.53	-0.45	-0.43	0.49	-2.02	0.49	-4.02	-1.81	0.41	0.36
A-1	1.07	-3.38	-0.78	-0.36	0.56	-2.16	-1.97	-0.12	-0.89	-4.35	-11.18	-0.25	-4.45	-1.20	0.65	-0.49	-3.07	-0.99	0.03	-0.65	0.08	0.24

d)

Bad res	W105	A106	A107	Q108	R109	Y110	G111	R112	E113	L114	R115	R116	M117	S118	D119	E120	F121	V122	D123	S124	F125	K126
Bcl-2											D99			Y67					R66 R69			
Bcl-x <sub>L</sub>	Q111					A104		E129			E129				R139	Y101						
Bcl-w	Q81					S74																Q92
Noxa res	E20	L21	E22	V23	E24	C25	A26	T27	Q28	L29	R30	R31	F32	G33	D34	K35	L36	N37	F38	R39	Q40	K41
Mcl-1			R284								H252											R222
A-1											D78 E81											

**Figura 3.3.** Contribucions dels diferents residus dels pèptids BH3 a l'energia d'unió segons l'aproximació MM-GBSA. a) Contribucions de van der Waals; b) Contribucions electrostàtiques; c) Energia lliure d'unió total; i d) Residus de la proteïna antiapoptòtica amb els que s'estableixen ponts d'hidrogen.

Com podria esperar-se, també es van trobar interaccions característiques de cadascuna de les subfamílies de proteïnes antiapoptòtiques. La primera d'elles és que en els complexos de Bad les quatre cavitats hidrofòbiques semblen tenir un pes important en l'energia d'unió. Contràriament, en els complexos de Noxa, la contribució de les cavitats terminals es força inferior, fet que concorda amb la tolerància

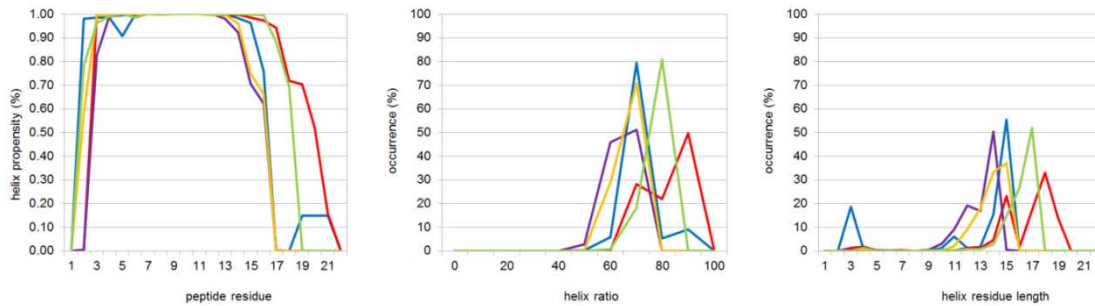
observada experimentalment per a la mutació de residus hidrofòbics en aquestes posicions (147). En les proteïnes que uneixen Bad s'observa una cavitat hidrofòbica addicional propera a l'extrem N-terminal, que no és present en els complexos de Noxa. A més, el pèptid BH3 Noxa no presenta tampoc interaccions importants en el seu domini C-terminal, possiblement per la pèrdua d'estructura secundària que té lloc en aquesta regió.

El perfil electrostàtic i els ponts d'hidrogen determinants per aquests complexos no permeten identificar un patró d'interacció compartit per tota la família, ni tampoc, per a cada subgrup de proteïnes. Les interaccions electrostàtiques observades tan sols semblen correlacionar amb la càrrega global dels complexos, el que fa sospitar que possiblement part d'aquesta càrrega es trobi localitzada a prop del lloc d'unió del domini BH3. No obstant, les interaccions entre les arginines R112 i R113 de Bad semblen ser característiques d'aquests complexos ja que noxa té una treonina i glutamina en aquestes posicions que no contribueixen a la energia d'unió. La contribució de R112 és favorable mentre que la de R113 s'oposa a la unió, però en conjunt donen lloc a una interacció favorable present només en els complexos de Bad. Tot i això aquestes interaccions es troben apantallades per efecte de la solvatació i la seva contribució global a la energia d'unió del pèptid és nul·la. Per tant, des d'un punt de vista electrostàtic, podríem dir que fora de les interaccions comuns en tota la família no és possible determinar cap punt d'interacció característic de cadascuna de les subfamílies.

Algunes d'aquestes diferències observades en el patró d'interacció dels dos pèptids són degudes a que posseeixen una estructura diferent. Per tal d'analitzar la estructura dels diferents pèptids, es va calcular teòricament el contingut en hèlix per cadascun dels complexos (veure Figura 3.4). Es pot observar com el major contingut en hèlix correspon al pèptid Bad en el seu complex amb Bcl-x<sub>L</sub>. Aquest fet és completament lògic si considerem que la estructura va ser obtinguda directament de raigs X i els models per homologia necessiten acomodar les mutacions introduïdes, podent així tenir lloc una pèrdua d'helicitat. Es pot observar també com la longitud del domini helicoidal de Bad sembla ser superior a la de Noxa, que perd la seva helicitat en el extrem C-terminal.



## Optimització in silico de compostos antitumorals



**Figura 3.4.** Contingut helicoïdal dels pèptids BH3 en els complexos de Bcl-2 (blau fosc), Bcl-xL (vermell), Bcl-w (lila), mcl-1 (verd) i A-1 (groc). a) Propensió a la helicitat; b) relació d'hèlix; i c) longitud del segment helicoïdal.

D'acord amb les característiques observades podem dir que, independentment de la subfamília a la que pertanyin, els complexos entre les proteïnes antiapoptòtiques i els dominis BH3 presenten interaccions repartides al llarg de la zona d'unió, la majoria d'elles comuns en tota la família. Tot i això, en els complexos de Bad, totes aquestes interaccions són fortes, el que possiblement afavoreix la presència d'un domini helicoïdal més llarg. Pel contrari, en els complexos de Noxa, les interaccions terminals són més febles i permeten una major flexibilitat conformacional que es manifesta en una pèrdua de l'estructura secundària en el extrem C-terminal. A més, la cavitat hidrofòbica extra observada per als complexos de Bad en el extrem N-terminal no sembla tenir un paper important en els complexos de Noxa.

Els resultats obtinguts van permetre la publicació de l'**article 2**:

### **Towards the design of combined therapies for restoring Bcl-2 activity**

Laura Delgado-Soler, Jaime Rubio-Martínez,

*Journal of Molecular Biology*, (2011), enviat.





# Towards the design of combined therapies for restoring Bcl-2 activity

Laura Delgado-Soler and Jaime Rubio-Martinez<sup>\*</sup>

## ABSTRACT

*Inhibition of the Bcl-2 protein family has emerged as a promising strategy for developing new anticancer drugs as specific interactions between its members play a crucial role in apoptosis regulation. In this context, mimicking BH3 domain of proapoptotic proteins is one of the most widely used strategies for drug design. Some preferences to specifically bind a given set of antiapoptotic members have been observed for certain proapoptotic proteins. However, it has been demonstrated that inhibition of one member of each subfamily of antiapoptotic Bcl-2 proteins is mandatory for cell death. The goal of this work is to determine interactions established between specific BH3-only proteins and their corresponding Bcl-2 receptors. The analysis of these interactions reveals residues determinant for binding this kind of peptides, some of them conserved by the whole Bcl-2 protein family and some others, characteristic of a given subfamily. Depending on interactions considered for the search of mimetic small molecules, different selectivity profiles can be expected for these compounds. Hence, pan-inhibitors are able to target the whole Bcl-2 family and selective molecules can be used together in combined therapies.*

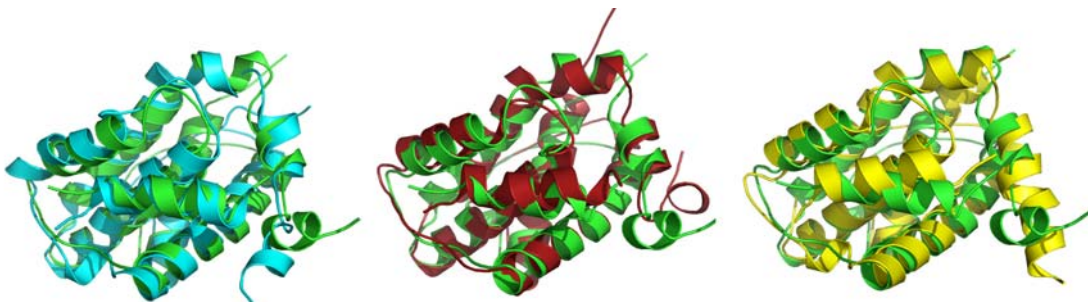
***Journal of Molecular Biology, (2011), en viat.***



### 3.3 APROXIMACIÓ BASADA EN LA ESTRUCTURA AL DISSENY DE PÈPTIDS MIMÈTICS DE BAKBH3 AMB UNA HELICITAT INCREMENTADA

El primer pas per al disseny de nous pèptids derivats del domini BH3 de Bak que posseïxin una elevada afinitat envers Bcl-x<sub>L</sub> implica l'anàlisi dels residus involucrats en la unió del pèptid biològic. Amb aquest propòsit es van realitzar diferents simulacions de dinàmica molecular amb la estructura de raigs X del complex BakBH3/Bcl-x<sub>L</sub>, utilitzant tres camps de força diferents (ff94, ff99SB i ff03). A partir d'aquests es va determinar un perfil d'interacció consens, tenint en compte les interaccions rellevants determinades per cadascuna de les simulacions.

Donat que el punt de partida de les dinàmiques era una estructura experimental no era d'esperar, en un principi, trobar diferències significatives en l'espai conformacional explorat pels complexos amb els diferents camps de força. Tot i això, en superposar les estructures finals de la simulació amb les coordenades experimentals de partida es van trobar algunes diferències en la posició de BakBH3 (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Superposició de la estructura experimental del complex BakBH3/Bcl-x<sub>L</sub> (en verd) i les estructures finals de la dinàmica per als camps de força: ff94 (en blau), ff99SB (en vermell) i ff03 (en groc).

Tal i com es pot observar, la regió C-terminal de la proteïna constitueix una regió molt mòbil i, degut a la seva proximitat, és d'esperar que es trobi interaccionant amb algun residu proper del pèptid BakBH3. En funció de la parametrització emprada aquesta regió adopta una o altra conformació, induint alhora canvis en el mode d'unió de BakBH3 que es veu arrossegat per la mobilitat d'aquesta regió per tal de conservar les interaccions establertes. Es pot observar com els camps de força ff94 i ff99SB pràcticament conserven la conformació experimental. Pel contrari, el ff03 sembla

induir a la formació d'un petit domini helicoidal en aquesta zona que suposa un desplaçament en la posició del pèptid.

D'acord amb les estructures observades és d'esperar que diferents conformacions del pèptid induïxin un patró d'interacció diferent. De fet, les diferències observades per al ff03 també es van veure reflectides en l'anàlisi d'interaccions (Figura 3.6). Els dominis BH3 posseeixen quatre interaccions hidrofòbiques característiques, corresponents als residus que ocupen les quatre cavitats hidrofòbiques formades a la superfície de la proteïna. Experimentalment s'ha determinat que per al domini BH3 de Bak aquestes interaccions corresponen als residus V74, L78, I81 i I85. Com es pot observar en l'anàlisi d'interaccions, els camps de força ff94 i ff99SB concorden completament amb aquests resultats però per al ff03, tot i observar-se també quatre interaccions de van der Waals, aquestes semblen estar desplaçades un residu en direcció a l'extrem N-terminal del pèptid, possiblement degut a la seva posició diferent, com s'ha comentat anteriorment. Des del punt de vista de les interaccions electrostàtiques les interaccions amb R76 i D83 també es troben desplaçades en el ff03. De fet, la interacció amb la R76 es troba altament conservada en els pèptids derivats del domini BH3 i, per al ff03, no s'observa una contribució significativa d'aquest residu. Igualment, el pont d'hidrogen amb D84 no es troba per al ff03.

	G72	Q73	V74	G75	R76	Q77	L78	A79	I80	I81	G82	D83	D84	I85	N86	R87
ff94					E129								R100			
ff99SB					E129								R100		W137	
ff03						Q111										

**Figura 3.6.** Contribució dels diferents residus de BakBH3 a la energia lliure d'unió. En verd es mostren aquells que tenen una contribució de van der Waals important i les contribucions electrostàtiques apareixen en blau i vermell (favorables i desfavorables, respectivament). Els residus que apareixen corresponen als aminoàcids de Bcl-X<sub>L</sub> que es troben enllaçats per ponts d'hidrogen.

En base a aquests resultats és possible identificar el patró d'enllaç d'aquest pèptid en els resultats de les simulacions de ff94 i ff99SB ja que, a més, els resultats són completament coherents amb les dades experimentals conegudes per aquest tipus de complexos (132): quatre interaccions hidrofòbiques (V74, L78, I81 i I85), una interacció electrostàtica amb la arginina central (R76) i un pont d'hidrogen amb el residu D84. A

més, la parametrització del ff03 no resulta adequada per a la descripció d'aquest sistema en concret.

En base als resultats obtinguts es van proposar diferents pèptids mimètics de BakBH3 substituïnt els residus prescindibles per l'aminoàcid no natural Aib (veure Taula 3.3). En un principi el contingut helicoïdal d'aquests pèptids sintètics s'hauria de veure incrementat per la inclusió d'aquest residu. Així, tal i com s'ha descrit en diversos estudis experimentals, l'assoliment de la conformació bioactiva (helicoïdal per aquest tipus de pèptids) resulta facilitada, produint un augment de la afinitat d'enllaç.

Pèptids	Residu															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Bak</b>	G	Q	V	G	R	Q	L	A	I	I	G	D	D	I	N	R
<b>Bak<sub>16</sub>Aib<sub>4</sub></b>	G	Q	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	Aib	D	D	I	N	R
<b>Bak<sub>16</sub>Aib<sub>3</sub>G</b>	G	Q	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	G	D	D	I	N	R
<b>Bak<sub>16</sub>Aib<sub>6</sub></b>	G	Aib	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	Aib	D	D	I	Aib	R
<b>Bak<sub>16</sub>Aib<sub>5</sub>G</b>	G	Aib	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	G	D	D	I	Aib	R
<b>Bak<sub>14</sub>Aib<sub>5</sub></b>	-	-	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	Aib	D	D	I	Aib	R
<b>Bak<sub>14</sub>Aib<sub>4</sub>G</b>	-	-	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	G	D	D	I	Aib	R
<b>Bak<sub>14</sub>Aib<sub>4</sub></b>	-	Q	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	Aib	D	D	I	N	-
<b>Bak<sub>14</sub>Aib<sub>3</sub>G</b>	-	Q	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	G	D	D	I	N	-
<b>Bak<sub>13</sub>Aib<sub>4</sub></b>	-	-	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	Aib	D	D	I	N	-
<b>Bak<sub>13</sub>Aib<sub>3</sub>G</b>	-	-	V	Aib	R	Aib	L	Aib	I	I	G	D	D	I	N	-

Taula 3.3. Seqüència dels diferents pèptids sintètics proposats.

A partir dels diferents complexos Bak<sub>x</sub>Aib<sub>y</sub>G<sub>z</sub>/Bcl-x<sub>L</sub> es van realitzar simulacions dinàmiques i es va predir la seva afinitat mitjançant MM-PB/GBSA. Un cop convergida la energia d'unió dels complexos, els 10 ns finals de la trajectòria es van utilitzar per extreure dades conformacionals i trobar una estimació de la afinitat d'enllaç representativa. De manera equivalent a l'anàlisi de les interaccions de BakBH3, els resultats obtinguts dels camps de forces ff94 i ff99SB van ser pràcticament equivalents, predient, en alguns casos, pèptids clarament més afins que el pèptid natural de BakBH3. Pel ff03, donat que les mutacions no eren consistents amb els residus que presentaven la contribució més important, cap dels pèptids sintètics va resultar millor que el BakBH3 original.

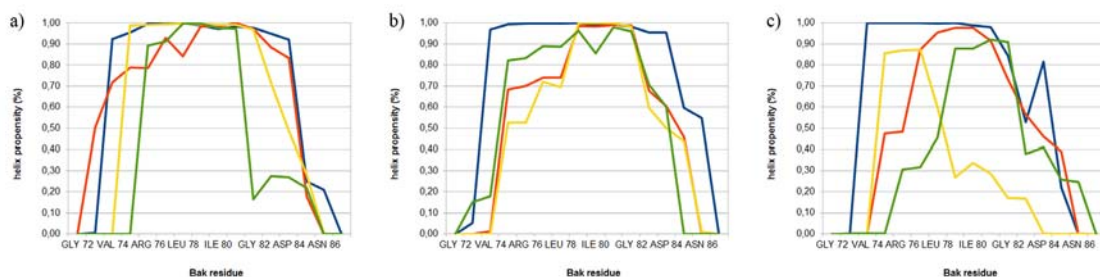
Al marge dels resultats del ff03, els resultats obtinguts de les diferents simulacions i aproximacions a la energia d'enllaç van ser pràcticament equivalents, com a mínim, en



les prediccions dels tres pèptids més afins. Considerant en conjunt totes aquestes estimacions es van seleccionar tres candidats: Bak<sub>14</sub>Aib<sub>4</sub>G, Bak<sub>16</sub>Aib<sub>5</sub>G i Bak<sub>16</sub>Aib<sub>3</sub>G. Cal destacar que tots ells conserven la G82, que ha estat descrita experimentalment com un motiu essencial per a l'activitat d'aquest tipus de pèptids.

Donat que un increment de la helicitat d'aquest tipus de pèptids es troba freqüentment relacionat amb un augment de l'afinitat, es va quantificar el contingut helicoïdal d'aquests sistemes per a les diferents simulacions (a la Figura 3.7 es mostra el contingut helicoïdal dels diferents pèptids analitzats per als tres camps de forces, com a exemple dels efectes observats en les diferents propietats analitzades). D'aquesta manera, és possible extreure conclusions sobre la influència de les substitucions per Aib o efectes del camp de forces en la estructura dels complexos o energies d'enllaç.

En general, no s'observa una clara tendència en el contingut helicoïdal dels pèptids en les simulacions dels complexos. Com es podria esperar, els resultats de ff94 i ff99SB són força similars i condueixen a una helicitat clarament superior a les simulacions del ff03. Pel que respecta als efectes de la substitució per Aib, tampoc es manifesten en les simulacions dels complexos. De fet, dins d'un mateix camp de forces, el pèptid natural BakBH3 és sempre el que presenta el contingut helicoïdal més elevat. Per als pèptids sintètics, el contingut helicoïdal depèn del camp de forces considerat, més que del propi contingut en Aib.

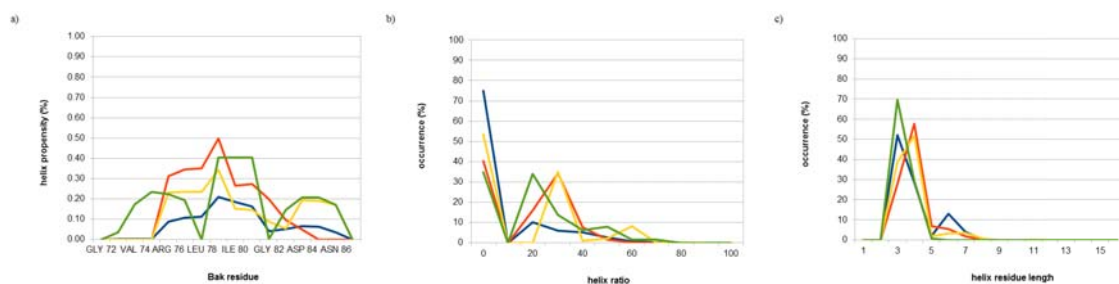


**Figura 3.7.** Contingut helicoïdal dels diferents residus de BakBH3 (en blau) i els millors pèptids sintètics Bak<sub>16</sub>Aib<sub>3</sub>G, Bak<sub>14</sub>Aib<sub>4</sub>G i Bak<sub>16</sub>Aib<sub>5</sub>G (en taronja, groc i verd, respectivament) per a les simulacions de a) ff94, b) ff99SB i c) ff03.

Aquests indicis apunten a que la inducció d'hèlix per part del camp de forces o els residus d'Aib només afecta al pèptid lliure. El fet de facilitar l'adquisició de la

conformació bioactiva facilita la unió amb la proteïna i s'observa una major afinitat d'enllaç. No obstant, un cop enllaçat al receptor, la hèlix del pèptid natural sembla ser la més estable.

Per tal d'observar aquests efectes, es va analitzar el contingut helicoïdal de les simulacions dels pèptids lliures (veure Figura 3.8). En aquest cas, els pèptids sintètics presenten un contingut helicoïdal més alt que el del pèptid natural que no conté residus d'Aib. El pèptid BakBH3, tot i partir d'una conformació helicoïdal, perd aquesta durant la simulació per adquirir conformacions desestructurades durant la majoria del temps. Pel contrari, els pèptids amb Aib mantenen una certa estructura helicoïdal en tot moment. Concretament, Bak<sub>16</sub>Aib<sub>3</sub>G i Bak<sub>14</sub>Aib<sub>4</sub>G adquireixen una estructura bihelicoïdal mentre que en el pèptid Bak<sub>16</sub>Aib<sub>5</sub>G l'hèlix s'acaba dividint en tres fragments.



**Figura 3.8.** Contingut helicoïdal dels diferents residus de BakBH3 (en blau) i els millors pèptids sintètics Bak<sub>16</sub>Aib<sub>3</sub>G, Bak<sub>14</sub>Aib<sub>4</sub>G i Bak<sub>16</sub>Aib<sub>5</sub>G (en taronja, groc i verd, respectivament) en estat lliure i utilitzant el camp de forces ff99SB. Les gràfiques corresponen a: a) Propensió a la helicitat; b) proporció d'hèlix i c) longitud de les hèlixs.

En conclusió, podem dir que el camp de forces emprat clarament determina l'espai conformacional explorat pels complexos, observant-se certes diferències en el contingut helicoïdal dels sistemes en general. No obstant, aquests efectes no s'aprecien en la helicitat dels pèptids enllaçats en concret. Un cop format els complexos, l'entorn proteic induïx una conformació helicoïdal en el pèptid necessària per a la unió, que es manté durant tota la dinàmica. De fet, la helicitat dels pèptids enllaçats no sembla presentar cap tipus de correlació amb les afinitats predites teòricament ja que, quan es treballa amb una única trajectòria del complex, no és

possible quantificar el cost energètic d'assolir la conformació bioactiva i aquestes únicament venen determinades per les interaccions establertes amb la proteïna.

Igualment la substitució per residus de Aib incrementa la propensió a la helicitat dels pèptids i, amb això, la proporció de conformació bioactiva. Aquest efecte es reflexa en un cert increment de l'afinitat d'enllaç per aquests pèptids tot i que, un cop enllaçats, els residus d'Aib no tampoc exerceixen cap efecte sobre el contingut helicoïdal d'aquests.

Donat que les substitucions no afecten els residus significatius per a la unió amb Bcl-x<sub>L</sub>, aquests pèptids presenten un patró d'interacció completament equivalent al del pèptid natural BakBH3 (els resultats no es mostren) i un major contingut helicoïdal en dissolució. És d'esperar, per tant, que l'afinitat d'enllaç experimental superi a la del pèptid natural.

Actualment, els pèptids proposats es van sintetitzar i es troben a la espera d'una avaluació biològica per a corroborar els resultats teòrics. Aquests resultats esdevindran la publicació de l'**article 3**:

### **Structure-based approach to the design of BakBH3 mimetic peptides with increased helical propensity**

Laura Delgado-Soler, Mar Orzaez, and Jaime Rubio-Martínez,  
*Journal of Computational Chemistry*, (2011), en preparació.

## Structure-based approach to the design of BakBH3 mimetic peptides with increased helical propensity

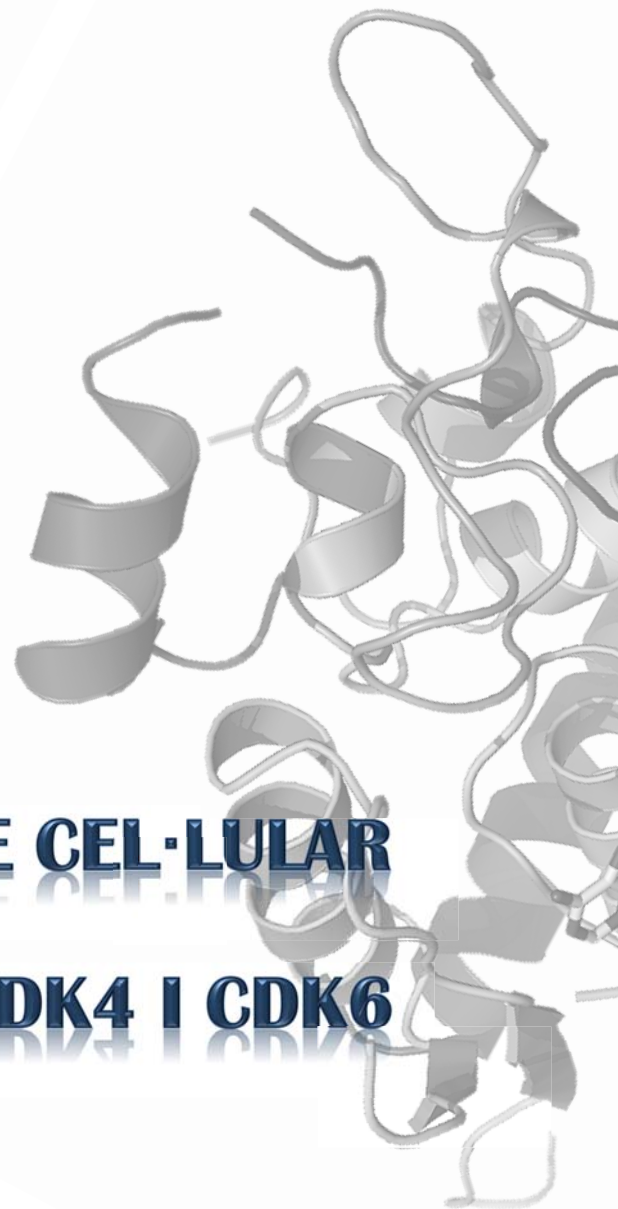
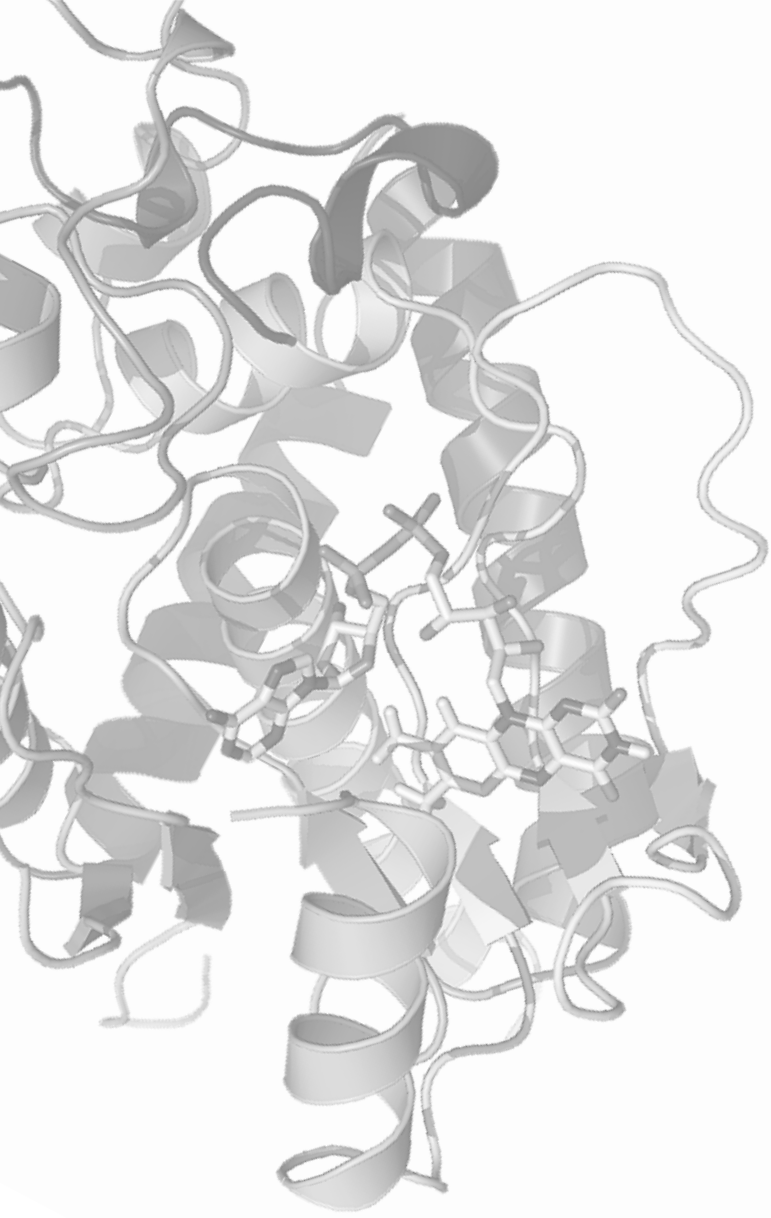
Laura Delgado-Soler, Mar Orzaez, and Jaime Rubio-Martinez\*

### ABSTRACT

*The Bcl-2 family proteins are well-characterized regulators of the intrinsic apoptotic pathway. Proteins within this family can be classified as either prosurvival or prodeath members and the balance between them present at the mitochondrial membrane is what determines if the cell live or dies. Specific interactions among Bcl-2 family proteins play a crucial role in regulating programmed cell death. Structural studies have established a conserved mode of interaction among Bcl-2 family members. This interaction is mediated by binding of the hydrophobic face of the amphipathic  $\alpha$ -helical BH3 region of the proteins into a conserved hydrophobic groove on the prosurvival proteins. It has been reported that an increase of helical content of BH3 mimetic peptides considerable improves the binding affinity. In this context, this work states for designing peptides derived from the BH3 domain of the proapoptotic protein Bak by substitution of some non-interacting residues by the helical inducing residue Aib. Different synthetic peptides preserving BakBH3 relevant interactions were proposed and simulated presenting a better predicted binding energy and higher helical content than the wild type Bak peptide.*

***Journal of Computational Chemistry, (2011), en preparació.***





**REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR**

**LES PROTEÏNES CDK4 I CDK6**



## CAPÍTOL IV. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR

La proliferació descontrolada de les cèl·lules és una de les característiques principals dels processos tumorals. En les cèl·lules eucariotes, els principals responsables de la progressió i coordinació del cicle cel·lular són els complexos de CDKs. En les malalties proliferatives, com és el cas del càncer, l'activitat d'aquestes proteïnes es troba freqüentment incrementada, en alguns casos per la sobreexpressió de les proteïnes activadores (com podrien ser les ciclines) i en altres, per la inactivació o l'absència de inhibidors. Donat que la eliminació de proteïnes sobreexpressades resulta una tasca difícil, el disseny d'inhibidors per a les CDKs es presenta com una estratègia interessant per al desenvolupament de noves teràpies antitumorals (99). Concretament, la transició G<sub>1</sub>/S resulta d'especial interès per al control del cicle cel·lular ja que, un cop superada, el procés de divisió s'independitza de senyals extracel·lulars.

Les proteïnes implicades en el control d'aquesta transició (CDK2, CDK4 i CDK6) no resulten essencials per al cicle cel·lular dels mamífers. La inhibició de qualsevol d'aquestes dianes de manera independent desencadena el desenvolupament de mecanismes compensatoris en la cèl·lula que permeten completar el procés de divisió (112). L'avantatge d'intervenir en aquestes proteïnes radica en que sí que resulten indispensables per a la proliferació de determinats tipus de cèl·lules, com ara les tumorals (90). Degut al major nombre d'estructures tridimensionals disponibles, la majoria d'estudis anaven orientats inicialment cap a la inhibició de CDK2. Actualment, s'apunta a CDK4 i CDK6 com a millors dianes terapèutiques ja que intervenen en mecanismes de regulació anteriors a CDK2 i, a més, permeten assolir una millor

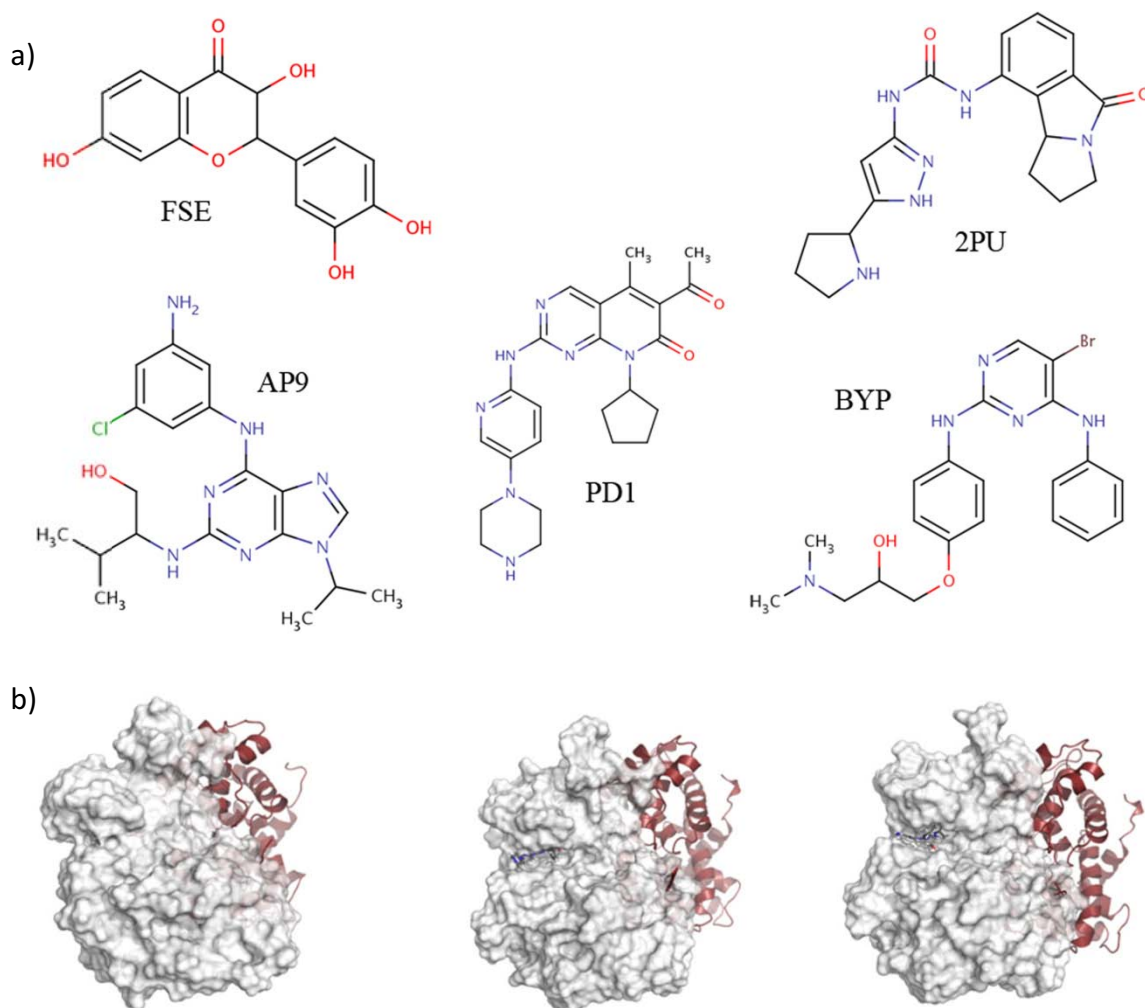


selectivitat respecte altres membres de la família de les CDKs (116), cosa que permet reduir els efectes secundaris.

La cerca de petites molècules inhibidores de les CDKs és una línia de investigació molt activa avui dia (148). Malauradament, cap dels inhibidors trobats ha estat aprovat per al seu ús comercial degut al gran nombre d'efectes secundaris que presenten (118). Tot i les grans millores que s'han assolit amb la utilització del disseny racional de fàrmacs, la principal limitació en el disseny d'inhibidors selectius radica en la precisió dels mètodes existents per a predir les afinitats experimentals (47). La fiabilitat d'aquestes estimacions no depèn únicament de la funció d'avaluació emprada, sinó també l'habilitat dels algorismes d'ancoratge per a reproduir el mode d'unió real. En aquest sentit, la selecció de l'estructura de referència per al receptor resulta determinant per a l'èxit del procés i la inclusió de la flexibilitat del centre actiu, un dels principals reptes de la química computacional.

El desenvolupament preclínic de nous fàrmacs involucra generalment una etapa d'optimització de les molècules actives fins a assolir les propietats de efectivitat i selectivitat necessàries per a ser considerades com a potencials candidates. Aquest procés implica treballar amb petites modificacions de molècules, totes elles actives, i per tant és necessari disposar d'un protocol de prediccions teòriques que ens permeti identificar quines són les modificacions que condueixen a una activitat òptima. L'objectiu d'aquest treball és analitzar algunes de les diferents metodologies existents actualment i determinar quin és el protocol que millor reproduceix l'estructura i activitat experimental per a un conjunt d'inhibidors de CDK6 competitiu de l'ATP.

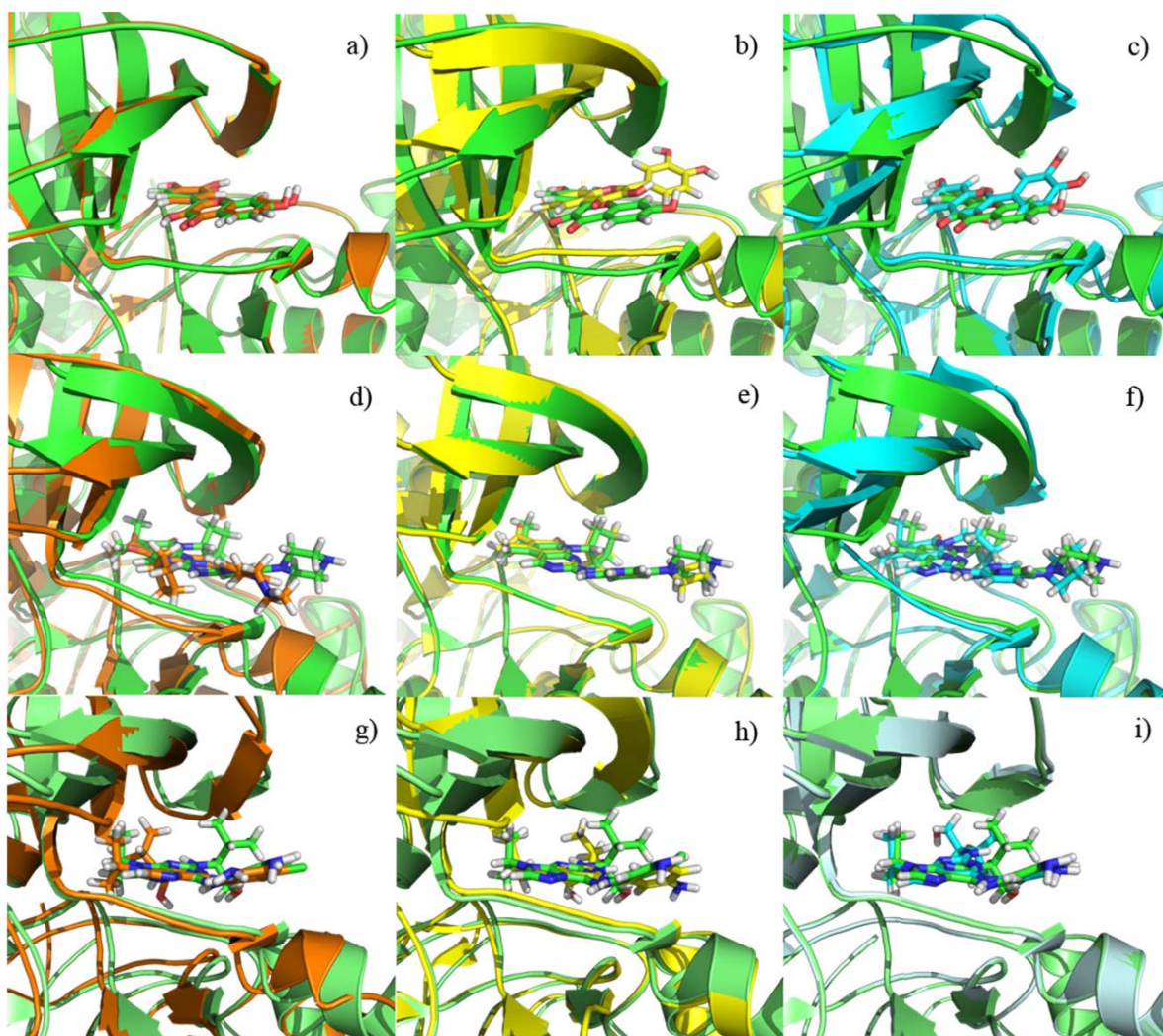
Per a l'estudi es van seleccionar cinc compostos actius (veure Figura 4.1a) tots ells amb afinitat de l'ordre del nanomolar per a CDK6. Aprofitant que tres d'aquestes molècules es trobaven directament cristal·litzades amb aquesta proteïna, els càlculs de *docking* i avaluació es van realitzar paral·lelament sobre les tres conformacions del receptor disponibles (Figura 4.1b). D'aquesta manera, va ser possible determinar quina és la influència de la estructura de partida en els resultats obtinguts en la predicció del mode d'unió i realitzar les estimacions de la afinitat d'aquests compostos.



**Figura 4.1.** a) Estructura de cinc inhibidors de CDK6 que actuen sobre el lloc d'unió de l'ATP: Fisetin (FSE), Aminopurvalanol (AP9), (2R)-1-{4-[(4-anilino-5-bromopyrimidin-2-yl)amino]phenoxy}-3-(dimethylamino) propan-2-ol (BYP), 1-(5-oxo-2,3,5,9b-tetrahydro-1H-pyrrolo[2,1-a]isindol-9-yl)-3-(5-pyrrolidin-2-yl-1H-pyrazol-3-yl)-urea (2PU) i PD0332991 (PD1); b) Estructura del centre actiu per als tres complexos cristal·litzats de CDK6. D'esquerra a dreta, els complexos pertanyen als inhibidors FSE, PD1 i AP9, respectivament.

Per als càlculs es van emprar tres metodologies per incloure diferents graus de flexibilitat en el receptor i comprovar si l'efecte de la estructura inicial per al receptor és el mateix en cada cas. Així es va emprar el programa Glide (41) del paquet de programes Maestro v9.0 (149) com a aproximació de receptor completament rígid. Seguidament, es va introduir la flexibilitat de les cadenes laterals del centre actiu amb un nou protocol de *docking* inclòs en el mateix paquet, el *Induced Fit Docking* (43).

Els resultats obtinguts a partir d'algoritmes senzills d'ancoratge es van comparar amb càlculs de mecànica molecular que, en un principi, no presenten restriccions en la mobilitat del receptor. Per estimar les afinitats experimentals les estructures resultants de la superposició dels diferents lligands sobre el centre actiu es van minimitzar amb el programa AMBER (150) i es van calcular dinàmiques moleculars per tal d'obtenir conformacions representatives dels complexos per a, posteriorment, estimar la energia d'unió amb el mètode MM-PB/GBSA (52, 53).



**Figura 4.2.** Comparació dels modes d'unió obtinguts dels estudis de *docking* amb les estructures experimentals per a) FSE sobre el seu propi receptor; b) FSE sobre el receptor de PD1; c) FSE sobre receptor de AP9; d) PD1 sobre el receptor de FSE; e) PD1 sobre el seu propi receptor; f) PD1 sobre el receptor de AP9; g) AP9 sobre el receptor de FSE; h) AP9 sobre el receptor de PD1, i i) AP9 sobre el propi receptor.

La utilització de diferents conformacions de CDK6 amb centres actius de diferent mida i la inclusió de diferents graus de flexibilitat del receptor hauria, en un principi, d'influenciar els resultats obtinguts. De fet, únicament va ser possible reproduir el mode d'unió experimental emprant conformacions del receptor adequades per a la mida del lligand (veure Figura 4.2). El problema radica en que la flexibilitat inclosa en aquests mètodes no és suficient per acomodar lligands de diferents mides sobre una determinada cavitat.

Malauradament, cap de les aproximacions de *docking* emprades va ser capaç de reproduir per als cinc compostos les afinitats d'unió experimentals amb cap de les funcions d'avaluació implementades. En la majoria de casos, el mètode no era capaç de determinar el mode d'unió experimental i partint d'una estructura diferent, les estimacions de la energia d'unió difícilment es corresponen amb els valors experimentals. De fet, emprant la funció EModel implementada en aquests programes els resultats presentaven una bona correlació amb els experimentals, llevat de casos on la mida dels inhibidors i la cavitat del receptor emprat eren considerablement diferents.

Els resultats dels càlculs de mecànica molecular no van millorar inicialment les prediccions teòriques. La falta de correlació entre les estimacions de MM-PB/GBSA i les afinitats experimentals per a les pròpies estructures de raigs X minimitzades apunta a un mal funcionament de la metodologia emprada. La inclusió de diferents conformacions representatives del sistema a partir de les simulacions de dinàmica molecular no va millorar els resultats obtinguts, pel que finalment es va descartar com a origen del problema.

Es van analitzar separatament cadascun dels termes que contribuïen a la energia d'unió i es va determinar que la falta de correlació era deguda, principalment, a una sobreestimació dels termes electrostàtics. Alguns estudis suggereixen que per tal d'esmoreir la mala correlació dels termes electrostàtics és necessari incrementar la contribució dels termes no polars de la equació de MM-PB/GBSA (més detalls sobre la equació en (151)). Donat que les interaccions de van der Waals en fase gas es calculen amb el típic potencial de Lennard-Jones, es va decidir ajustar el paràmetre  $\gamma$  emprat

## Optimització in silico de compostos antitumorals

per al càlcul del terme corresponent a la solvatació no polar fins reproduir qualitativament els resultats experimentals.

En aquest cas l'escombrat conformacional proporcionat per les dinàmiques moleculars sí semblava millorar els resultats obtinguts, especialment en el cas de dinàmiques llargues. Aquest fet pot ser degut a que els canvis estructurals en proteïnes, necessaris per a acomodar els lligands en les diferents cavitats del receptor, tenen lloc en temps de dinàmica considerablement llargs. Altres mètodes per agilitzar aquests canvis conformacionals, encara que més costosos, podrien millorar la eficiència del mètode. No obstant, el seu cost computacional no els fa viable per al gran nombre de compostos que cal analitzar en les etapes inicials del disseny de fàrmacs.

Així doncs, és possible concloure que per obtenir resultats fiables dels estudis de *docking* cal treballar amb receptors que tinguin una cavitat de grandària similar a la dels lligands a estudiar. Per tal de garantir resultats més fiables quan el conjunt de lligands és molt divers la única opció possible és recórrer a estudis més exhaustius, com són els càlculs de mecànica molecular. En aquests casos després d'un temps suficient de relaxació dels complexos i un ajust dels paràmetres és possible assolir resultats prou fiables.

Els resultats d'aquest capítol van quedar recollits en el **article 4**:

### **Predicting binding energies of CDK6 inhibitors in the hit-to-lead process**

*Laura Delgado-Soler*, Javier Ariñez-Soriano, Jose María Granadino-Roldán, Jaime Rubio-Martínez,

*Theoretical Chemistry Accounts*, 128,807-823 (2011).





# Predicting binding energies of CDK6 inhibitors in the hit-to-lead process

Laura Delgado-Soler, Javier Ariñez-Soriano,  
José M. Granadino-Roldán and Jaime Rubio-Martínez\*

## ABSTRACT

*The main challenge for the “hit-to-lead” stage in the drug discovery process relies on the accuracy of existing docking methods. In fact, accuracy of docking methods depends not only on the scoring function used to rank the poses but also on the ability of the docking method to reproduce the experimental binding mode. At this purpose, the performance of different approximations to properly dock and score compounds with known activity in a narrow range of IC<sub>50</sub> values was analyzed. A set of five ATP-competitive CDK6 inhibitors and three receptor conformations for CDK6 were considered for analysis, and three methodologies were used and analyzed in order to include different degrees of receptor flexibility. Thus, a completely rigid receptor is considered when using Glide, while the so-called Induced Fit Docking Protocol accounts for receptor sidechain rearrangements. Finally, force field calculations were also performed in order to consider a completely flexible receptor.*

***Theoretical Chemistry Accounts, 128,807-823 (2011).***

<http://www.springerlink.com/content/ul3x06342453v170/>







# **APROXIMACIÓ QUIMIOGENÒMICA**

## **AL DISSENY DE FÀRMACS**



## CAPÍTOL V. APROXIMACIÓ QUIMIOGENÒMICA

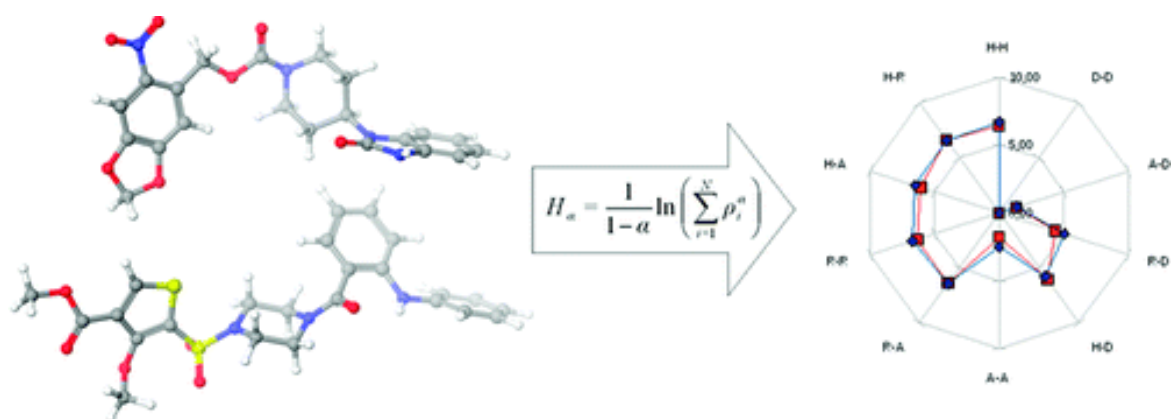
En les etapes inicials del procés de desenvolupament de nous fàrmacs, és una pràctica habitual avaluar massivament l'activitat de petites molècules sobre una determinada diana terapèutica. Amb el desenvolupament dels mètodes de síntesi i les eines d'anàlisi massiu, el número de compostos disponibles per a ser avaluats com a potencials agents terapèutics s'ha incrementat considerablement. A més, la recent seqüenciació del genoma humà ha revelat que existeix un gran nombre de potencials dianes terapèutiques que resten a la espera de ser explotades. Tot i això, el cost d'avaluar aquesta gran quantitat de compostos sobre la gran quantitat de dianes terapèutiques conegudes fa que aquest procés resulti inviable i que el desenvolupament d'eines complementaries per al tractament d'aquesta gran quantitat d'informació hagi esdevingut un camp de recerca molt actiu durant els darrers anys.

La quimiinformàtica és una branca emergent dins de la química teòrica que s'ocupa de l'aplicació d'eines informàtiques per a la resolució de problemes químics (152). Sota aquesta aproximació, les molècules es transformen en una representació numèrica, denominada conjunt de descriptors, que pot incloure informació tant estructural, com química o biològica (153). Per a trobar la millor solució a un donat problema, un cop establida la representació adient, es poden aplicar estratègies de optimització o comparació de les propietats moleculars o bé de cerca d'altres molècules amb les propietats desitjades. Diferents tipus de mesures (com ara la distància Euclidiana, la de Manhattan o la similitud de Tanimoto) han estat molt

utilitzades per a quantificar satisfactòriament el grau de similitud entre descriptors moleculars.

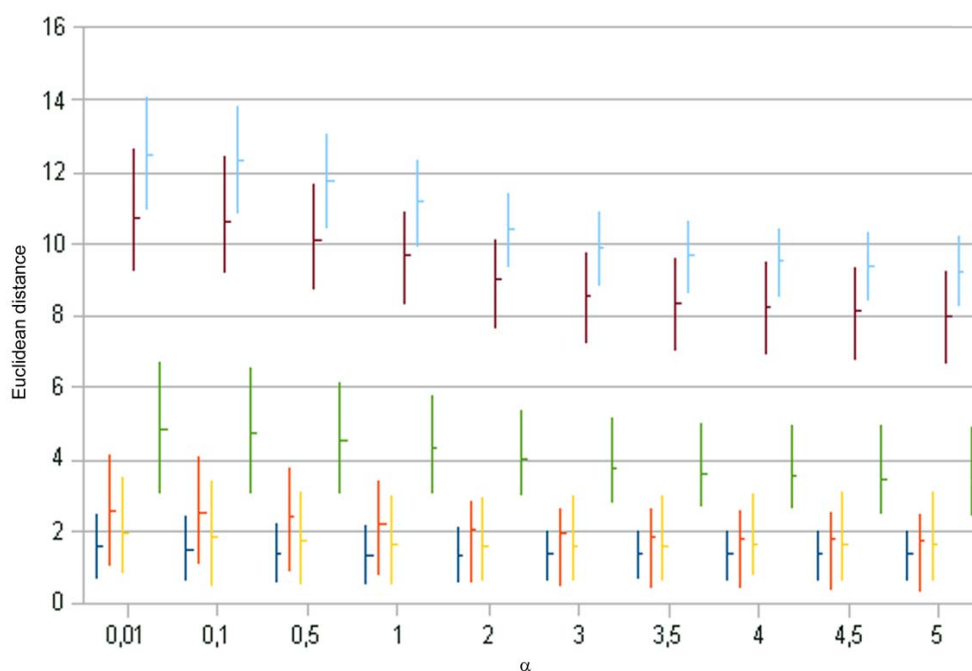
Les aproximacions basades en les distribucions de parells de motius moleculars són considerades com una família atractiva de descriptors i han estat àmpliament emprades en diversos àmbits del descobriment de fàrmacs (154). Generalment, l'aproximació utilitzada consisteix en analitzar la ocurrència d'un determinat parell d'àtoms en funció de la distància a la que es troben amb la finalitat de capturar la distribució global de motius moleculars. Per evitar problemes derivats de flexibilitat i/o la conformació molecular utilitzada, es treballa generalment amb distàncies topològiques, ja que han demostrat una millor eficiència en la majoria de casos (155-158).

En aquesta línia, Gregori-Puigjané i col·laboradors van desenvolupar uns descriptors basats en la entropia de Shannon (SHED) que conduïen a resultats prometedors tant en l'anàlisi massiu de compostos com en l'assignació de perfils farmacològics de lligands i receptors (65, 159). En aquest treball es van desenvolupar nous descriptors moleculars basats en la entropia de Rényi (RED) per a descriure la distribució dels parells de motius moleculars, una generalització de la entropia de Shannon que depèn d'un paràmetre  $\alpha$  optimitzable (veure Figura 5.1).



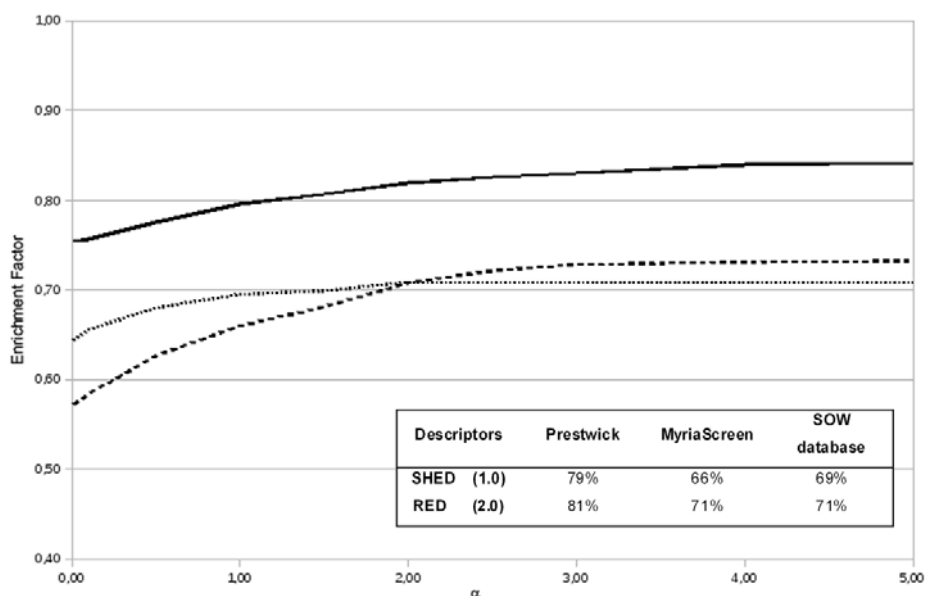
**Figura 5.1.** Dues molècules d'activitat similar però aparentment diferents, presenten una distribució de motius totalment equivalent segons els descriptors RED.

Per tal de validar la eficiència d'aquests nous descriptors, es van analitzar tres grups de molècules amb activitat biològica coneguda. De manera equivalent als SHED, els nous descriptors també van demostrar eficiència en les mesures de similitud molecular independentment del valor del paràmetre  $\alpha$  emprat. Aquest paràmetre es va optimitzar de manera que la distància entre aquests tres grups de molècules fos màxima alhora que es minimitzava la distància entre molècules del mateix grup (veure Figura 5.2). Així, tenint en compte les limitacions inherents al propi mètode per a valors molt grans de  $\alpha$ , es va establir un valor òptim de  $\alpha=2$  per als estudis posteriors.



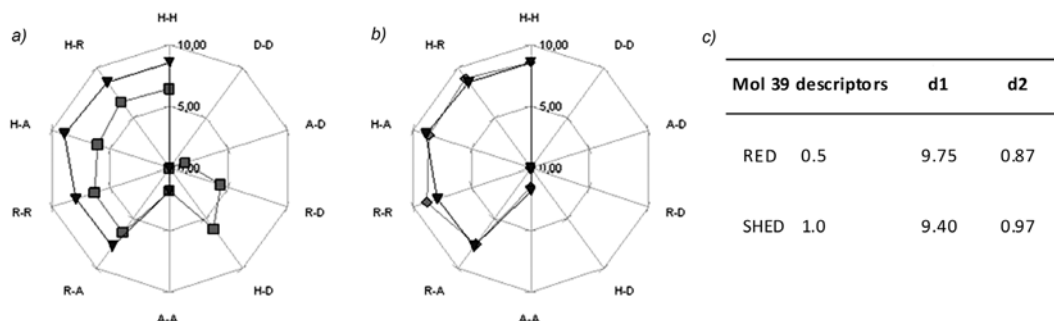
**Figura 5.2.** Distàncies calculades entre els diferents grups de molècules estudiades. En blau, taronja i groc es mostren els valors mitjos i desviació de les distàncies intramoleculares. Els colors verd, vermell i blau clar corresponen amb les distàncies intergrup. Es pot observar com la dispersió en els valors de les distàncies es redueix en incrementar  $\alpha$  tot i que per a valors majors que 2 es produeix un solapament entre les distàncies intra- i intermoleculares.

Seguidament es va analitzar el comportament d'aquests descriptors en processos d'anàlisi virtual de molècules. Utilitzant un conjunt de molècules d'activitat coneguda es va comprovar l'habilitat d'aquests descriptors per a identificar els compostos actius dins d'una base de dades de molècules. En comparació als SHED, l'optimització del paràmetre  $\alpha$  va permetre incrementar la taxa d'èxit, especialment en incrementar el la mida de les bases de dades (Figura 5.3).



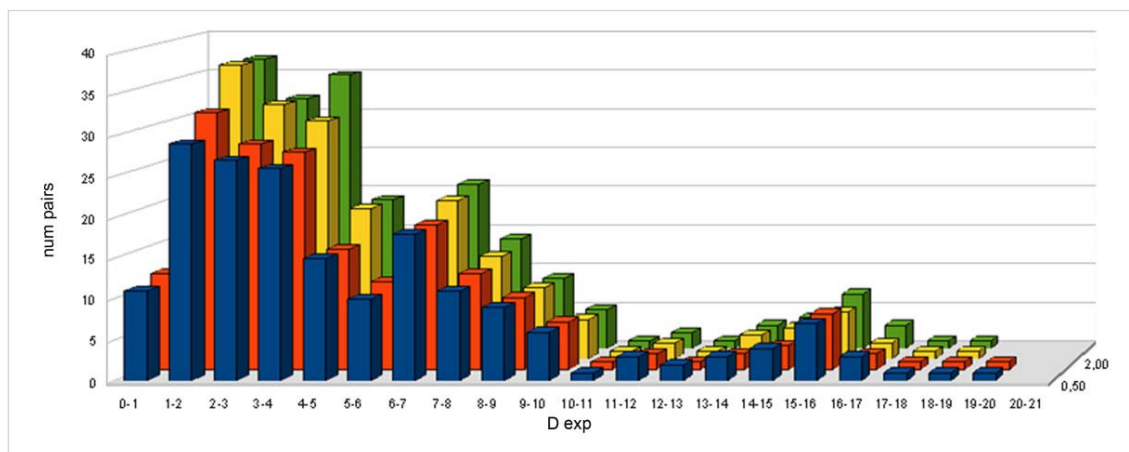
**Figura 5.3.** Valors obtinguts per al factor d'enriquiment en compostos actius (els detalls sobre el càlcul d'aquest paràmetre es poden trobar en (160)) en funció del paràmetre  $\alpha$  per a tres bases de dades: Prestwick (línia contínua), MyriaScreen (línia puntejada) i SOW (línia discontinua). Els valors a la taula corresponen al factor d'enriquiment per als SHED i per al paràmetre òptim.

Es va analitzar també la utilitat d'aquests descriptors per assignar el perfil farmacològic a un determinat compost. Per a tal finalitat es va considerar un conjunt de 47 compostos amb activitat coneguda envers 37 dianes terapèutiques. En aquest cas, es va observar que molècules amb un perfil de descriptors similar mostraven també una activitat biològica equivalent enfront el conjunt de dianes terapèutiques considerat i, equivalentment, compostos amb uns descriptors diferenciats presentaven un espectre d'acció totalment diferent (veure Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Conjunt de descriptors RED i distàncies teòriques entre dos parells de molècules, les primeres amb un perfil farmacològic totalment diferent i les segones amb un perfil similar.

Així, es va analitzar la correlació entre distàncies experimentals i teòriques (detalls en (160)) i es va observar un enriquiment en molècules d'activitat similar per compostos amb distàncies curtes (entre 0 i 2) entre els vectors de descriptors. Novament, el valor òptim del paràmetre  $\alpha$  va ser el que va donar millors resultats (veure Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Distribució de parells de distàncies experimentals considerant únicament aquells parells de molècules amb distàncies teòriques entre 0 i 2, per a diferents valors de  $\alpha$ : 0.5 en blau, 1 en taronja, 2 en groc i 3 en verd.

En vista dels resultats obtinguts, es pot concloure que els descriptors RED es presenten com una representació molecular adequada que pot ser emprada per a mesures de similitud en el procés de cerca de nous compostos actius. A més, la distribució dels motius moleculars resulta eficient no només per a descriure la estructura de la molècula sinó també la seva activitat biològica o perfil farmacològic.

Aquests resultats van permetre la publicació del **article 5**:

**RED: A Set of Molecular Descriptors Based on Rényi Entropy**

Laura Delgado-Soler, Raúl Toral, Maria Santos Tomás, Jaime Rubio-Martínez,

*Journal of Chemical Information and Modeling* 49, (2009), 2457-2468.





# RED: A Set of Molecular Descriptors Based on Rényi Entropy

Laura Delgado-Soler, Raúl Toral,  
M.Santos Tomás and Jaime Rubio-Martínez\*

## ABSTRACT

*New molecular descriptors, RED (Rényi entropy descriptors), based on the generalized entropies introduced by Rényi are presented. Topological descriptors based on molecular features have proven to be useful for describing molecular profiles. Rényi entropy is used as a variability measure to contract a feature-pair distribution composing the descriptor vector. The performance of RED descriptors was tested for the analysis of different sets of molecular distances, virtual screening, and pharmacological profiling. A free parameter of the Rényi entropy has been optimized for all the considered applications.*

***Journal of Chemical Information and Modeling* 49, (2009), 2457-2468.**

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci900275w>





# CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

La medicina personalitzada i les teràpies dirigides són, avui dia, estratègies emergents en les companyies farmacèutiques. L'objectiu global, a llarg termini, és desenvolupar tractaments dirigits cap a mecanismes moleculars desregulats únicament en les cèl·lules afectades, reduint així els problemes de toxicitat d'aquests compostos. Aquest procés és llarg i costós però la introducció de les tècniques de disseny racional de fàrmacs ha permès reduir de manera considerable el temps d'identificació de molècules actives, agilitzant així les etapes inicials.

El coneixement dels mecanismes moleculars implicats en una determinada patologia permet trobar un punt del procés que pugui ser intervingut, generalment una proteïna, restaurant així el comportament normal de la cèl·lula. Un cop identificada la diana terapèutica d'interès, mitjançant tècniques de modelització molecular, és possible trobar compostos que actuïn simulant les interaccions entre la proteïna i els seus reguladors naturals que, en un principi, haurien de desencadenar un efecte biològic equivalent.

Les teràpies antitumorals dirigides a promoure l'apoptosi i/o a controlar el procés de proliferació cel·lular es troben avui dia en ple desenvolupament. A més, les oportunitats d'intervenció terapèutica en aquesta línia s'incrementen a mesura que augmenta el coneixement de les proteïnes involucrades en aquests processos. Avui dia els principals problemes dels compostos identificats radiquen però en la seva selectivitat i el gran nombre d'efectes secundaris que presenten, pel que el disseny de molècules selectives és un camp de recerca molt actiu.

## Optimització in silico de compostos antitumorals

El present projecte es basa en la cerca de nous fàrmacs anticancerígens mitjançant la modelització molecular. D'una banda es tracta d'identificar inhibidors per a les proteïnes de la família Bcl-2 per a restablir els nivells normals d'apoptosi i, de l'altra, per a les proteïnes CDK4 i CDK6, importants reguladores del cicle cel·lular. Totes aquestes proteïnes es troben desregulades en nombrosos tipus de tumors, motiu pel que es presenten com a bones dianes terapèutiques per al tractament del càncer. L'objectiu plantejat a llarg termini en aquesta tesi és identificar compostos actius amb potència i selectivitat cap a aquestes proteïnes per tal de convertir-los en caps de sèrie que finalment puguin arribar a ser fàrmacs comercials.

La utilització de compostos mimètics del domini BH3 per inhibir la funció dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2 és una de les estratègies més emprades per al control de l'apoptosi. En aquest marc, en funció de la selectivitat que presenten envers els pèptids BH3, podem trobar dues subfamílies de proteïnes antiapoptòtiques: Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> i Bcl-w d'una banda i Mcl-1 i A-1 de l'altra. Diferents estudis suggereixen que per a produir la mort cel·lular és necessari intervenir al menys un membre de cadascuna de les subfamílies. Per tant, sota aquesta premissa, es van analitzar les interaccions establertes entre les proteïnes antiapoptòtiques i dominis BH3 tant pel cas de pèptids que s'uneixen amb igual afinitat a tota la família, com per a pèptids selectius de cadascun dels subgrups. En aquest aspecte s'ha trobat que:

- El patró d'unió identificat per pèptids selectius o no reflexa majoritàriament unes interaccions compartides per tota la família: quatre residus hidrofòbics i una arginina central altament conservada en els dominis BH3.
- La única distinció trobada entre les diferents subfamílies és que en el cas de Mcl-1 i A-1, dues de les interaccions hidrofòbiques semblen tenir més pes que les altres. En conseqüència, aquestes proteïnes són més permissives pel que respecta a mutacions d'aquests residus.

Nombrosos estudis apunten a que la helicitat en els pèptids mimètics dels dominis BH3 incrementa notablement l'afinitat d'enllaç. Sota aquesta premissa s'ha tractat de dissenyar pèptids derivats de la proteïna proapoptòtica Bak substituint alguns dels residus prescindibles per l'aminoàcid no natural Aib, inductor de conformacions helicoïdals. Per a l'estudi, es van emprar simultàniament tres camps de forces (ff94,

ff99SB i ff03) donat que s'han observat certes tendències en l'espai conformacional explorat per les proteïnes en funció de la parametrització utilitzada. Tot i que els pèptids sintètics encara resten pendents d'avaluació experimental podem afirmar que:

- L'espai conformacional explorat en les simulacions de dinàmica molecular depèn considerablement del camp de forces utilitzat. En concordança amb les parametritzacions considerades, el comportament del ff03 és diferent al del ff94 i ff99SB (modificació del ff94).
- Les diferències en l'espai conformacional escombrat pels complexos es veu reflectida en un diferent perfil d'interacció. El ff94 i ff99SB permeten reproduir les interaccions observades experimentalment.
- El disseny de pèptids que conservin les interaccions rellevants del pèptid natural BakBH3 i afavoreixin la conformació helicoïdal hauria de conduir a un increment de la afinitat per Bcl-x<sub>L</sub>.
- L'estudi del contingut helicoïdal del pèptid en les dinàmiques dels complexos no permet apreciar l'efecte inductor d'hèlix de la introducció de residus d'Aib. Contràriament a l'esperat, el major contingut helicoïdal correspon al camp de forces ff99SB i el pèptid natural BakBH3, que no conté Aib.
- L'estudi de les dinàmiques dels pèptids lliure manifesta que la introducció de residus de Aib incrementa el contingut helicoïdal dels pèptids facilitant així, l'assoliment de la conformació bioactiva .

Actualment tots els inhibidors coneguts per a les CDKs, actuen sobre el lloc d'unió de l'ATP. Donat que existeix una gran quantitat de dades experimentals sobre aquests compostos es va decidir avaluar diferents algorismes de *docking* i predicció d'afinitats experimentals amb cinc inhibidors coneguts de CDK6. Els resultats van mostrar que:

- Els mètodes emprats únicament són capaços de reproduir les dades experimentals quan la grandària del lloc d'unió de la conformació del receptor considerada i els lligands eren de mida similar.
- Les prediccions de les afinitats d'enllaç tan sols tenen sentit en els casos en que és possible identificar el mode d'unió experimental.



## Optimització in silico de compostos antitumorals

- En aquests últims casos, algunes de les funcions estudiades demostren un comportament adequat.
- Una mesura de la fiabilitat d'aquests algorismes comparant-los amb mètodes més precisos basats en dinàmica molecular demostra que, fins i tot en aquest cas, és necessària una reparametrització de la funció d'avaluació emprada (MM-PB/GBSA) per obtenir resultats fiables.

Finalment, s'ha proposat també un desenvolupament metodològic que enfoca el problema del disseny de fàrmacs des d'una perspectiva més amplia: la quimiogenòmica. Amb la seqüenciació del genoma humà s'ha pres consciència de que resulta inviable avaluar el gran nombre de compostos químics coneguts actualment sobre totes les possibles dianes terapèutiques identificades en el genoma humà. Per aquest motiu és imprescindible desenvolupar mètodes teòrics més senzills per a la caracterització i comparació de molècules que permetin predir la seva activitat biològica. Amb aquesta finalitat:

- S'han desenvolupat uns nous descriptors moleculars basats en la entropia de Rényi (RED), per tal de caracteritzar la distribució dels parells de motius moleculars.
- Els descriptors RED han demostrat una gran eficiència no només en la identificació de compostos actius sinó també en la assignació de perfils farmacològics a les molècules.
- S'ha demostrat que amb els descriptors RED és possible predir de manera senzilla els efectes colaterals que pot tenir un determinat compost sobre un ampli ventall de dianes terapèutiques.

Així doncs, amb la realització d'aquesta tesi, queda patent que l'aplicació de mètodes teòrics pot contribuir de manera eficient al disseny de fàrmacs. No només des del punt de vista de que permet estimar l'activitat biològica d'un determinat compost sino perquè a més, permet predir les interaccions amb altres proteïnes de l'organisme i amb això possibles efectes no desitjats. D'aquesta manera es possible reduir el cost i temps necessari per al descobriment de compostos actius.







# REFERÈNCIES



# REFERÈNCIES

1. S. Mandal, M. Moudgil, S. K. Mandal, *Eur J Pharmacol* **625**, 90 (Dec 25, 2009).
2. J. Greer, J. W. Erickson, J. J. Baldwin, M. D. Varney, *J Med Chem* **37**, 1035 (Apr 15, 1994).
3. T. Brodniewicz, G. Gryniewicz, *Acta Pol Pharm* **67**, 578 (Nov-Dec, 2010).
4. N. A. Tamimi, P. Ellis, *Nephron Clin Pract* **113**, c125 (2009).
5. R. Shankar, X. Frapaise, B. Brown, *Drug Discovery & Development*, 57 (2006).
6. . (2011).
7. I. M. Kapetanovic, *Chem Biol Interact* **171**, 165 (Jan 30, 2008).
8. A. J. Stevens *et al.*, *The new england journal of medicine* **364**, 535 (2011).
9. G. Schneider, U. Fechner, *Nat Rev Drug Discov* **4**, 649 (Aug, 2005).
10. H. van de Waterbeemd, E. Gifford, *Nat Rev Drug Discov* **2**, 192 (Mar, 2003).
11. W. L. Jorgensen, *Science* **303**, 1813 (Mar 19, 2004).
12. P. L. Toogood, *J Med Chem* **45**, 1543 (Apr 11, 2002).
13. D. M. Noonan *et al.*, *J Cell Physiol* **202**, 922 (Mar, 2005).
14. R. Fåhræus, S. Laín, K. Ball, D. Lane, *Oncogene* **16**, 587 (1998).
15. C. Obiol-Pardo, J. M. Granadino-Roldan, J. Rubio-Martinez, *J Mol Recognit* **21**, 190 (May-Jun, 2008).
16. J. L. Wang *et al.*, *Cancer Res* **60**, 1498 (Mar 15, 2000).
17. T. Langer, R. Hoffmann, S. Bryant, B. Lesur, *Curr Opin Pharmacol* **9**, 589 (Oct, 2009).
18. C. M. Song, S. J. Lim, J. C. Tong, *Briefings in Bioinformatics* **10**, 579 (September 1, 2009, 2009).
19. Y. Yang, S. J. Adelstein, A. I. Kassis, *Drug Discov Today* **14**, 147 (Feb, 2009).
20. D. A. Pensak, *Pure Appl. Chem.* **61**, 601 (1989).
21. M. Shatsky, O. Dror, D. Schneidman-Duhovny, R. Nussinov, H. J. Wolfson, *Nucleic Acids Res* **32**, W503 (Jul 1, 2004).
22. O. Dror, A. Shulman-Peleg, R. Nussinov, H. J. Wolfson, *Curr Med Chem* **11**, 71 (Jan, 2004).
23. *Structure-Based Drug Discovery*, vol. XII (Springer, Drordrecht (Netherlands), 2007), vol. XII.
24. Y. Kurogi, O. F. Guner, *Curr Med Chem* **8**, 1035 (Jul, 2001).
25. S.-K. Lin, *Molecules* **5**, 987 (2000).
26. L. W. Hardy, A. Malikayil, *Current Drug Discovery*, 15 (2003).

## Optimització in silico de compostos antitumorals

27. J. C. Venter *et al.*, *Science* **291**, 1304 (Feb 16, 2001).
28. E. S. Lander *et al.*, *Nature* **409**, 860 (Feb 15, 2001).
29. J. W. H. Li, J. C. Vederas, *Science* **325**, 161 (July 10, 2009, 2009).
30. B. Patwardhan, A. D. Vaidya, *Indian J Exp Biol* **48**, 220 (Mar, 2010).
31. D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Journal of Natural Products* **66**, 1022 (2003).
32. A. Harvey, *Drug Discovery Today* **5**, 294 (2000).
33. C. M. Crews, *Chemistry & Biology* **17**, 551 (2010).
34. D. E. Clark, C. G. Newton, *Drug Discov Today* **9**, 492 (Jun 1, 2004).
35. D. Rognan, *Br J Pharmacol* **152**, 38 (Sep, 2007).
36. S. Pérot, O. Sperandio, M. A. Miteva, A.-C. Camproux, B. O. Villoutreix, *Drug Discovery Today* **15**, 656 (2010).
37. S. Leis, S. Schneider, M. Zacharias, *Curr Med Chem* **17**, 1550 (2010).
38. M. J. Sutcliffe, I. Haneef, D. Carney, T. L. Blundell, *Protein Eng* **1**, 377 (Oct-Nov, 1987).
39. M. J. Sutcliffe, F. R. Hayes, T. L. Blundell, *Protein Eng* **1**, 385 (Oct-Nov, 1987).
40. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 3 (Mar 1, 2001).
41. R. A. Friesner *et al.*, *J Med Chem* **49**, 6177 (Oct 19, 2006).
42. M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, R. D. Taylor, *Proteins* **52**, 609 (Sep 1, 2003).
43. W. Sherman, T. Day, M. P. Jacobson, R. A. Friesner, R. Farid, *J Med Chem* **49**, 534 (Jan 26, 2006).
44. H. Claussen, C. Buning, M. Rarey, T. Lengauer, *J Mol Biol* **308**, 377 (Apr 27, 2001).
45. G. M. Morris *et al.*, *J Comput Chem* **30**, 2785 (Dec, 2009).
46. B. K. Shoichet, S. L. McGovern, B. Wei, J. J. Irwin, *Curr Opin Chem Biol* **6**, 439 (Aug, 2002).
47. A. R. Leach, B. K. Shoichet, C. E. Peishoff, *J Med Chem* **49**, 5851 (Oct 5, 2006).
48. R. Tiwari, K. Mahasanen, R. Pavlovicz, C. Li, W. Tjarks, *J Chem Inf Model* **49**, 1581 (Jun, 2009).
49. T. Cheng, X. Li, Y. Li, Z. Liu, R. Wang, *Journal of Chemical Information and Modeling* **49**, 1079 (2009).
50. M. H. Seifert, *Drug Discov Today* **14**, 562 (Jun, 2009).
51. M. Feher, *Drug Discov Today* **11**, 421 (May, 2006).
52. P. A. Kollman *et al.*, *Acc Chem Res* **33**, 889 (Dec, 2000).
53. J. Srinivasan, T. E. Cheatham, P. Cieplak, P. A. Kollman, D. A. Case, *Journal of the American Chemical Society* **120**, 9401 (1998).
54. M. A. Johnson, G. M. Maggiora, Eds., *Concepts and applications of molecular similarity*, (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1990), pp. 393.
55. B. Waszkowycz *et al.*, *J Med Chem* **37**, 3994 (Nov 11, 1994).
56. N. R. Tawari, S. Bag, M. S. Degani, *J Mol Model* **14**, 911 (Oct, 2008).
57. L. Michielan, S. Moro, *Journal of Chemical Information and Modeling* **50**, 961 (2010).
58. J. Verma, V. M. Khedkar, E. C. Coutinho, *Curr Top Med Chem* **10**, 95 (2010).
59. A. Bender *et al.*, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **10**, 719 (2007).
60. S. O. Jonsdottir, F. S. Jorgensen, S. Brunak, *Bioinformatics* **21**, 2145 (2005).
61. T. Klabunde, *British Journal of Pharmacology* **152**, 5 (2007).

62. A. Pozzan, *Current Pharmaceutical Design* **12**, 2099 (2006).
63. J. L. Jenkins, A. Bender, J. W. Davies, *Drug Discovery Today: Technologies* **3**, 413 (2006).
64. J. H. Nettles *et al.*, *J. Med. Chem* **49**, 6802 (2006).
65. J. Mestres, L. Martin-Couce, E. Gregori-Puigjane, M. Cases, S. Boyer, *J Chem Inf Model* **46**, 2725 (Nov-Dec, 2006).
66. S. Ekins, J. Mestres, B. Testa, *Br J Pharmacol* **152**, 21 (Sep, 2007).
67. . (American Cancer Society, 2010).
68. . (2011).
69. G. A. Colditz, T. A. Sellers, E. Trapido, *Nat Rev Cancer* **6**, 75 (2006).
70. C. B. Thompson, *Science* **267**, 1456 (Mar 10, 1995).
71. A. Richardson, S. B. Kaye, *Curr Mol Pharmacol* **1**, 244 (Nov, 2008).
72. A. Kazi *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, (2010).
73. L. A. Pradelli, M. Beneteau, J. E. Ricci, *Cell Mol Life Sci* **67**, 1589 (May, 2010).
74. E. Fire, S. V. Gulla, R. A. Grant, A. E. Keating, *Protein Sci* **19**, 507 (Mar, 2009).
75. M. Tan, J. Ooi, N. Ismail, A. Moad, T. Muhammad, *Pharmaceutical Research* **26**, 1547 (2009).
76. J. E. Chipuk, T. Moldoveanu, F. Llambi, M. J. Parsons, D. R. Green, *Molecular Cell* **37**, 299 (2010).
77. R. J. Youle, A. Strasser, *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47 (Jan, 2008).
78. H. Kim *et al.*, *Nat Cell Biol* **8**, 1348 (Dec, 2006).
79. S. Shangary, C. L. Oliver, T. S. Tillman, M. Cascio, D. E. Johnson, *Mol Cancer Ther* **3**, 1343 (Nov, 2004).
80. M. Kvensakul *et al.*, *Cell Death and Differentiation* **15**, 1564 (2008).
81. S. Dutta *et al.*, *Journal of Molecular Biology* **398**, 747 (2010).
82. J. E. Chipuk, D. R. Green, *Trends Cell Biol* **18**, 157 (Apr, 2008).
83. E. Lomonosova, G. Chinnadurai, *Oncogene* **27 Suppl 1**, S2 (Dec, 2008).
84. D. Spierings *et al.*, *Science* **310**, 66 (October 7, 2005, 2005).
85. L. Chen *et al.*, *Mol Cell* **17**, 393 (Feb 4, 2005).
86. E. F. Lee *et al.*, *Cell Death Differ* **14**, 1711 (Sep, 2007).
87. M. Bruncko *et al.*, *J Med Chem* **50**, 641 (Feb 22, 2007).
88. S. M. Osford, C. L. Dallman, P. W. Johnson, A. Ganesan, G. Packham, *Curr Med Chem* **11**, 1031 (Apr, 2004).
89. K. Garber, *Nat Biotechnol* **23**, 409 (Apr, 2005).
90. M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat Rev Cancer* **9**, 153 (2009).
91. T. Jacks, R. A. Weinberg, *Science* **280**, 1035 (May 15, 1998).
92. S. van den Heuvel, E. Harlow, *Science* **262**, 2050 (Dec 24, 1993).
93. C. Norbury, P. Nurse, *Annu Rev Biochem* **61**, 441 (1992).
94. G. K. Schwartz, M. A. Shah, *Journal of Clinical Oncology* **23**, 9408 (December 20, 2005, 2005).
95. K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman, *Cell Prolif* **36**, 131 (Jun, 2003).
96. D. Kato *et al.*, *FEBS Lett* **427**, 203 (May 8, 1998).
97. D. O. Morgan, *Nature* **374**, 131 (Mar 9, 1995).



## Optimització in silico de compostos antitumorals

98. C. J. Sherr, J. M. Roberts, *Genes Dev* **13**, 1501 (Jun 15, 1999).
99. H. Galons, N. Oumata, L. Meijer, *Expert Opin Ther Pat* **20**, 377 (Mar, 2010).
100. S. Ortega, M. Malumbres, M. Barbacid, *Biochim Biophys Acta* **1602**, 73 (Mar 14, 2002).
101. C. J. Sherr, *Science* **274**, 1672 (Dec 6, 1996).
102. A. S. Lundberg, R. A. Weinberg, *Mol Cell Biol* **18**, 753 (Feb, 1998).
103. L. Coultas, A. Strasser, *Apoptosis* **5**, 491 (Dec, 2000).
104. H. Matsushime *et al.*, *Mol Cell Biol* **14**, 2066 (Mar, 1994).
105. J. LaBaer *et al.*, *Genes Dev* **11**, 847 (Apr 1, 1997).
106. M. Cheng *et al.*, *EMBO J* **18**, 1571 (Mar 15, 1999).
107. R. P. Fisher, D. O. Morgan, *Cell* **78**, 713 (Aug 26, 1994).
108. N. R. Brown *et al.*, *J Biol Chem* **274**, 8746 (Mar 26, 1999).
109. S. H. Kim, U. Schulze-Gahmen, J. Brandsen, W. F. de Azevedo Junior, *Prog Cell Cycle Res* **2**, 137 (1996).
110. P. D. Jeffrey *et al.*, *Nature* **376**, 313 (Jul 27, 1995).
111. N. Dyson, *Genes Dev* **12**, 2245 (Aug 1, 1998).
112. J. Massague, *Nature* **432**, 298 (2004).
113. R. A. Woo, R. Y. Poon, *Cell Cycle* **2**, 316 (Jul-Aug, 2003).
114. P. Furet, *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**, 15 (Jan, 2003).
115. S. Wadler, *Drug Resist Updat* **4**, 347 (Dec, 2001).
116. P. L. Toogood *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **48**, 2388 (2005).
117. A. M. Senderowicz, *Oncogene* **22**, 6609 (Sep 29, 2003).
118. M. Malumbres, P. Pevarello, M. Barbacid, J. R. Bischoff, *Trends in Pharmacological Sciences* **29**, 16 (2008).
119. R. Soni, H. Fretz, L. Muller, J. Schoepfer, B. Chaudhuri, *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 794 (Jun 16, 2000).
120. R. Soni *et al.*, *J Natl Cancer Inst* **93**, 436 (Mar 21, 2001).
121. C. K. Ryu *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 461 (Mar 6, 2000).
122. H. W. Jeong *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 1819 (Aug 21, 2000).
123. G. Zhu *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 1231 (Apr 7, 2003).
124. G. Zhu *et al.*, *J Med Chem* **46**, 2027 (May 22, 2003).
125. D. W. Fry *et al.*, *J Biol Chem* **276**, 16617 (May 18, 2001).
126. M. Serrano, G. J. Hannon, D. Beach, *Nature* **366**, 704 (Dec 16, 1993).
127. M. Ruas, G. Peters, *Biochim Biophys Acta* **1378**, F115 (Oct 14, 1998).
128. I. Suzuki-Takahashi, H. Higashi, E. Yoshida, S. Nishimura, M. Kitagawa, *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 386 (May 19, 1997).
129. D. R. Green, G. I. Evan, *Cancer Cell* **1**, 19 (Feb, 2002).
130. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **100**, 57 (Jan 7, 2000).
131. J. C. Reed, *Am J Pathol* **157**, 1415 (Nov, 2000).
132. M. Sattler *et al.*, *Science* **275**, 983 (Feb 14, 1997).
133. A. M. Petros *et al.*, *Protein Sci* **9**, 2528 (Dec, 2000).

134. X. Liu, S. Dai, Y. Zhu, P. Marrack, J. W. Kappler, *Immunity* **19**, 341 (Sep, 2003).
135. E. M. Carrington *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10967 (Jun 15, 2010).
136. T. Kuwana *et al.*, *Mol Cell* **17**, 525 (Feb 18, 2005).
137. M. Certo *et al.*, *Cancer Cell* **9**, 351 (May, 2006).
138. D. Liu, B. Yang, R. Cao, Z. Huang, *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 4467 (Oct 15, 2005).
139. A. M. Petros *et al.*, *Protein Science* **9**, 2528 (2000).
140. B. Yang, D. Liu, Z. Huang, *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 1403 (Mar 22, 2004).
141. G. R. Marshall *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 487 (January 1, 1990, 1990).
142. C. Toniolo *et al.*, *Biopolymers* **22**, 205 (1983).
143. G. Basu, A. Kuki, *Biopolymers* **32**, 61 (Jan, 1992).
144. W. Feng, S. Huang, H. Wu, M. Zhang, *J Mol Biol* **372**, 223 (Sep 7, 2007).
145. M. D. Boersma, J. D. Sadowsky, Y. A. Tomita, S. H. Gellman, *Protein Sci* **17**, 1232 (Jul, 2008).
146. L. Schrödinger. (2010).
147. E. F. Lee *et al.*, *J Cell Biol* **180**, 341 (Jan 28, 2008).
148. S. Lapenna, A. Giordano, *Nat Rev Drug Discov* **8**, 547 (Jul, 2009).
149. Schrödinger. (New York, NY, 2010).
150. D. A. Case *et al.*, *J Comput Chem* **26**, 1668 (Dec, 2005).
151. L. Delgado-Soler, J. Ariñez-Soriano, J. Granadino-Roldán, J. Rubio-Martinez, *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)* **128**, 807 (2010).
152. J. Gasteiger, K. Funatsu, *Journal of Computer Chemistry, Japan* **5**, 53 (2006).
153. A. Varnek, A. Tropsha, Eds., *Cheminformatics Approaches to Virtual Screening*, (Royal Society of Chemistry, 2008).
154. R. E. Carhart, D. H. Smith, R. Venkataraghavan, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **25**, 64 (1985).
155. G. Schneider, W. Neidhart, T. Giller, G. Schmid, *Angew Chem Int Ed Engl* **38**, 2894 (Oct 4, 1999).
156. A. M. Helguera, R. D. Combes, M. P. Gonzalez, M. N. Cordeiro, *Curr Top Med Chem* **8**, 1628 (2008).
157. H. Matter, T. Pflüger, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **39**, 1211 (1999).
158. A. Schuffenhauer, V. J. Gillet, P. Willett, *J Chem Inf Comput Sci* **40**, 295 (Mar, 2000).
159. E. Gregori-Puigjane, J. Mestres, *J Chem Inf Model* **46**, 1615 (Jul-Aug, 2006).
160. L. Delgado-Soler, R. Toral, M. S. Tomas, J. Rubio-Martinez, *J Chem Inf Model* **49**, 2457 (Nov, 2009).



Reprinted from BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY, March 1998, Vol 82, No 3, p 213-218

ORIGINAL ARTICLES—Clinical science

## Endoresection of choroidal melanoma

Bertil Damato, Carl Groenewald, Jim McGalliard, David Wong

British Journal of Ophthalmology 1996, 80: 109-116

109

## Risk factors for metastatic uveal melanoma after trans-scleral local resection

Bertil E Damato, James Paul, Wallace S Foulds

616

ORIGINAL ARTICLES—Clinical science

British Journal of Ophthalmology 1993, 77: 616-623

## Predictive factors of visual outcome after local resection of choroidal melanoma

# PUBLICACIONES

Local resection of choroidal melanoma

conserving vision and the eye and which include brachytherapy,<sup>17-19</sup> teletherapy,<sup>20,21</sup> and trans-scleral local resection.<sup>22-25</sup> Previous studies have shown that after enucleation is performed, the visual outcome is significantly better than after radiotherapy.<sup>22</sup> Sight conserving surgery is preferred by a widely held opinion. It does not influence the prognosis of medium sized and large tumours disseminated by the time the

patients were to (i) identify metastasis after trans-scleral resection and (ii) establish whether or not survival is affected by the extent of the disease.



## PUBLICACIONS

A més de les publicacions que formen part de la present tesi doctoral, s'han realitzat diferents treballs en paral·lel que han quedat recollits en altres publicacions. A continuació es presenta la llista completa de publicacions de l'autor:

- “Molecular Determinants of BIM(BH3) Peptide Binding to Pro-Survival Proteins”, Laura Delgado-Soler, Marta Pinto, Jaime Rubio-Martínez, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2011**, **enviat**.

Presentat en el **Capítol 3.1** d'aquesta tesi.

- “Towards the design of combined therapies for restoring Bcl-2 activity”, Laura Delgado-Soler, Jaime Rubio-Martínez, *Journal of Molecular Biology*, **2011**, **enviat**.

Corresponent al **Capítol 3.2** d'aquesta tesi.

- “Structure-Based approach to the design of BakBH3 mimetic peptides with increased helical propensity”, Laura Delgado-Soler, Mar Orzaez, Jaime Rubio-Martínez, *Journal of Computational Chemistry*, **2011**, **en preparació**.

Resultats recollits en el **Capítol 3.3** d'aquesta tesi.

- “Predicting binding energies of CDK6 inhibitors in the hit-to-lead process”, Laura Delgado-Soler, Javier Ariñez-Soriano, Jose Manuel Granadino-Roldán, Jaime Rubio-Martínez, *Theoretical Chemistry Accounts*, 128, **2011**, 807-823, 17 pàgines.

Resultats inclosos en el **Capítol 4** de la tesi.

## Optimització in silico de compostos antitumorals

- “RED: A Set of Molecular Descriptors Based on Renyi Entropy”, Laura Delgado-Soler, Raúl Toral, María Santos Tomás, Jaime Rubio-Martínez, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49, **2009**, 2457-2468, 12 pàgines.

Es presenta en el **Capítol 5** d'aquesta tesi.

- “Rational design of new class of BH3-mimetics as inhibitors of the Bcl-xL protein”, Marta Pinto, María del Mar Orzaez, Laura Delgado-Soler, Juan Jesús Pérez, Jaime Rubio-Martínez, *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2011**, DOI: 10.1021/ci100501d.

Es presenta com **Annex A** de la tesi.

- “Quimiogenómica: una nueva aproximación al diseño de fármacos”, Laura Delgado-Soler, Jaime Rubio-Martínez, *LifeScienceLab*, Mayo-Junio **2009**, 41-43 / *FarmEspaña Industrial*, Noviembre-Diciembre **2009**, 73-75, 3 pàgines.

S'adjunta com **Annex B** de la tesi.







## ANNEX A.

# Rational design of new class of BH3-mimetics as inhibitors of the Bcl-x<sub>L</sub> protein

Marta Pinto, Mar Orzaez, Laura Delgado-Soler,  
Juan Jesús Pérez, and Jaime Rubio-Martínez\*

### ABSTRACT

*The Bcl-2 family of proteins plays an important role in the intrinsic pathway of cell apoptosis. Overexpression of pro-survival members of this family of proteins is often associated with the development of many types of cancer and confers resistance against conventional therapeutic treatments. Accordingly, antagonism of its protective function has emerged as an encouraging anti-cancer strategy. In the present work, we use a pharmacophore for describing interaction between the BH3 domain of different pro-apoptotic members and the pro-survival protein Bcl-x<sub>L</sub> in order to identify new lead compounds. In the strategy followed in the present work, the pharmacophore was derived from molecular dynamics studies of different Bcl-x<sub>L</sub>/BH3 complexes. This pharmacophore was later used as query for 3D database screening. Hits obtained from the search were computationally assessed and a subset proposed for in vitro testing. Two of the fifteen compounds assayed were found able to disrupt the Bcl-x<sub>L</sub>/Bak(BH3) complex with IC<sub>50</sub> values in the lower micromolar range. Finally, docking studies were performed to explore the binding mode of these compounds to Bcl-x<sub>L</sub> for further modifications.*

***Journal of Chemical Information and Modeling* (2011), articles ASAP.**

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci100501d>



## ANNEX B.

# Quimiogenómica: una nueva aproximación al diseño de fármacos

Laura Delgado-Soler y Jaime Rubio-Martínez\*

### RESUMEN

*En la era post-genómica, las aproximaciones al diseño de fármacos basadas en una única diana terapéutica están dejando paso, lenta pero inexorablemente, a una aproximación quimiogenómica. Se ha tomado consciencia de que, en la actualidad, tan sólo una pequeña proporción del proteoma humano ha sido analizada y por tanto, considerar las dianas terapéuticas como entidades aisladas que no interactúan entre sí, tiene un sentido limitado. Una visión quimiogenómica abre nuevas perspectivas en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. Por un lado, permite prever interacciones no esperadas entre receptores y fármacos. De esta manera, es posible predecir los efectos secundarios de un compuesto y reducir el número de compuestos que entran en la fase de desarrollo, que posteriormente podrían fallar por efectos no deseados. Por otro lado, es posible establecer potenciales interacciones para dianas o ligandos en base a su similitud con otros complejos conocidos aparentemente no vinculados entre sí. Además, el estudio global de un perfil farmacológico, permite identificar los motivos esenciales que aportan una determinada funcionalidad a un receptor o ligando y con ello una mejor comprensión de los procesos que tienen lugar.*

**LifeScienceLab, Mayo-Junio 2009, 41-43**

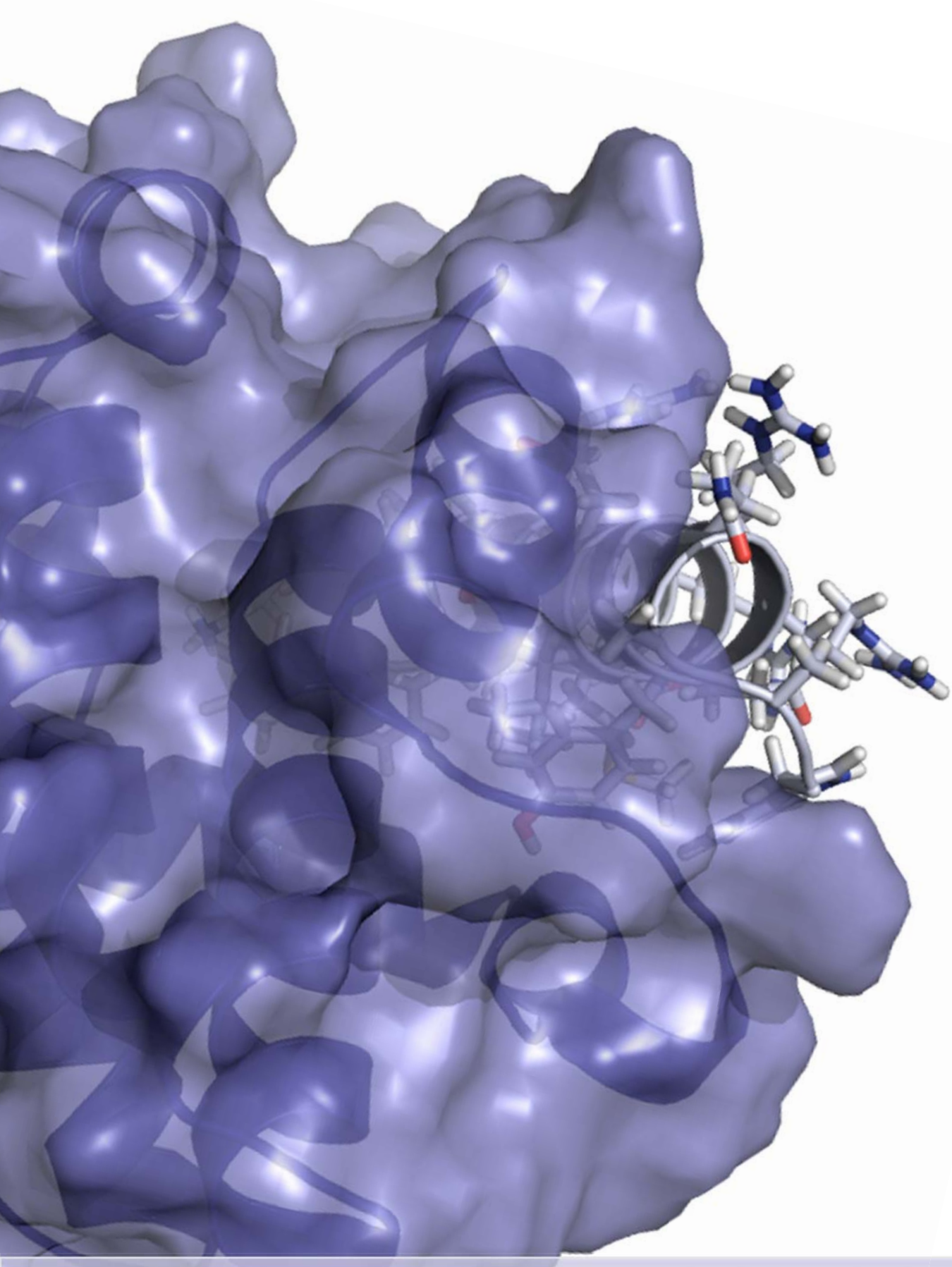
<http://www.lifescienceslab.com/es/revistas-digitales/mayo-junio-2009/#/41/>

**FarmEspaña Industrial, Noviembre-Diciembre 2009, 73-75**

<http://www.farmaindustrial.com/es/ediciones-digitales/noviembre-diciembre-2009#/72/>







El present projecte es basa en l'aplicació de la modelització molecular a la cerca de nous fàrmacs antitumorals. D'una banda, inhibidors de les proteïnes de la família Bcl-2 per a restablir els nivells normals d'apoptosi i, de l'altra, inhibidors de CDK4 i CDK6, importants reguladores del cicle cel·lular. L'objectiu a llarg termini és identificar compostos actius amb potència i selectivitat cap a aquestes proteïnes per tal de convertir-los en caps de sèrie que finalment puguin arribar a ser fàrmacs comercials.