



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Búsqueda de inhibidores
de la timidilato sintasa
como agentes
anticancerígenos**

Alumna: Rocío López González

Junio, 2021



**UNIVERSIDAD
DE JAÉN**



**Facultad de
Ciencias Experimentales**

Trabajo Fin de Grado

Búsqueda de inhibidores de la timidilato sintasa como agentes anticancerígenos

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Rocío López González'.

Alumna: Rocío López González

Jaén, Junio, 2021

ÍNDICE

1.	RESUMEN/ABSTRACT	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	Definición de cáncer	2
2.2.	Terapias contra el cáncer	2
2.3.	Agentes alquilantes.....	3
2.4.	Antimetabolitos	4
2.4.1.	Análogos de las pirimidinas	5
2.4.2.	Análogos de purinas	5
2.4.3.	Antifolatos	6
3.	TIMIDILATO SINTASA	9
3.1.	Estructura	9
3.2.	Mecanismo y función.....	11
4.	INHIBIDORES DE LA TIMIDILATO SINTASA	13
4.1.	Inhibidores análogos del sustrato dUMP.....	13
4.2.	Inhibidores análogos del cofactor (antifolatos)	14
5.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
5.1	Objetivos específicos	17
6.	DOCKING MOLECULAR	18
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
7.1	Estructura del sitio activo de la timidilato sintasa y modelo de docking	20
7.2	Estudio <i>in-silico</i> . Modelización molecular de los inhibidores descritos y formación del farmacóforo	23
7.2.1	Estudio in-silico de las moléculas propuestas	24
8.	CONCLUSIONES.....	41
9.	BIBLIOGRAFÍA	42

1. RESUMEN/ABSTRACT.

RESUMEN

En el presente Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de las características estructurales y funcionales de la enzima timidilato sintasa (TS), así como de los inhibidores descritos para esta proteína folato dependiente. La inhibición de la TS es uno de los principales objetivos en la terapia contra el cáncer debido a la implicación de ésta en la síntesis del ADN de las células cancerosas. Esta revisión consiste en la búsqueda de antifolatos que puedan actuar inhibiendo la función de la proteína.

La revisión bibliográfica ha permitido realizar la proposición de diversas estructuras que puedan actuar como inhibidores de la enzima mediante su estudio a través de modelización molecular. En este proceso de docking, y una vez caracterizado el sitio activo de la enzima, las moléculas propuestas han sido evaluadas a partir de los parámetros computacionales de afinidad (S) y energía de interacción.

ABSTRACT

In this dissertation, a bibliographic review of the structural and functional characteristics of the enzyme thymidylate synthase (TS) as well as the inhibitors described for this folate-dependent protein has been done. TS inhibition is one of the main targets in cancer therapy due to its involvement in DNA synthesis of cancerous cells. This review consists of the search for antifolates that can act by inhibiting the function of the protein.

From the information retrieved, different structures that can act as enzyme inhibitors have been proposed and they have been studied by molecular modelling. In this docking process, and once the active site of the enzyme has been characterized, the proposed molecules have been evaluated through their computational factors such as affinity (S) and interaction energy values.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Definición de cáncer.

El cáncer es un término colectivo que da nombre a un grupo de enfermedades caracterizadas por la pérdida de control en el crecimiento y división celular, lo que conduce a la formación de un tumor primario que invade y destruye los tejidos adyacentes (Avendaño y Menéndez, 2008a). El cáncer es causado normalmente por anomalías en el material genético (mutaciones) de las células involucradas, células cancerosas. Estas células se caracterizan por su alto índice de proliferación, por lo que la replicación del ADN resulta esencial para su supervivencia (Tong *et al.*, 2009).

Según estimaciones de GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), en 2012 se produjeron alrededor de 14,1 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes en todo el mundo, convirtiéndose en el responsable de aproximadamente el 13% de todas las muertes a nivel mundial (Avendaño y Menéndez, 2008a).

Debido a la alta mortalidad que causa el cáncer, durante años y hasta nuestros días, se han desarrollado numerosas líneas de investigación con el fin de encontrar tratamientos capaces de combatir este conjunto enfermedades (Avendaño y Menéndez, 2008a).

2.2. Terapias contra el cáncer.

Los tratamientos más habituales se basan en cirugía o radioterapia, siendo intervenciones muy localizadas. Sin embargo, a pesar de que aproximadamente la mitad de los pacientes intervenidos obtienen resultados satisfactorios, éstos no son permanentes (Avendaño y Menéndez, 2008a).

Las terapias basadas en quimioterapia son más específicas debido a que utilizan fármacos antineoplásicos que actúan directamente sobre las células tumorales malignas, inhibiendo su crecimiento y división celular (Avendaño y Menéndez, 2008a).

Existe una amplia variedad de agentes antineoplásicos, los cuales se diferencian en función de su mecanismo o punto de acción. Entre los que actúan sobre el ADN destacan los agentes alquilantes y los antimetabolitos. (Casas *et al.*, 2002).

2.3. Agentes alquilantes.

Los agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógenos y alquilsulfonatos (Fig. 2.1), son agentes antineoplásicos que se unen al ADN mediante enlaces covalentes bloqueando la replicación celular (Latosińska y Latosińska, 2013).

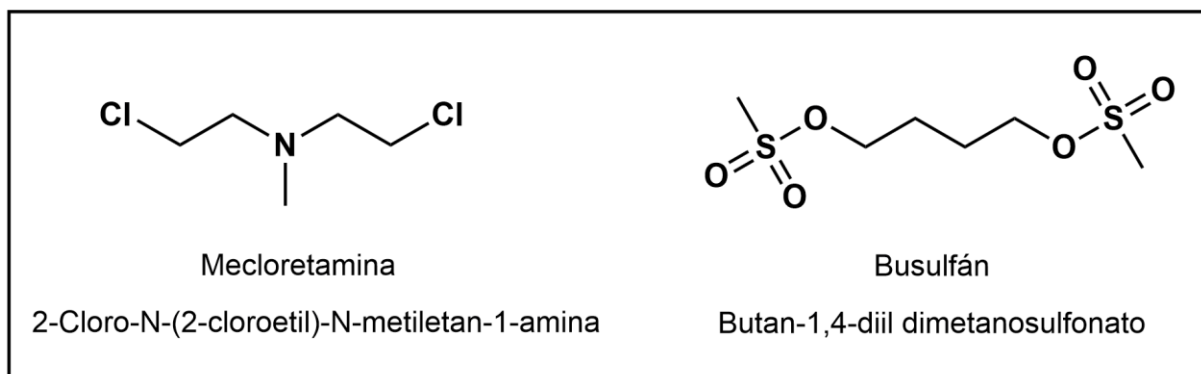


Figura 2.1. Estructuras de la Mecloretamina (mostaza de nitrógeno) y del Busulfán (alquilsulfonato).

Los mecanismos de acción que emplean son la formación de enlaces cruzados entre cadenas, evitando así su separación durante las etapas de síntesis y transcripción, así como la inducción de un emparejamiento incorrecto de nucleótidos. El objetivo común de todos ellos es la alteración de la función del ADN, provocando así que se produzca la apoptosis o muerte celular (Latosińska y Latosińska, 2013).

Los efectos adversos de estos agentes son la poca especificidad, ya que pueden actuar en todas las fases del ciclo de la célula (Fig. 2.2) y la gran capacidad de inducir cánceres secundarios (Latosińska y Latosińska, 2013). A causa de estos inconvenientes, los alquilantes están clasificados como cancerígenos en IARC (International Agency for Research on Cancer). <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>

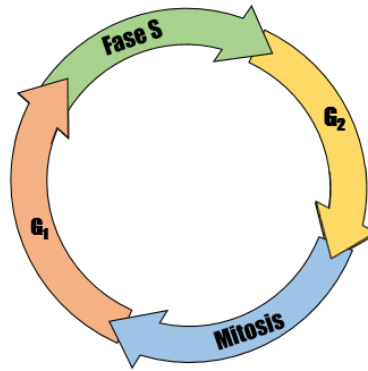


Figura 2.2. Fases del ciclo celular. G₁ y G₂: fases preparatorias para la división celular (aumento de tamaño y número de orgánulos); fase S o de síntesis (duplicación del ADN); fase M o mitosis (división física de la célula).

Por el contrario, los antimetabolitos son más específicos puesto que actúan únicamente sobre las células cancerosas en una fase concreta del ciclo celular, la fase S, etapa en la cual tiene lugar la replicación o síntesis del ADN (Latosińska y Latosińska, 2013).

2.4. Antimetabolitos.

Los metabolitos son compuestos del metabolismo celular que se generan y/o participan en rutas metabólicas esenciales como, por ejemplo, la síntesis de ácidos nucleicos. Sus competidores, los antimetabolitos, modulan los procesos biosintéticos en los que participan mediante diversos mecanismos de acción, como la inhibición. El mecanismo por el cual actúan los antimetabolitos que interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos (antifolatos, análogos de pirimidina y purina) está basado en la competición con los propios metabolitos por el sitio activo de las enzimas que participan en los procesos de biosíntesis, o en la incorporación de estos análogos en los ácidos nucleicos, provocando el proceso de apoptosis o muerte celular (Avendaño y Menéndez, 2008b).

A pesar de que las enzimas inhibidas por los antimetabolitos también están presentes en las células normales, es posible conseguir cierta selectividad hacia las células cancerosas teniendo en cuenta la tasa de división celular, la cual es más rápida en éstas últimas (Avendaño y Menéndez, 2008b).

2.4.1 Análogos de las pirimidinas.

Las pirimidinas (citosina, uracilo y timina) corresponden con uno de los grupos de bases nitrogenadas que forman parte de los nucleótidos (bloques estructurales del ADN y ARN). Sus análogos (Fig. 2.3), tanto de la base nitrogenada como del nucleósido, presentan una estructura similar con diferencias estructurales en alguno de los carbonos o hidrógenos del propio anillo de pirimidina o del azúcar (Daher *et al.*, 1990).

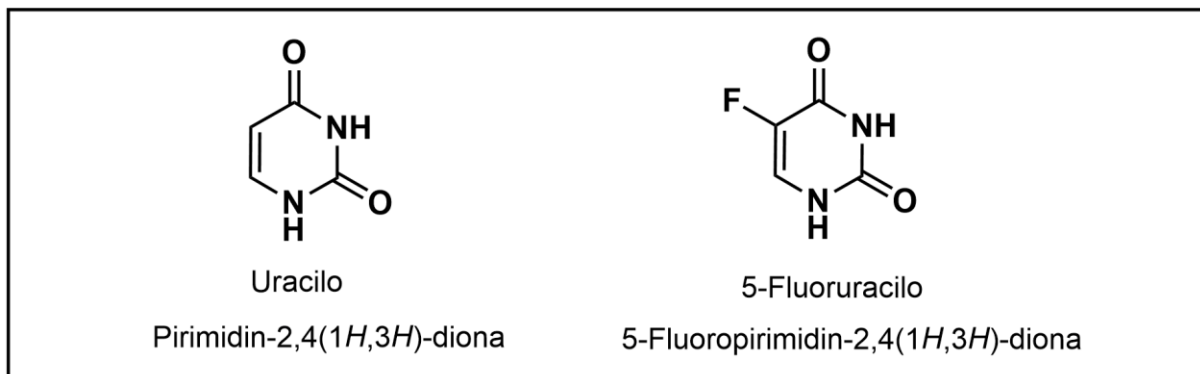


Figura 2.3. Estructura de la base pirimidínica uracilo y de su análogo 5-fluoruracilo.

A pesar de las diferencias estructurales señaladas, estos análogos pueden ser absorbidos por la célula y metabolizados por las vías de las pirimidinas endógenas, llegando a incorporarse en las moléculas de ácidos nucleicos. La citotoxicidad se produce cuando el antimetabolito se incorpora en la molécula de ADN o ARN en lugar del metabolito de pirimidina natural o cuando compite con éste por el sitio activo de la enzima crítica del proceso y por consiguiente, induce la muerte celular (Daher *et al.*, 1990).

2.4.2 Análogos de purinas.

Las purinas (adenina y guanina) constituyen el otro gran grupo de bases nitrogenadas constituyentes del ADN y ARN. Debido al importante papel que tienen estos compuestos en la síntesis de ácidos nucleicos, sus análogos (Fig. 2.4) evitan la incorporación de las bases endógenas en la síntesis del ADN, lo que conlleva a la interrupción de la reproducción celular (Latosińska y Latosińska, 2013).

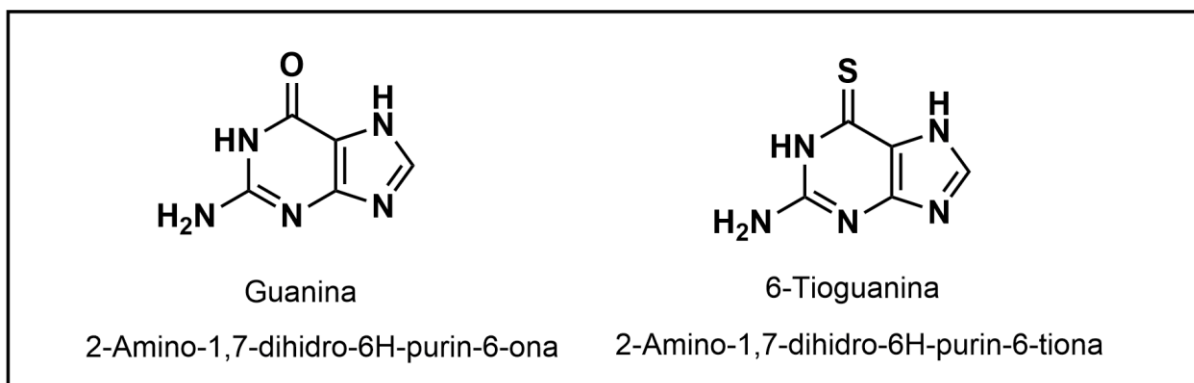


Figura 2.4. Estructura de la base púrica guanina y de su análogo 6-Tioguanina.

De manera similar a los antimetabolitos de las pirimidinas, los análogos de las purinas inhiben la proliferación celular de crecimiento rápido (Shpigun y Andryukhina, 2019). Además, ambos grupos de antimetabolitos están clasificados como agentes del grupo 3 en IARC “no clasificados como cancerígenos”.

2.4.3 Antifolatos.

Los folatos constituyen una familia de vitaminas humanas esenciales que se presentan en forma oxidada como ácido fólico (Fig. 2.5) o en formas de tetrahidrofolato reducido (Fig. 2.6), estructuras fisiológica y biosintéticamente activas (Gonen y Assaraf, 2012).

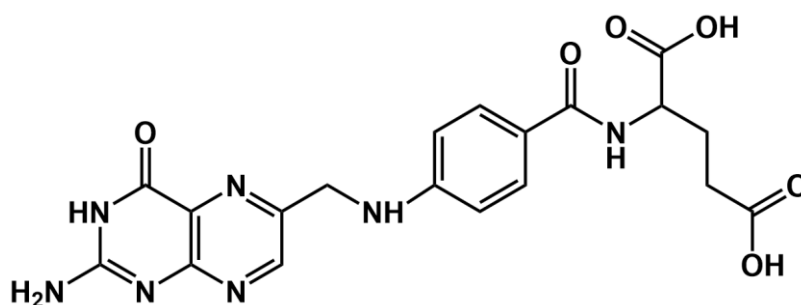
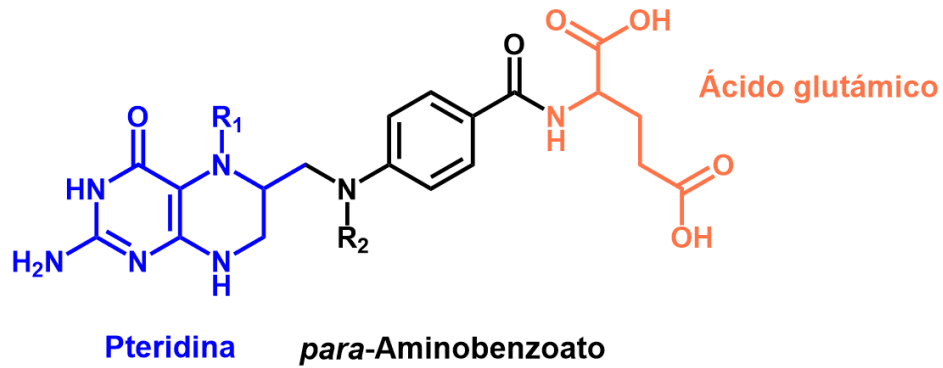


Figura 2.5. Estructura del ácido fólico.

Se conocen como folatos reducidos al tetrahidrofolato (THF) y sus derivados (5-formil-THF, 10-formil-THF, 5-metil-THF, 5,10-metilen-THF, 5,10-metenil-THF). Su estructura se basa en un anillo de pteridina, un *para*-aminobenzoato (p-ABA) y un

ácido glutámico (Fig. 2.6). Ejercen un papel fundamental en la regulación de la síntesis del ADN (Assaraf *et al.*, 2014).



R ₁	R ₂	DERIVADO
H	H	THF
CHO	H	5-FORMIL-THF
H	CHO	10-FORMIL-THF
CH ₃	H	5-METIL-THF
-CH ₂ -		5,10-METILEN-THF
=CH-		5,10-METENIL-THF

Figura 2.6. Estructura general de los folatos naturales.

Los folatos reducidos actúan como cofactores en reacciones de transferencia de un átomo de carbono de rutas sintéticas y catabólicas que ocurren principalmente en el citosol y la mitocondria, incluida la síntesis de purina y timidilato (Fig. 2.7). Debido a la importancia del metabolismo del folato en la proliferación celular, los antifolatos son ampliamente utilizados en quimioterapia (McGuire, 2005).

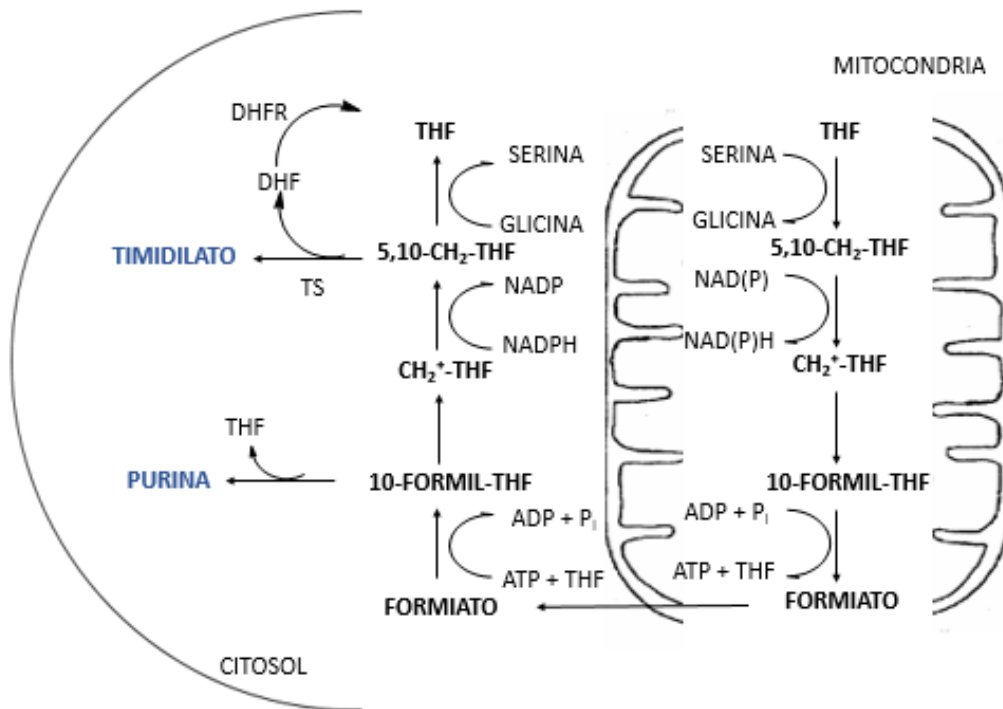


Figura 2.7. Reacciones dependientes de folato. Elaboración propia.

Los fármacos antifolatos imitan a uno o más de los cofactores de folato y compiten por el sitio de unión de estos cofactores en las enzimas bloqueando su función (Jackman *et al.*, 2008). Estos fármacos perturban la ruta metabólica del folato provocando desequilibrios en las reservas de nucleótidos celulares. Como efecto final, se desacelera el crecimiento de las células cancerosas y, por consiguiente, el crecimiento tumoral debido al deterioro de la replicación y reparación del ADN (Assaraf *et al.*, 2014).

Una de las reacciones dependiente de folato más importante en el estudio de la quimioterapia es la reacción catalizada por la enzima timidilato sintasa, puesto que proporciona la única fuente de timidilato, uno de los precursores para la síntesis del ADN (McGuire, 2005).

3. TIMIDILATO SINTASA.

La timidilato sintasa (TS, **EC 2.1.1.45**) es una enzima homodimérica encargada de catalizar la metilación reductiva para la formación de la desoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir de desoxiuridilato (dUMP), utilizando el folato reducido 5,10-metilen-tetrahidrofolato (5,10-metilen-THF) como dador de un grupo metilo (Fig. 3.8). Además de la dTMP, se obtiene dihidrofolato (DHF) como producto de la transposición del metilo del cofactor al C₅ del dUMP (Wu y Santi, 1987).

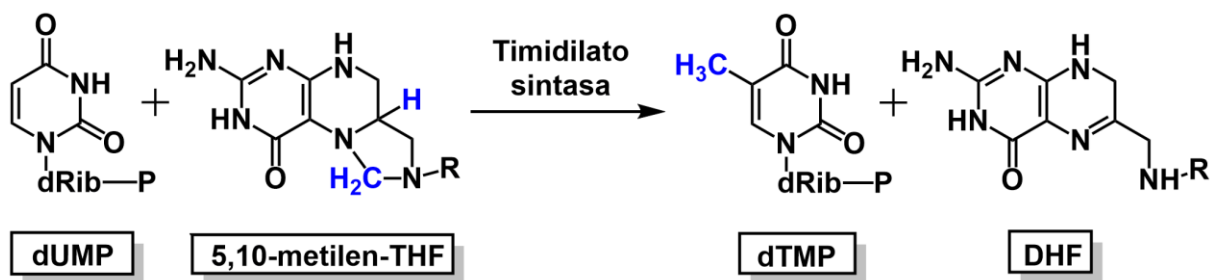


Figura 3.8. Síntesis del 2-desoxitimidina-5-monofosfato (dTMP), donde "dRib-P" simboliza el azúcar desoxirribosa de los nucleótidos monofosfato.

A causa del papel fundamental de la TS en la síntesis de nucleótidos, el aumento de la actividad de la enzima es característico de las células tumorales debido a su alta tasa de crecimiento. Por tanto, la búsqueda de sustancias biológicamente activas que sean capaces de inhibir a esta enzima y, por tanto, ralentizar el proceso de biosíntesis de ADN en las células cancerosas, representa un enfoque terapéutico para controlar el crecimiento tumoral (Khairullina *et al.*, 2018).

3.1. Estructura de la TS.

La composición de la enzima en humanos (*hTS*) se basa en 313 residuos. Su disposición espacial (Fig. 3.9) la forman hélices α y láminas β dispuestas en tres capas (Almog *et al.*, 2001).

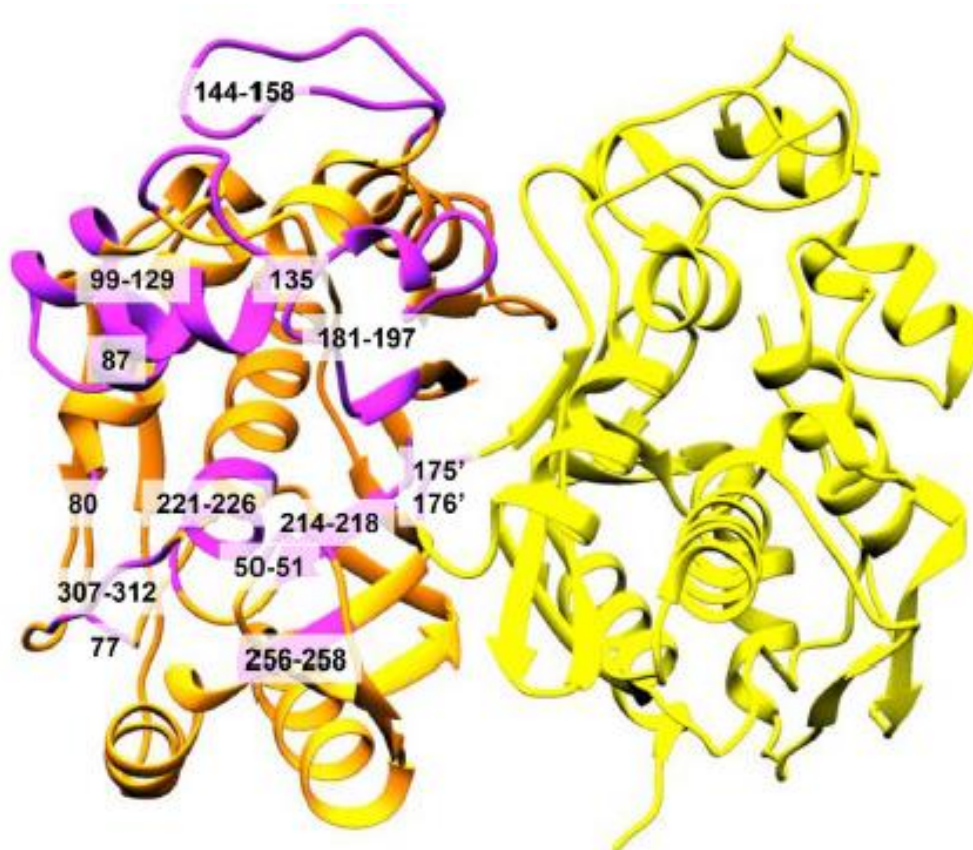


Figura 3.9. Monómeros de la TS diferenciados en amarillo y naranja. Las regiones en violeta y numeradas representan algunos de los residuos de aminoácidos que recubren el sitio activo de la proteína (Ferrari *et al.*, 2018).

Cada subunidad de la enzima contiene un sitio de unión a los cuales se enlazan los sustratos de manera secuencial. Primero, tiene lugar la unión del sustrato dUMP, seguida por el cofactor de folato 5,10-metilen-THF. La unión de este último al sistema binario inicia una serie de cambios conformacionales y el cierre del C-terminal sobre el sitio activo que facilita la catálisis (Felder *et al.*, 2002).

La proteína nativa existe en equilibrio entre dos estados conformacionales, estado activo e inactivo. En la conformación activa la Cys¹⁹⁵, residuo de aminoácido que se encuentra en el sitio activo y es la responsable de la catálisis, permite que se establezca la interacción entre la enzima y los sustratos fisiológicos (dUMP y 5,10-metilen-THF) o con sus respectivos análogos (Berger *et al.*, 2004).

La conformación inactiva se caracteriza por un cambio en la conformación del sitio activo debido a la presencia de un bucle en los residuos 181-197, lo que genera

un desplazamiento de la posición de la Cys¹⁹⁵ con respecto a su posición en la conformación activa impidiendo la interacción con sus sustratos y, por consiguiente, la catálisis. De esta forma, en función de los ligandos presentes, se puede inducir una conformación u otra (Berger *et al.*, 2004).

3.2. Mecanismo y función de la TS.

La timidilato sintasa cataliza la conversión del dUMP a dTMP a través de una metilación reductiva donde se produce la transferencia de un átomo de carbono del cofactor 5,10-metilen-THF al anillo pirimidínico del uracilo. El cofactor actúa como reductor oxidándose a dihidrofolato (DHF). Secuencialmente, el dTMP es fosforilado a desoxitimidilato trifosfato (dTTP), precursor directo de la síntesis de ADN (Wu y Santi, 1987).

Esta reacción es esencial para la discriminación adecuada de las otras tres bases presentes en el ADN a través de los factores de transcripción. Además, la importancia de esta reacción radica en que es la única vía que proporciona timidilato para la formación *de novo* ADN (Avendaño y Menéndez, 2008b).

La función catalítica de la TS (en su estado activo homodimérico) se lleva a cabo a través del residuo catalítico Cys¹⁹⁵. Este mecanismo (Anderson *et al.*, 2000) (Fig. 3.10) se desarrolla en una secuencia de distintos pasos:

1. Se inicia con una adición de Michael en la que se genera un enlace covalente entre la posición 6 del dUMP y el grupo tiol (-SH) del sitio activo de la enzima que actúa como nucleófilo. Como resultado se obtiene un enol.
2. Seguidamente se produce un ataque nucleófilo del carbono alfa del enol al carbono imínico generado a partir de la apertura del anillo de imidazolidina del cofactor folato.
3. Se forma así el complejo ternario formado por la enzima, el cofactor y el sustrato.
4. A continuación, se produce una reacción de reducción que conlleva la eliminación del H en la posición alfa del carbonilo captado por un resto

básico de la enzima. Se genera así un metileno y se rompe la unión con el cofactor.

- La separación del cofactor da lugar a la formación de un aceptor de Michael (metileno), que será atacado por el anión hidruro generado en la posición alfa del nitrógeno del cofactor saliente. Se produce así una reacción de oxidación-reducción en la cual se oxida el THF y se reduce el anillo de pirimidina con la separación y regeneración de la enzima.
- Como resultado se obtiene el producto final dTMP y el cofactor como DHF.

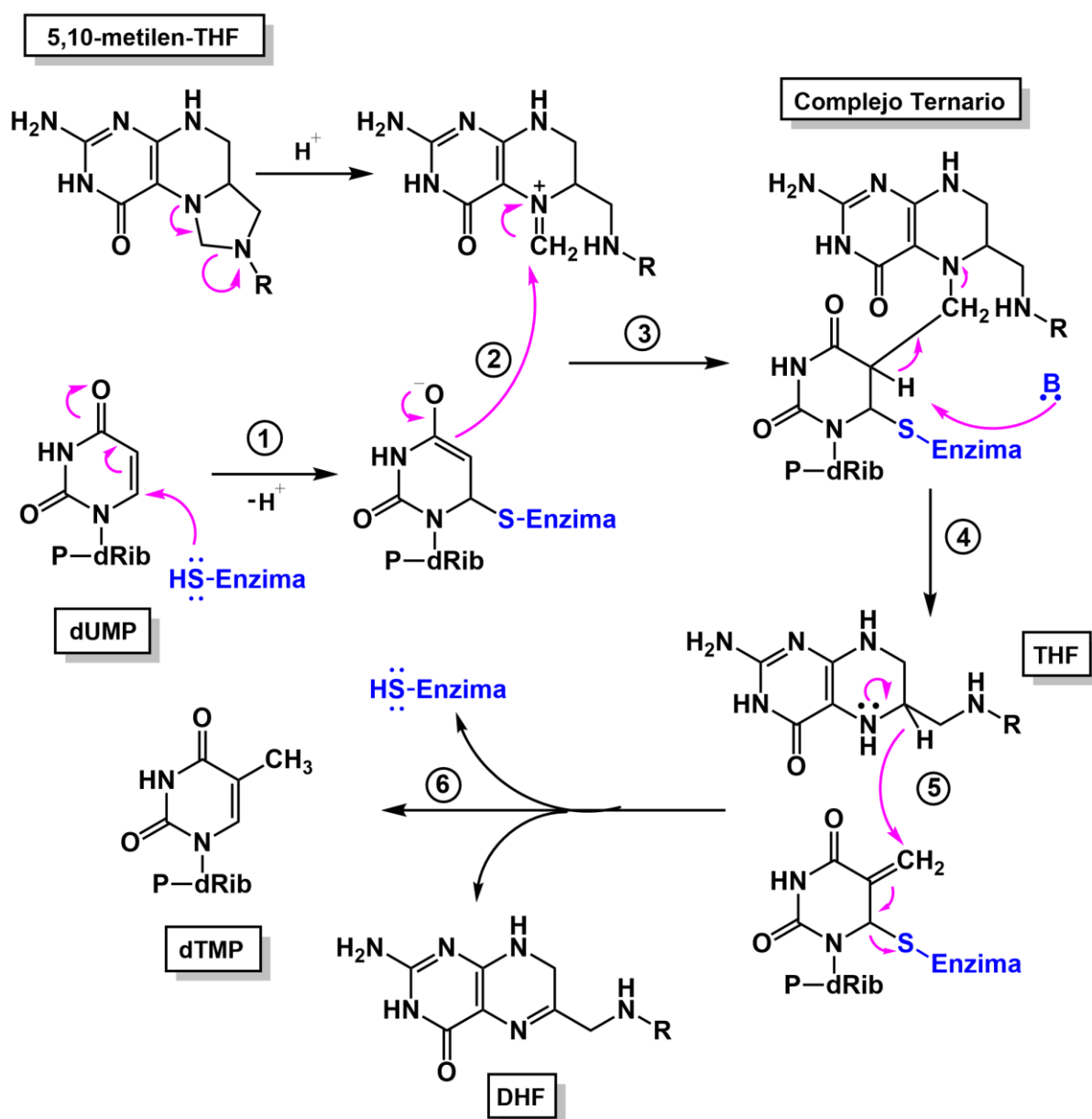


Figura 3.10. Mecanismo catalítico de la timidilato sintasa. Elaboración propia a partir de (Anderson *et al.*, 2000).

4. INHIBIDORES DE LA TIMIDILATO SINTASA.

Durante las cuatro últimas décadas, la síntesis y evaluación de inhibidores de la TS se ha centrado en la modificación estructural de metabolitos naturales como precursores de la síntesis del ADN y ARN (antifolatos), así como del sustrato dUMP. Más recientemente se han estudiado inhibidores de folato que no están relacionados estructuralmente con el cofactor (Costi *et al.*, 2005).

Los inhibidores utilizados en quimioterapia se basaban en la unión y estabilización de la conformación activa de la *h*TS. Sin embargo, se observaba una elevación en los niveles de TS en las células tratadas con estos inhibidores. Con el fin de solucionar este efecto, se propuso el uso de inhibidores que estabilizaran la conformación inactiva. Estos presentan la doble ventaja de inhibir la catálisis, ya que inactivan la enzima, así como prevenir la elevación de los niveles de TS (Berger *et al.*, 2004).

4.1. Inhibidores análogos del sustrato dUMP.

Estos compuestos, estructuralmente semejantes al sustrato dUMP (Fig. 4.11) actúan inhibiendo indirectamente la enzima TS. El efecto principal de esta inhibición es la perturbación de la proporción de dTMP frente a dUMP, aumentando los niveles de este último. Este hecho provoca la incorporación errónea del dUTP (nucleótido trifosfato) en la cadena en formación de ADN lo que conduce a la apoptosis celular, proceso que se conoce como "muerte sin timina" (Costi *et al.*, 2005).

En la figura 4.11 se muestran varios ejemplos de este grupo de inhibidores, como son el inhibidor 5-fu que actúa como precursor del fluoruridilato (dFUMP). Otros inhibidores no descritos en PDB (Protein Data Base) a destacar se corresponden con variaciones estructurales del fluoruridilato, como, por ejemplo, el NO₂dUMP y CF₃dUMP, así como el nucleósido de citosina dCMP.

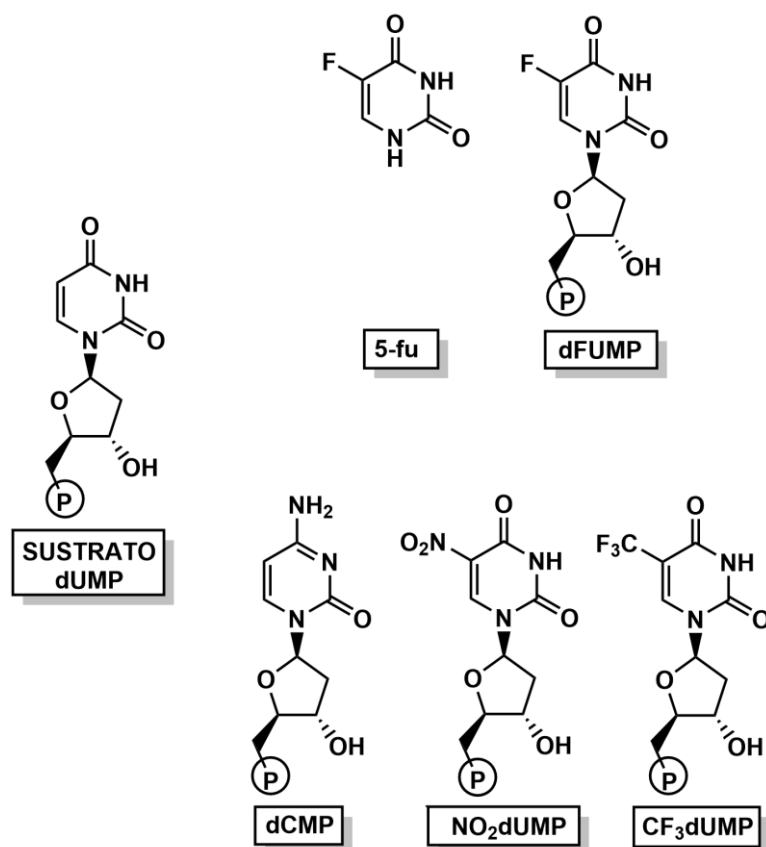


Figura 4.11. Estructura de los análogos del sustrato dUMP.

4.2. Inhibidores análogos del cofactor (antifolatos).

El desarrollo de este tipo de inhibidores está basado en la búsqueda de sustancias biológicamente activas capaces de inhibir selectivamente la TS y, por tanto, ralentizar el proceso de biosíntesis de ADN en células tumorales (Costi *et al.*, 2005).

Los antifolatos clásicos (Fig. 4.12) requieren de la acción de portadores y del metabolismo intracelular para transformarse en una forma más selectiva. Para ingresar a la célula, necesitan un portador llamado Portador de Folato Reducido (Reduce Folate Carrier, RFC) y una vez dentro es necesario que tenga lugar el metabolismo de la folilpoliglutamato sintasa (FPGS) por el cual los antifolatos son poliglutamados y pueden quedar retenidos dentro de las células (Costi *et al.*, 2005).

Las estructuras de este conjunto de inhibidores, así como sus datos de IC₅₀ (Gangjee *et al.*, 2001) (Kumar *et al.*, 2013) se muestran en la figura 4.12.

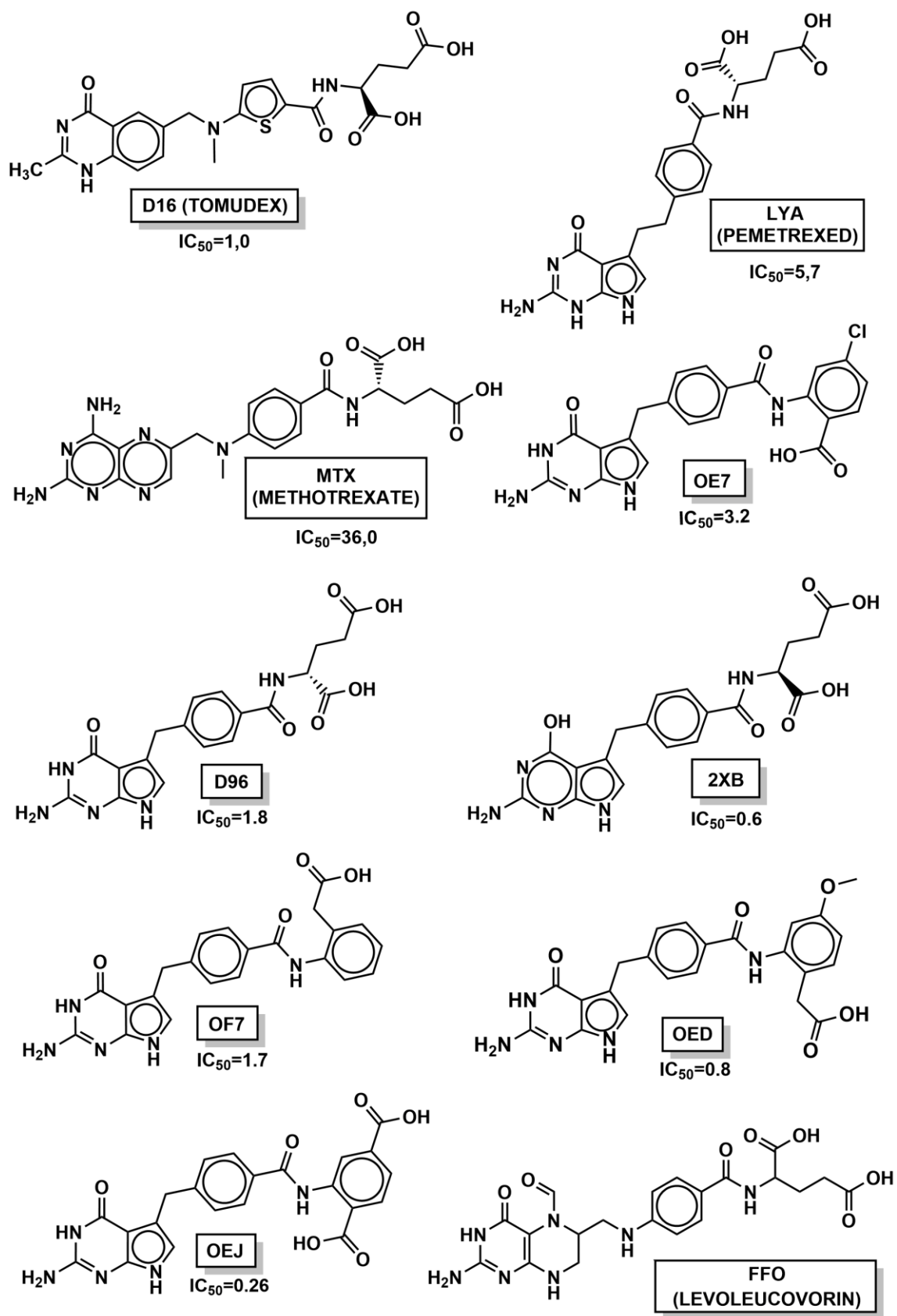


Figura 4.12. Antifolatos clásicos con valores de IC_{50} (μM). Se nombran con los códigos asociados por la PDB.

Además de los inhibidores antifolatos clásicos, se describen otro tipo de antifolatos (Fig. 4.13) que presentan estructuras con un esqueleto completamente diferente al ácido fólico. Como consecuencia, su acción será independiente de la expresión de RFC y FPGS (Costi *et al.*, 2005).

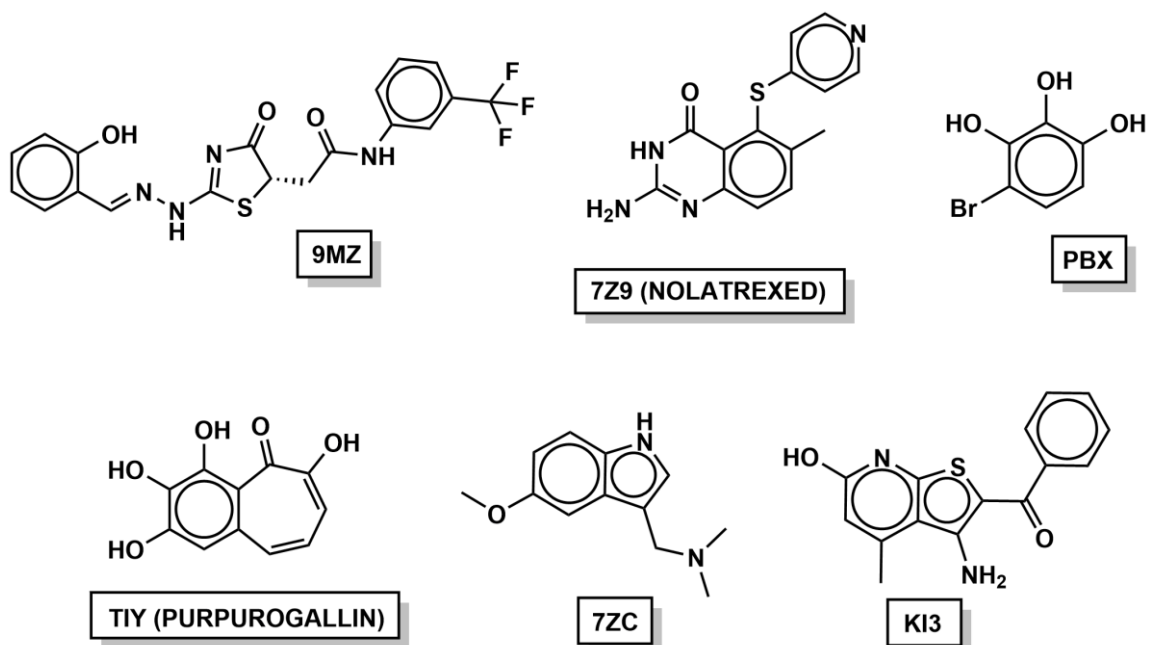


Figura 4.13. Antifolatos no clásicos con los códigos asociados por la PDB.

5. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El principal objetivo de este trabajo consiste en llevar a cabo un estudio mediante modelización molecular de un conjunto de moléculas, cuyas estructuras generales se muestra en figura 5.14, con el fin de poder encontrar nuevos inhibidores potenciales de la enzima timidilato sintasa.

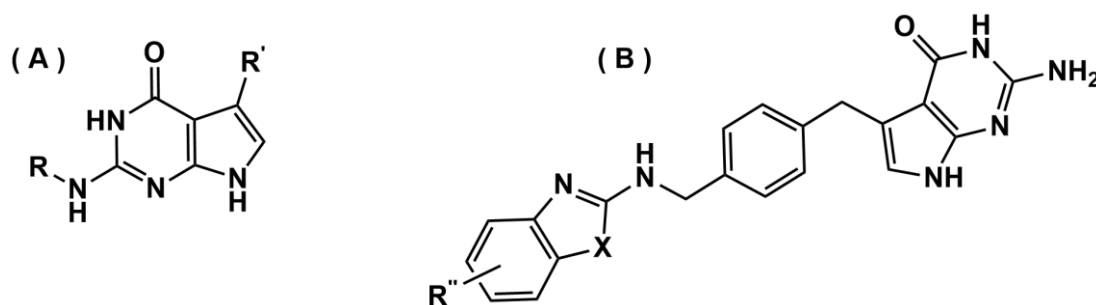


Figura 5.14. Estructura general de las moléculas propuestas del grupo I (A) y del grupo II (B).

De esta forma, el objetivo general se ha desglosado en el siguiente plan de trabajo (objetivos específicos):

5.1. Objetivos específicos.

Los objetivos específicos que se han establecidos son los siguientes:

- Conocer la enzima timidilato sintasa a través del estudio de su estructura y función.
- Conocer la estructura y mecanismo de acción de los inhibidores descritos para la proteína mediante la revisión de éstos en la base de datos PDB.
- Establecer un patrón estructural genérico a partir de la revisión de inhibidores que sirva como núcleo en la proposición de nuevas estructuras.
- Realizar una modelización molecular de dichas moléculas.
- Estudiar los resultados obtenidos en la modelización mediante el análisis de las energías de interacción y la afinidad, así como discutir y comparar estos resultados computacionales para las diferentes estructuras.

6. DOCKING MOLECULAR.

El proceso de docking se ha realizado utilizando el software computacional MOE 2019.0102 (Molecular Operating Environment).

MOE permite generar conformaciones, así como definir un farmacóforo y utilizarlo con el fin de mejorar el cribado virtual. Además, permite detectar y analizar el sitio activo de proteínas, dibujar superficies moleculares y mapas de densidad electrónica.

Para realizar el proceso de docking es necesario preparar los complejos que vayan a ser analizados. De este modo, el procedimiento llevado a cabo para el complejo **6PF5** se define a continuación:

-En primer lugar, se eliminan todas las cadenas similares de la proteína a excepción de una, utilizando el editor de secuencias (SEQ).

-Seguidamente, se procede a incluir protones en la estructura que en la base de datos PDB de rayos X no se incluyen. Para ello se utiliza la herramienta 'Protonate 3D'. Además, en este paso el programa identifica y trata de corregir residuos de proteínas donde son posibles múltiples estados rotámeros, protómeros y/o tautoméricos, como, por ejemplo:

- Rotámeros de -SH, -OH, CYS, SER, TYR Y THR.
- Estados de ionización de ácidos y bases en los aminoácidos de ARG, ASP, GLU, HYS y LYS.
- Tautómeros de imidazoles (HIS) y ácidos carboxílicos (ASP, GLU).

-En el siguiente paso se verifica la carga correcta de los heteroátomos.

-El paso final consiste en la minimización de la energía del sistema utilizando un campo de fuerza, en este caso, el campo Amber12EHT. Esta minimización consiste en encontrar un conjunto de coordenadas atómicas que correspondan a un

mínimo local de la función de energía molecular. Además, se seleccionan unas restricciones que mantienen rígidas las moléculas de agua. El gradiente es de 0.1 RMS, lo que significa que la minimización de energía terminará cuando el gradiente cuadrático medio caiga por debajo del valor especificado (0.1).

Con este procedimiento se consigue definir la proteína, su sitio activo y su ligando (**OED**).

El siguiente paso consiste en evaluar el acoplamiento de las diferentes moléculas propuestas, las cuales han sido previamente cargadas en una base de datos (extensión *.mdb) que actuará como archivo de entrada en el proceso de docking. Para ello y con el fin de garantizar que cada estructura esté en una forma adecuada para los pasos de modelado posteriores, es necesario seguir un proceso de preparación. Esta preparación consiste en un primer lavado (basado en la eliminación de sales y ajuste de la protonación), además de una verificación de que las cargas parciales sean correctas y una minimización de la energía de las moléculas.

El proceso de docking requiere de una serie de parámetros como son el número de poses devueltas (disposiciones aleatorias del ligando): 2000, puntuación de colocación: London dG (estima la energía libre de unión del ligando de una determinada pose), y poses de colocación (número de poses que pasan a la etapa de refinamiento: 30. En la etapa de refinamiento se deben definir además el método de refinamiento: receptor rígido, y la puntuación de refinamiento: GBI/WSA dG (función de puntuación basada en el campo de fuerza que estima la energía libre de unión del ligando de una pose determinada), además de las poses de refinamiento (número de poses que se retienen para escribir en la salida): 5.

Una vez realizado el docking y determinada la mejor pose para cada ligando, se realiza un proceso de minimización adicional utilizando la mecánica molecular y el campo de fuerza especificado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Estructura del sitio activo de la timidilato sintasa y modelo de docking.

El sitio activo de la timidilato sintasa ha sido caracterizado con distintos ligandos y el complejo enzima-ligando **OED** (cuyo código PDB es **6PF5**) fue elegido para su representación (Fig. 7.15).

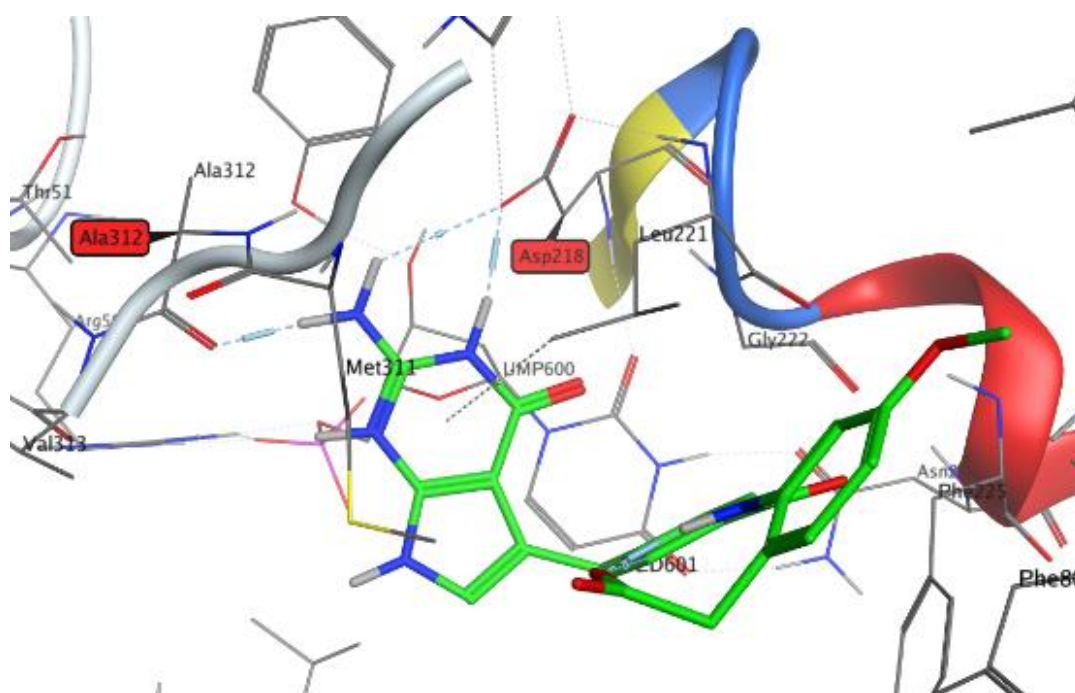


Figura 7.15. Complejo TS-Ligando **6PF5**.

El complejo **6PF5** tiene un ligando que compite contra el cofactor folato en el sitio activo. Dicho ligando es el ácido-2-(2-(4-((2-amino-4-oxo-4,7-dihidro-3H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il)metil)benzamida)-4-metoxifenil), también conocido como **OED**.

El criterio que se ha seguido para elegir al ligando **OED** como el ligando de referencia ha sido la evaluación y comparación de los parámetros de afinidad (S) y energía de interacción de las distintas moléculas de los diferentes complejos TS-ligando de la PDB con los residuos de aminoácidos esenciales, así como los datos de inhibición (IC_{50}) bibliográficos.

La afinidad mide cómo se ajusta la molécula en el sitio activo, por lo que cuanto más negativo sea el valor de afinidad, mejor encajará el ligando. Del mismo modo, la energía de interacción informa sobre la fortaleza de las interacciones que se establecen entre el ligando y los principales residuos de aminoácidos del sitio activo de la proteína.

Además de los datos de afinidad y energías de interacción que se obtienen de manera computacional, también se tienen en cuenta los valores de IC₅₀ encontrados mediante búsqueda bibliográfica. Este valor es una medida que hace referencia a la concentración necesaria para que un compuesto pueda inhibir al 50% la actividad de la enzima a la cual se une el inhibidor en cuestión.

Los resultados de los parámetros experimentales obtenidos para el ligando **OED** de S de -8,19 Kcal/mol muestran su buena afinidad con el sitio activo. Adicionalmente, esa afinidad se ve complementada por buenos valores de energía de interacción de -4,6, -8,1 y -14,5 Kcal/mol con los residuos de aminoácidos Ala³¹², Asp²¹⁸ y Arg⁷⁸ respectivamente.

En la figura 7.16 se muestran las distintas interacciones que se establecen entre el ligando **OED** y los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo de la TS. La mayoría de los heteroátomos del ligando participan en enlaces de hidrógeno, dadores en el caso del sustituyente amino con el residuo básico de Ala³¹² y uno de los -NH de la pirimidona con el residuo ácido de Asp²¹⁸, así como enlaces aceptores como ocurre entre el sustituyente carboxilo y el residuo básico de Arg⁷⁸. Además, se producen interacciones π-π y π-catión entre grupos aromáticos, como el caso del fenilo central con el residuo Leu²²¹.

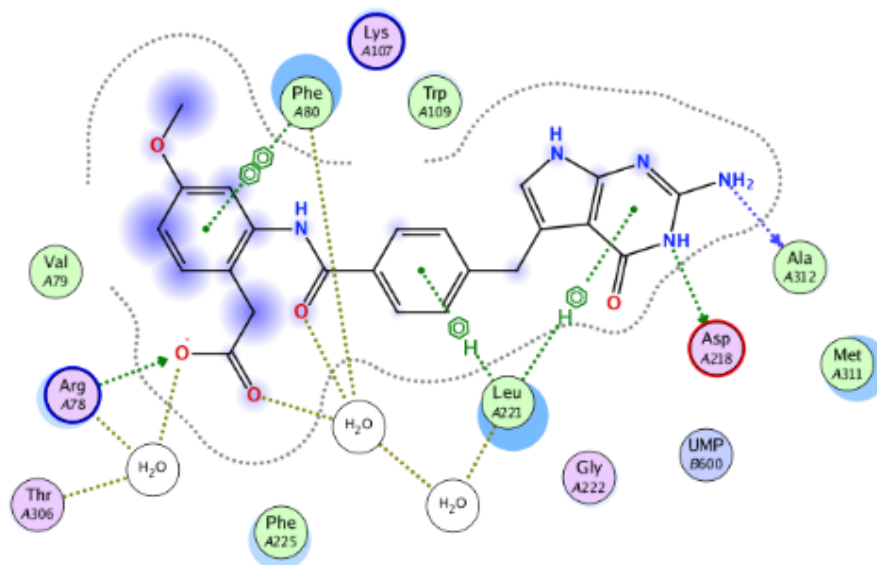


Figura 7.16. Estructura del ligando **OED** y las principales interacciones establecidas con los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la TS en el complejo **6PF5**, donde la línea sólida verde muestra las interacciones hidrofóbicas y la punteada las interacciones π - π y las interacciones π -cación.

En vista de los resultados de los parámetros experimentales obtenidos, de que ocupa todo el sitio activo de la proteína (figura 7.17), además de un valor de adecuado de IC_{50} de $0,8 \mu M$ (Czyzyk *et al.*, 2019), el ligando elegido como referencia es el ligando **OED**.

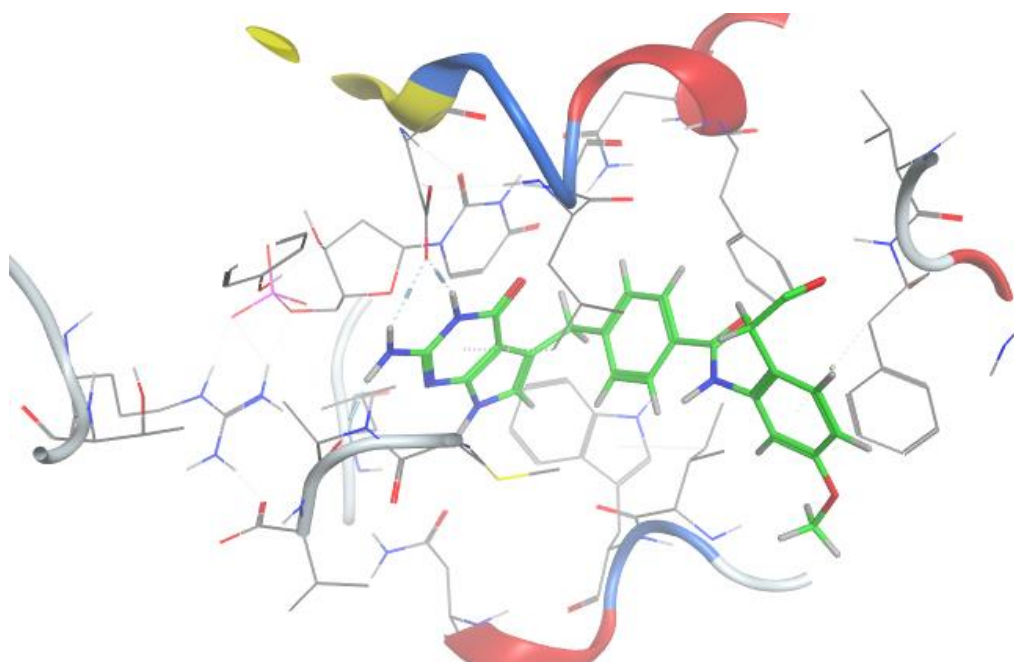


Figura 7.17. Posicionamiento del ligando **OED** en el sitio activo de la enzima TS.

7.2. Estudio *in-silico*. Modelización molecular (docking).

El objetivo de este estudio está basado en la búsqueda de moléculas que actúen como inhibidores de la TS con unos resultados computacionales de afinidad y energías de interacción similares o mejores a los que presenta el ligando de referencia **OED**. Para ello se lleva a cabo una simulación mediante docking molecular, el cual se utiliza en el diseño de fármacos con el fin de encontrar los mejores candidatos posibles.

Los parámetros que se van a evaluar en el proceso de docking son la afinidad (S) y las energías de interacción (Kcal/mol) de las moléculas propuestas con los principales residuos de aminoácidos esenciales en el sitio activo de la TS.

Para llevar a cabo la simulación es necesario definir una serie de condiciones como son el receptor o lugar a evaluar, los ligandos o moléculas a valorar, así como el método que se va a utilizar.

En cuanto al lugar donde se va a llevar a cabo el docking, se selecciona como receptor el sitio activo de la estructura cocrystalizada de rayos X de la proteína que contiene el ligando de referencia elegido. En este caso será la estructura con código PDB **6PF5**.

Como ligandos se elige la base de datos generada a partir de las moléculas propuestas (*mdb). Además, como método de colocación se ha usado un farmacóforo (Fig. 7.18) que se puede definir como una serie de características relacionadas con la configuración espacial y propiedades electrónicas de los átomos necesarias para asegurar ciertas interacciones del sitio activo con el ligando a estudiar. Esta condición consiste en incluir limitaciones al proceso de docking con el fin de forzar ciertas interacciones, en este caso, con los principales aminoácidos Ala³¹² y Asp²¹⁸ (Asp²¹⁸ es un residuo ácido que cataliza la protonación del N₅ del cofactor) (Finer-moore *et al.*, 2003). En este método se definen dos regiones H-dador en los átomos de la molécula, cerca de los residuos mencionados como se muestra en la figura 7.18.

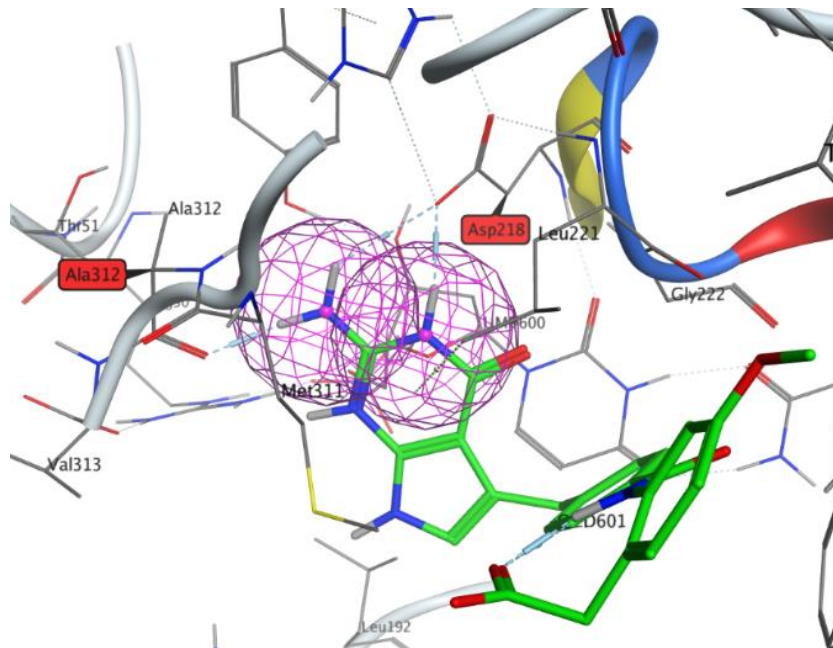


Figura 7.18. Farmacóforo utilizado. Interacciones con los principales aminoácidos Ala³¹² y Asp²¹⁸.

7.2.1 Estudio *in-silico* de las moléculas propuestas.

Con el fin de alcanzar el objetivo de encontrar nuevos inhibidores para la TS, se prepara una base de datos con un conjunto de 28 moléculas con estructuras ligeramente diferentes a aquellas que presentan los inhibidores descritos y tomando como referencia la estructura del ligando **OED**. Para ello, se ha planteado mantener el anillo de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina, a partir del cual se van a incorporar fragmentos con grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno que permitan generar interacciones con los residuos de aminoácidos del sitio activo.

La base de datos generada se puede dividir en dos grandes grupos con una característica común y es que ambos constan del mismo núcleo, en cambio, se diferencian en el tamaño y en los sustituyentes que presentan, así como en la posición en la que se encuentran. Estas diferencias permitirán a las moléculas interactuar de forma diferente con el sitio activo de la proteína, y de esa manera, mediante el estudio y comparación de los parámetros computacionales que presenten cada una de las estructuras, se podrá observar las características que son necesarias para que las moléculas sean potencialmente activas frente a la enzima TS.

El primer conjunto de moléculas propuestas (Fig 7.19), de tamaño menor al ligando de referencia, lo constituyen moléculas formadas por introducción de sustituyentes a ambos extremos del núcleo de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina.

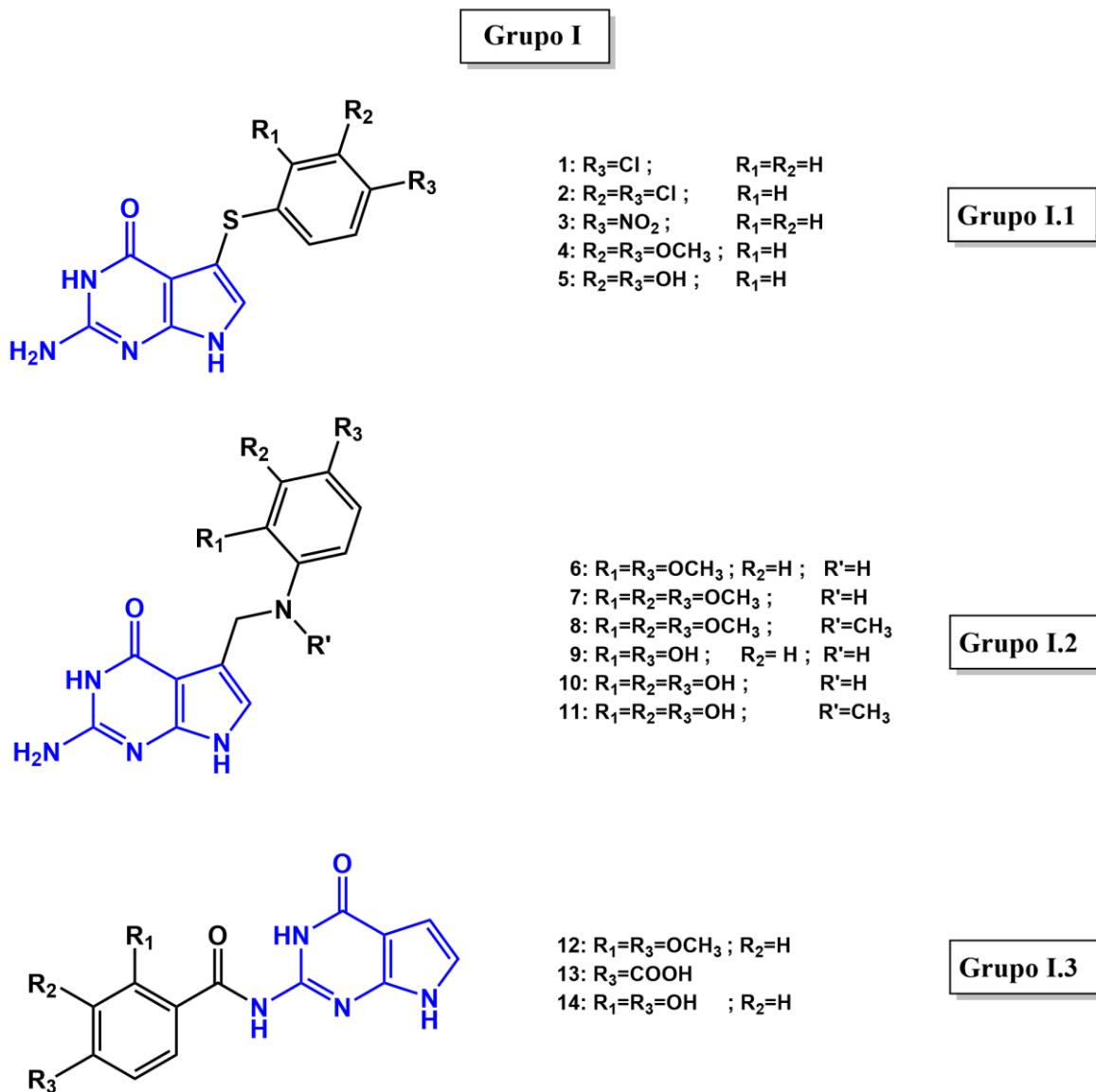


Figura 7.19. Estructuras propuestas grupo I. En azul se muestra la región conservada del ligando de referencia.

Con respecto a los valores de afinidad obtenidos tras el proceso de docking (Fig. 7.20) se aprecian unos resultados diferentes entre subgrupos, pero en todos los casos con unos valores por debajo de la afinidad obtenida para el ligando de referencia **OED**.

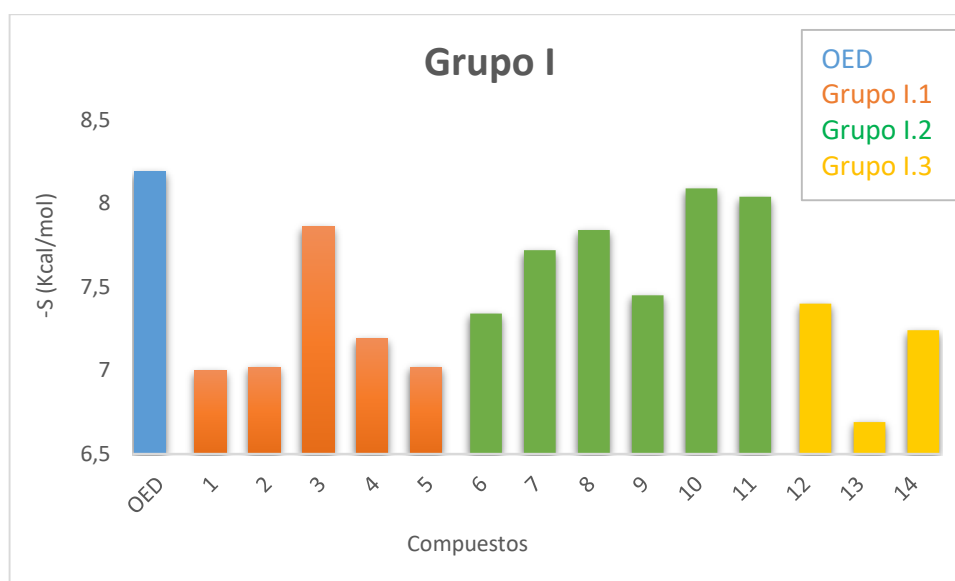


Figura 7.20. Valores de afinidad (S) obtenidos en el proceso de docking para el grupo I de moléculas con respecto al ligando **OED**.

A partir de los datos de afinidad representados en la figura 7.20 se puede observar que se obtienen valores similares para las moléculas que constituyen los grupos **I.1** (a excepción de la estructura **3**) y **I.3** y, a su vez, muy inferiores al ligando de referencia, mientras que los valores obtenidos para el conjunto de moléculas del grupo **I.2** se aproximan más a la afinidad del ligando **OED** aunque, como el resto, siempre inferiores. Aun así, cabe destacar que las estructuras que presentan una mejor afinidad son las moléculas trisustituidas (estructuras **10** y **11**).

Con respecto a las energías de interacción se obtienen resultados similares a aquellas obtenidas para el ligando de referencia en cuanto a fortaleza se refiere. Sin embargo, las diferencias radican en que no en todas las estructuras se establecen interacciones con los aminoácidos esenciales Ala³¹² y Asp²¹⁸ (Fig. 7.21) así como en otros compuestos se generan interacciones con residuos de aminoácidos del sitio activo distintos (Fig. 7.22).

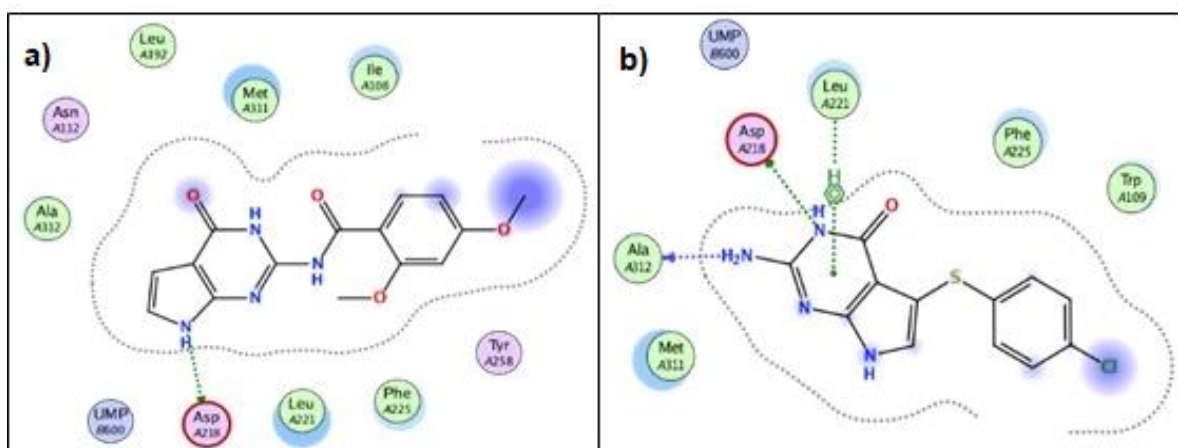


Figura 7.21. Interacciones de los compuestos **12** (a) y **1** (b) con distintos residuos de aminoácidos del sitio activo. La línea sólida verde muestra las interacciones hidrofóbicas y la punteada las interacciones π - π y las interacciones π -catión.

La figura 7.21 muestra que la presencia del grupo amino del anillo de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina resulta clave en la interacción con los aminoácidos esenciales, puesto que al alargar la molécula por este extremo (Fig. 7.21, a) no se produce interacción con el residuo de Ala³¹², mientras que en las estructuras donde queda el grupo amino libre (Fig. 7.21, b) sí se establece dicha interacción.

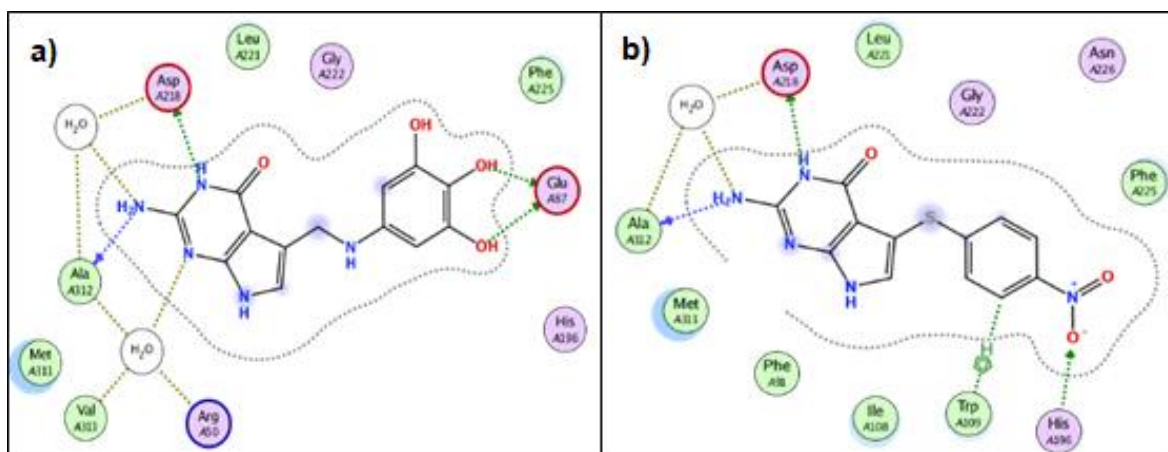


Figura 7.22. Interacciones de la estructura **10** (a) y **3** (b) con distintos residuos de aminoácidos del sitio activo. La línea sólida verde muestra las interacciones hidrofóbicas y la punteada las interacciones π - π y las interacciones π -catión.

La figura 7.22 a su vez, muestra que las nuevas interacciones con diferentes residuos de aminoácidos del sitio activo se establecen en la región de las moléculas donde se encuentran los sustituyentes introducidos.

En vista a lo analizado, se puede observar que el establecimiento de las interacciones esenciales depende de la presencia del grupo amino del núcleo de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina libre. Aun así, no es un factor determinante, ya que se presentan otras estructuras en las cuales, a pesar de tener el grupo amino libre, tampoco se establecen las interacciones con los dos aminoácidos esenciales (Fig. 7.23).

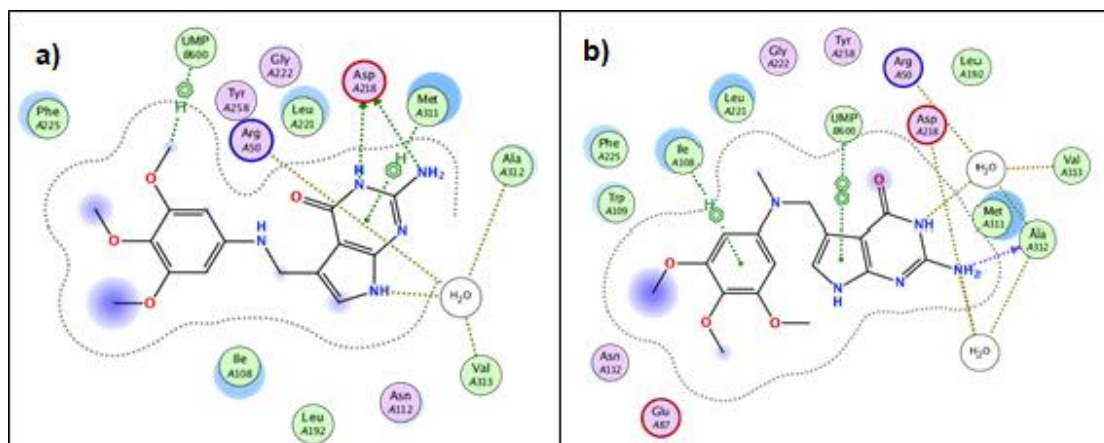


Figura 7.23. Interacciones de los compuestos **7** (a) y **8** (b) con los residuos de aminoácido del sitio activo. La línea sólida verde muestra las interacciones hidrofóbicas y la punteada las interacciones π - π y las interacciones π -catión.

La diferencia observada en las dos estructuras representadas en la figura 7.23 radica en la colocación de las moléculas en el sitio activo. En función de la colocación que adopte la molécula, los residuos de aminoácidos esenciales van a quedar más o menos próximos a los heteroátomos del núcleo de la estructura, lo cual va a ser determinante para que se establezca o no la unión entre ambos. Por tanto, la pose que adopte la molécula en el sitio activo será también un factor que afectará a las interacciones con los aminoácidos de Ala³¹² y Asp²¹⁸.

Sin embargo, las diferencias mostradas en cuanto a interacciones con aminoácidos del sitio activo distintos de los esenciales se relacionan con el tipo de sustituyente que presentan las moléculas (Fig. 7.24).

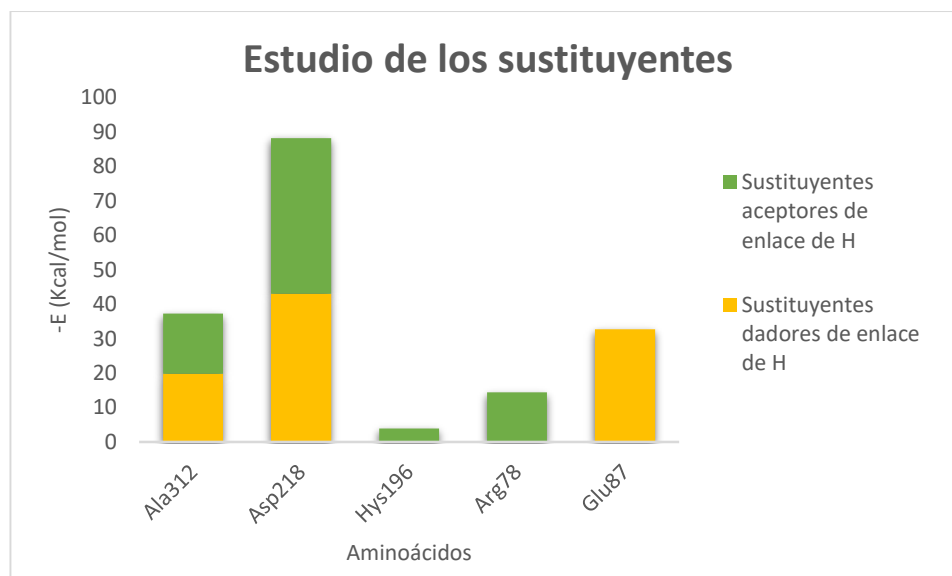


Figura 7.24. Energías de interacción (Kcal/mol) correspondientes a las estructuras 1-14 con los distintos residuos de aminoácidos en función del tipo de sustituyente, dador de enlace de hidrógeno, en naranja (-OH, -Cl) o aceptor de enlace de hidrógeno (-OCH₃, -NO₂, -COOH), en verde.

Se puede observar como los valores de las energías de interacción que se establecen con los aminoácidos esenciales se muestran invariables independientemente del sustituyente que presente cada estructura. Sin embargo, la aparición de una nueva interacción entre las moléculas y el aminoácido Glu⁸⁷ con una energía notable, se presentan en las estructuras con sustituyentes dadores de enlace de hidrógeno. Por el contrario, para las estructuras con sustituyentes metoxi (aceptor), aparecen nuevas interacciones con residuos distintos del sitio activo Hys¹⁹⁶ y Arg⁷⁸, pero de energías bastante menores.

A continuación, y con objeto de sustentar el análisis realizado hasta este punto, en la tabla 7.1 se muestran los resultados obtenidos en el proceso de docking de las moléculas del grupo I con respecto a aquellos obtenidos para el ligando de referencia **OED**. En ésta se presentan los valores de las energías de interacción de las interacciones más relevantes, así como los valores de afinidad obtenidos.

Tabla 7.1. Resultados del proceso de docking. Energías de interacción (Kcal/mol) y afinidad (Kcal/mol).

<i>Compuesto</i>	<i>Ala³¹²</i>	<i>Asp²¹⁸</i>	<i>Hys¹⁹⁶</i>	<i>Arg⁷⁸</i>	<i>Glu⁸⁷</i>	<i>Afinidad (S)</i>
<i>OED</i>	-4,6	-8,1		-14,5		-8,19
<i>1</i>	-4,3	-8,1				-7,00
<i>2</i>	-3,6	-7,7	-3,9			-7,02
<i>3</i>	-4,4	-8,2				-7,86
<i>4</i>	-4,6	-8,3				-7,19
<i>5</i>	-4,4	-7,8				-7,02
<i>6</i>	-3,9	-8,7				-7,34
<i>7</i>		-7,1				-7,72
<i>8</i>	-4,6					-7,84
<i>9</i>	-3,4				-13,2	-7,45
<i>10</i>	-4,1	-9,0			-3,8	-8,09
<i>11</i>		-3,1			-13,7	-8,04
<i>12</i>		-7,9				-7,40
<i>13</i>		-5,0		-14,4		-6,69
<i>14</i>		-7,3			-2,0	-7,24

Se comprueba que, con la presencia de grupos dadores de enlace de hidrógeno, como el grupo hidroxilo o halógenos como el Cl (estructuras **10** y **2** respectivamente), aparecen interacciones notables con aminoácidos como es el caso del residuo de Glu⁸⁷. Sin embargo, con sustituyentes aceptores de este tipo de enlace, se producen interacciones en menor medida y solo en caso de estructuras sustituidas por grupos nitro y ácido (estructuras **3** y **13** respectivamente) mientras que la sustitución con el sustituyente metoxi (estructuras **6-8**) no produce ninguna nueva interacción.

Con el objeto de estudiar el efecto de la sustitución y en base a lo analizado anteriormente, se han considerado aquellas moléculas con sustituyentes hidroxilo para su comparación (Fig. 7.25).

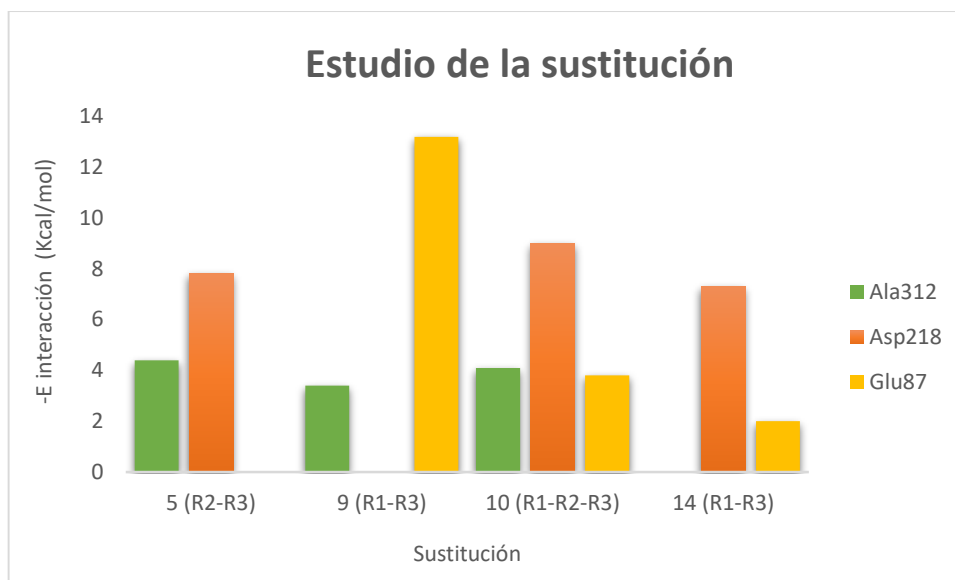


Figura 7.25. Energías de interacción (Kcal/mol) de las moléculas **5,9,10** y **14** respectivamente. La posición de los sustituyentes se indica entre paréntesis.

Con respecto a las estructuras disustituidas se puede observar la irregularidad de interacciones: en la estructura **5** se establecen interacciones con los aminoácidos de referencia, mientras que en las estructuras **9** y **14** sólo se producen interacciones con uno de éstos aminoácidos y con un residuo nuevo, Glu⁸⁷. Sin embargo, en el caso de la estructura trisustituida (**10**), se mantienen las interacciones con los aminoácidos de referencia y aparece un nuevo enlace dador con el residuo de Glu⁸⁷.

En el segundo conjunto de moléculas propuestas (Fig. 7.26) se presentan moléculas de un tamaño similar al ligando de referencia en las cuales se mantiene parte del esqueleto del ligando **OED**. La diferencia estructural radica en la introducción de fragmentos heterocíclicos como son el benzotiazol y benzoxazol.

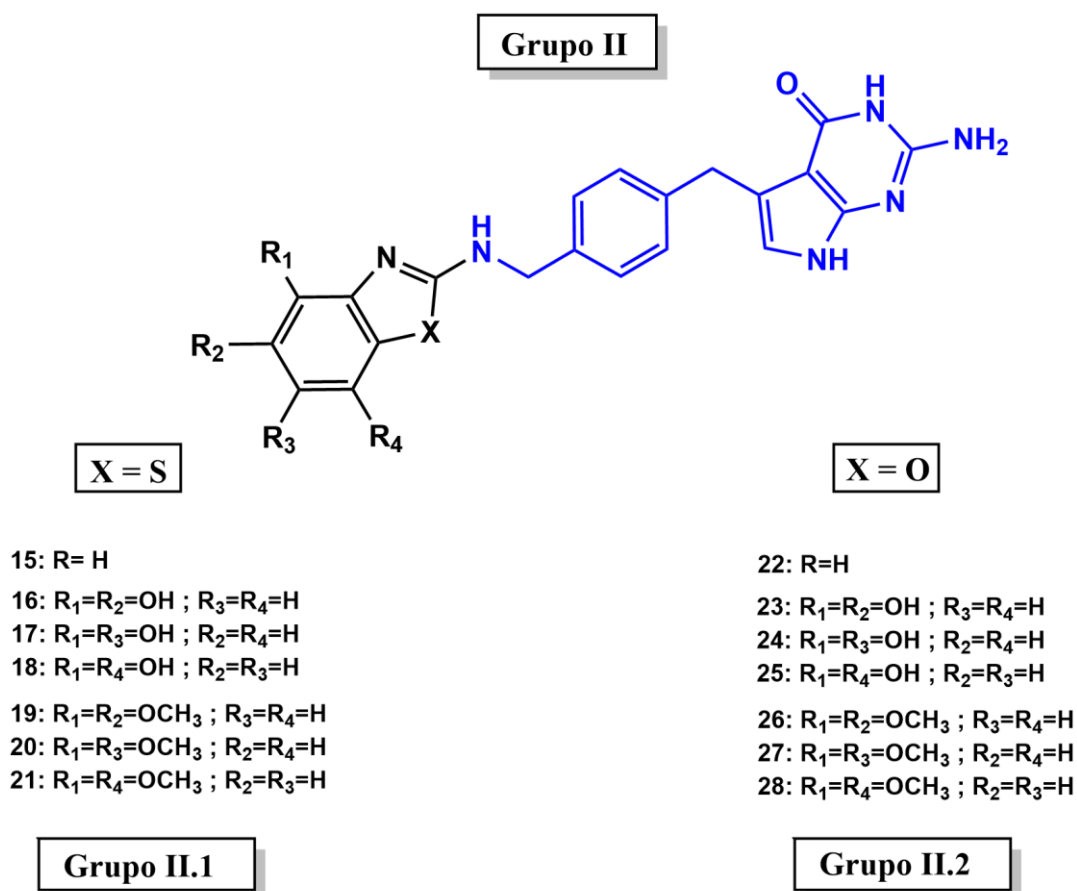


Figura 7.26. Estructuras propuestas grupo II. En azul se muestra la región conservada del ligando de referencia **OED**.

Con respecto a los valores de afinidad obtenidos tras el proceso de docking (Fig. 7.27) se aprecian unos resultados bastante superiores a los obtenidos para el anterior conjunto de moléculas analizadas (grupo I) y muy similares al valor de afinidad obtenido para el ligando de referencia **OED**, llegando incluso en la mayoría de los casos a superarlo.

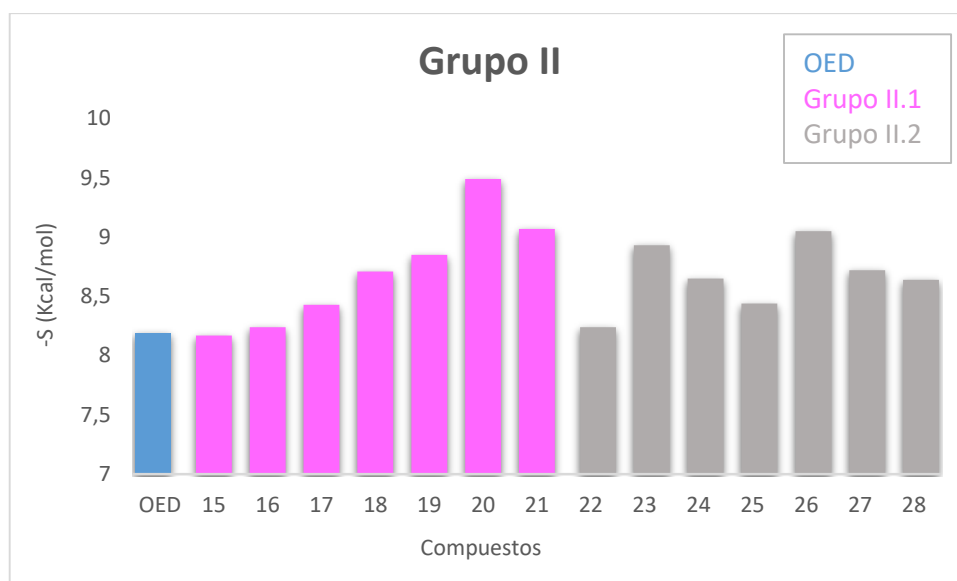


Figura 7.27. Valores de afinidad (S) obtenidos en el proceso de docking para el grupo **II** de moléculas con respecto al ligando **OED**.

A partir de los datos de afinidad representados en la figura 7.27 se puede observar que, mientras que las estructura sin sustituyentes (estructuras **15** y **22**) muestran unos valores de S similares a la obtenida para el ligando **OED**, las estructuras sustituidas alcanzan unos valores ligeramente mayores. Además, destaca que aquellas moléculas con valores bastante superiores con respecto al resto son aquellas disustituidas con grupos metoxi (estructuras **20**, **21** y **26**).

Se comprueba así la relación existente entre la afinidad y el tamaño de la molécula, obteniéndose unos resultados de S mucho mejores para las moléculas del grupo **II** (que se caracterizan por tener un mayor tamaño), que para las moléculas que forman el grupo **I** cuyo tamaño mucho menor. Además, las afinidades obtenidas para las estructuras sin sustituyentes del grupo **II** (**15** y **22**) y para el ligando **OED** son muy similares, como lo son también sus tamaños.

Esta diferencia de afinidades entre las moléculas de los distintos grupos se puede apreciar en la figura 7.28, donde se ponen a comparativa las estructuras que mejores datos de afinidad han presentado en el proceso de docking tanto del grupo **I** y **II**, así como la afinidad obtenida para el ligando **OED**.

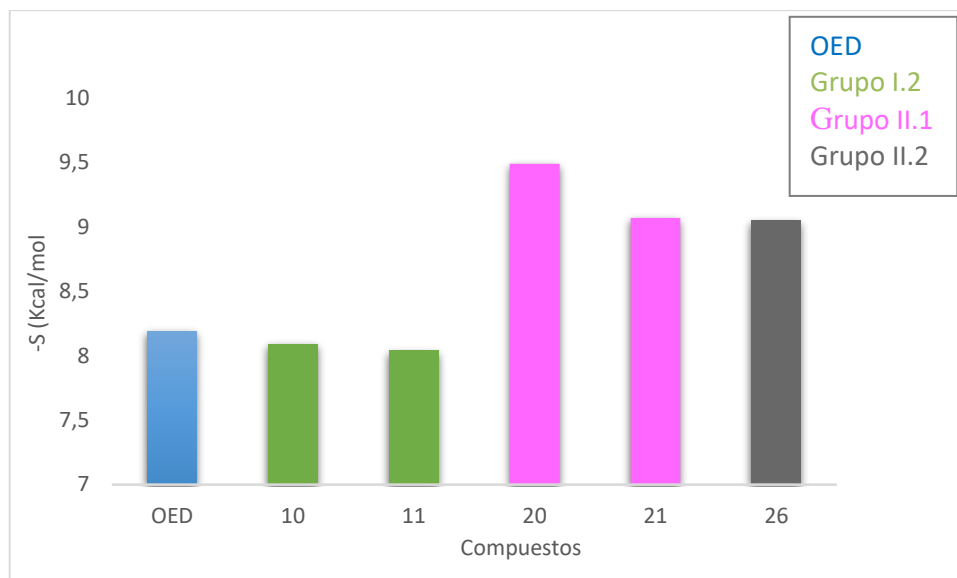


Figura 7.28. Comparativa de los valores de S de los compuestos de los grupos I y II que presentan unos mejores valores con respecto al ligando de referencia **OED**.

En cuanto a las energías de interacción se obtienen resultados similares a los valores obtenidos para el ligando de referencia, como es el caso de las estructuras sin sustituyentes (Fig. 7.29) en cuanto a fortaleza se refiere, llegando incluso a superarlos en las estructuras sustituidas.

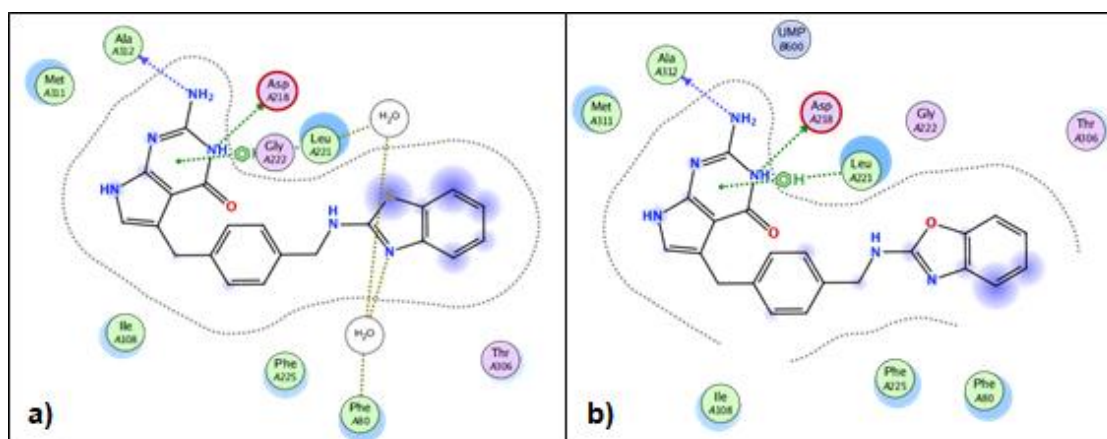


Figura 7.29. Interacciones de los compuestos **15** (a) y **22** (b) con los residuos de aminoácido del sitio activo, donde la línea sólida verde muestra las interacciones hidrofóbicas y la punteada las interacciones π - π y las interacciones π -catión.

Como se puede observar en la figura 7.29, las estructuras que presentan los heterociclos benzotiazol y benzoxazol sin sustituir no presentan diferencias entre ellas, y es que en estas estructuras se establecen las interacciones con los aminoácidos esenciales, pero no se generan ninguna otra interacción por el extremo en el que se encuentran de los nuevos sustituyentes heterociclicos.

Además, y a diferencia de las moléculas del grupo I, en este caso sí se establecen las interacciones esenciales entre los aminoácidos Ala³¹² y Asp²¹⁸ con todas las moléculas que forman este segundo grupo como se puede apreciar en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Resultados del proceso de docking. Energías de interacción con los aminoácidos más abundantes (Kcal/mol) y afinidad (Kcal/mol) de las moléculas **15-28** con respecto a los resultados obtenidos para el ligando de referencia **OED**.

<i>Compuesto</i>	<i>Ala³¹²</i>	<i>Asp²¹⁸</i>	<i>Ile³⁰⁷</i>	<i>Met³⁰⁹</i>	<i>Arg⁷⁸</i>	<i>Afinidad(S)</i>
<i>OED</i>	-4,6	-8,1			-14,5	-8,19
<i>15</i>	-4,4	-7,9				-8,17
<i>16</i>	-2,1	-3,4	-4,9	-6,7		-8,24
<i>17</i>	-4,4	-8,1				-8,43
<i>18</i>	-4,4	-8,1			-3,1	-8,71
<i>19</i>	-3,5	-3,4				-8,85
<i>20</i>	-4,4	-8,3				-9,49
<i>21</i>	-4,4	-8,1				-9,07
<i>22</i>	-4,4	-8,1				-8,24
<i>23</i>	-4,5	-7,8	-3,0			-8,93
<i>24</i>	-4,5	-7,5			-2,0	-8,65
<i>25</i>	-4,6	-8,4			-3,5	-8,44
<i>26</i>	-4,4	-7,9				-9,05
<i>27</i>	-4,3	-7,5			-2,1	-8,72
<i>28</i>	-4,4	-7,5				-8,64

Con el fin de generar nuevas interacciones entre las moléculas y los residuos de aminoácidos del sitio activo, se introducen en los heterociclos benzotiazol y benzoxazol sustituyentes dadores de enlaces de hidrógeno como es el caso del hidroxilo, así como aceptores como puede ser el sustituyente metoxi (estructuras **16-21** y **23-28**) (Fig. 7.30).

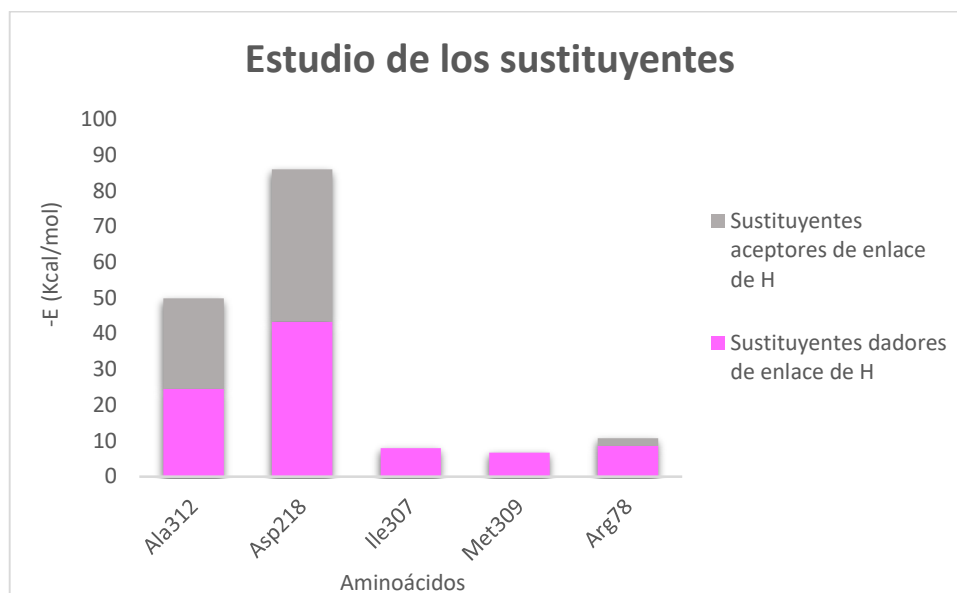


Figura 7.30. Energías de interacción (Kcal/mol) correspondientes a las estructuras **15-28** con los distintos residuos de aminoácidos en función del tipo de sustituyente, dador de enlace de hidrógeno en rosa (-OH) o aceptor de enlace de hidrógeno (-OCH₃), en gris.

Como se puede apreciar en la figura 7.30, con la introducción de diferentes sustituyentes las interacciones con los aminoácidos esenciales se siguen mostrando independientes. No obstante, se consigue la formación de interacciones con otros residuos de aminoácidos del sitio activo como son Ile³⁰⁷, Met³⁰⁹ y Arg⁷⁸.

Asimismo, al igual que ocurre con las moléculas del grupo **I**, las interacciones generadas se producen de manera más notable con los sustituyentes dadores de enlace de hidrógeno (rosa), en este caso con los grupos hidroxilo.

Con el objeto de estudiar el efecto de la sustitución y en base a lo analizado anteriormente, se han considerado aquellas moléculas con sustituyentes hidroxilo para su comparación (Fig. 7.31).

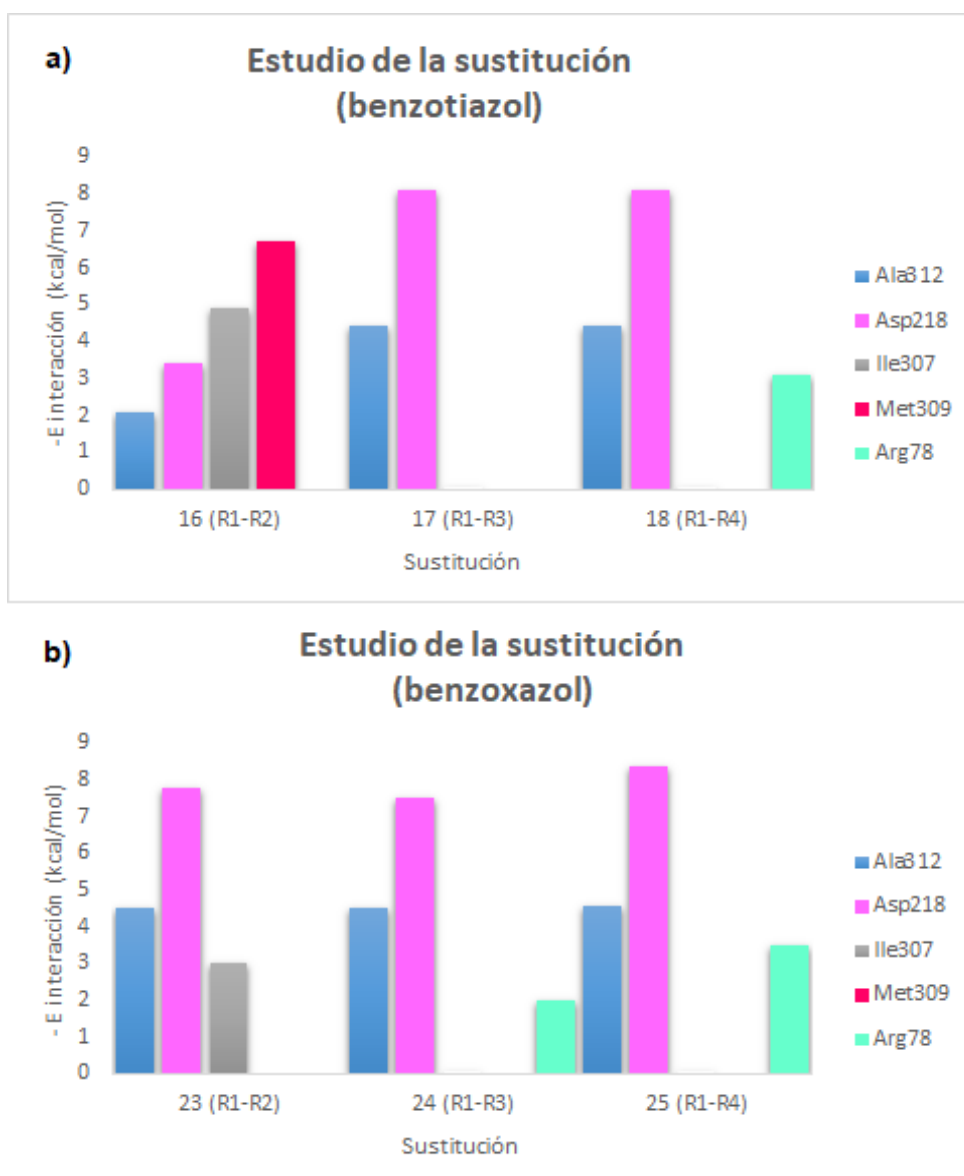


Figura 7.31. Energías de interacción (Kcal/mol) de las moléculas a) 16,17,18 y b) 23,24,25. La posición de los sustituyentes en cada estructura se indica entre paréntesis.

Mediante el análisis de la figura 7.31 se puede ver que, en el caso de las estructuras disustituidas en R₁ y R₂ para las estructuras de benzotiazol, se muestra la aparición de interacciones con aminoácidos diferentes como son Ile³⁰⁷ y Met³⁰⁹. Sin embargo, se produce una disminución de la energía en cuanto a las interacciones con los aminoácidos esenciales. Para las estructuras disustituidas en R₁ y R₂ de benzoxazol el efecto es similar y es que aparecen interacciones con el aminoácido Ile³⁰⁷, aunque con los aminoácidos esenciales la energía se mantiene elevada.

En las moléculas disustituidas en R₁ y R₃, aunque el valor de la energía interacción con los aminoácidos esenciales no disminuye, no aparecen nuevas interacciones para ambos casos.

En cuanto a las estructuras disustituidas en R₁ y R₄, y de manera similar para los dos subgrupos, se aprecia la aparición de una nueva interacción con el aminoácido Arg⁷⁸ (aminoácido que también establece un enlace dador de H con el ligando de referencia) y con un valor considerable. Además de esta nueva interacción, la energía con los aminoácidos esenciales se mantiene invariable.

En definitiva, se puede considerar que las moléculas **18** y **25** que son aquellas que presentan sustituyentes dadores de enlace de hidrógeno en las posiciones 4 y 7 de los anillos heterociclos de benzotiazol y benzoxazol son favorables (Fig. 7.32) ya que, además de presentar unos valores de afinidad y de energías de interacción con los aminoácidos esenciales bastante elevados, aparece una nueva interacción entre los sustituyentes en esta posición y el residuo de aminoácido Arg⁷⁸.

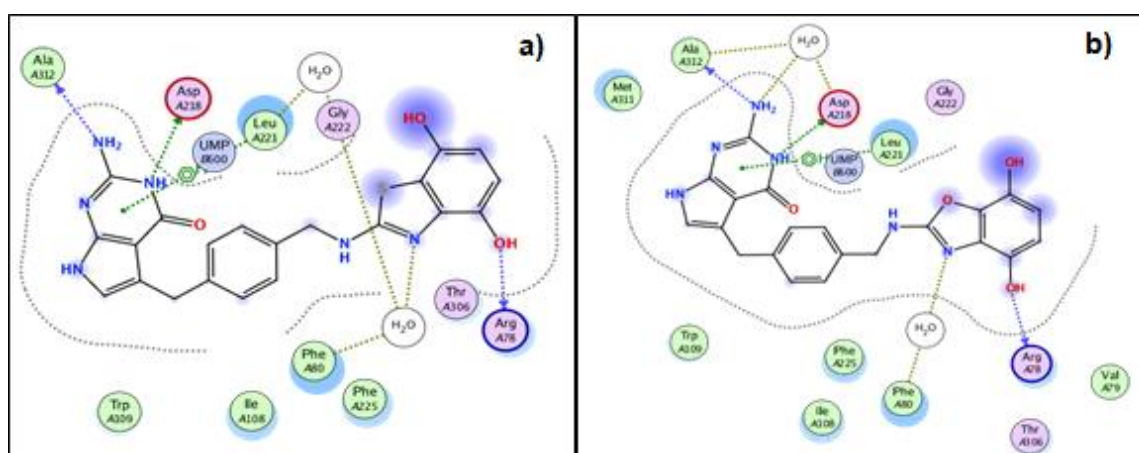


Figura 7.32. Interacciones de los compuestos **18** (a) y **25** (b) con los residuos de aminoácido del sitio activo, donde la línea sólida verde muestra las interacciones hidrofóbicas y la punteada las interacciones π - π y las interacciones π -catión.

En base a los resultados obtenidos para los dos grupos de moléculas propuestas, se han considerado las moléculas más favorables de ambos grupos, en cuanto a valores computacionales se refiere, para la comparación de sus poses (Fig. 7.33).

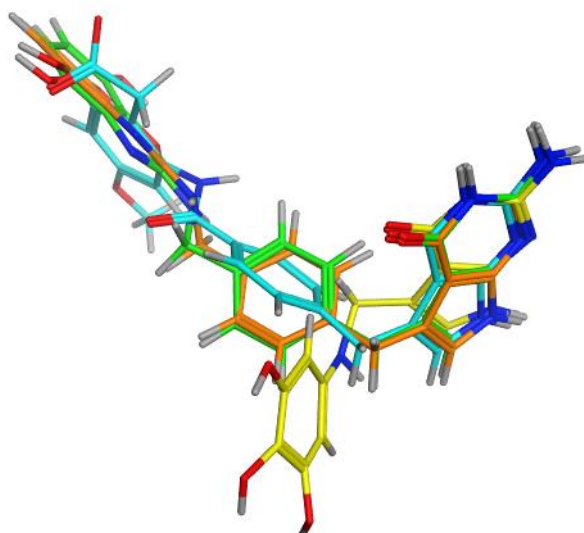


Figura 7.33. Superposición de las poses de las moléculas propuestas más favorables con respecto al ligando de referencia **OED** (celeste). En amarillo se representa la estructura **10** (grupo I), la estructura **18** en naranja y la estructura **25** en verde (grupo II).

En la figura 7.33 se puede observar como aparecen completamente superpuestos los núcleos de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina de cada molécula. Este hecho resulta coherente ya que es la zona en la cual tienen lugar las interacciones con los aminoácidos esenciales Ala³¹² y Asp²¹⁸ que se producen tanto con el ligando de referencia como con cada una de las estructuras representadas y que, además, ha sido la restricción impuesta por el farmacóforo.

El resto de los esqueletos de las moléculas aparecen aparentemente superpuestos excepto en el caso de la molécula **10**, que será consecuencia de las interacciones que se producen con diferentes residuos de aminoácidos que se encuentran en distintas zonas del sitio activo. Por un lado, las moléculas del grupo II (estructuras **18** y **25**) establecen interacciones con el residuo de aminoácido del sitio activo Arg⁷⁸, al igual que ocurre con el ligando de referencia. Sin embargo, la nueva interacción que se produce en la molécula **10** es con un residuo distinto, el aminoácido Glu⁸⁷.

En definitiva, el objetivo principal basado en la búsqueda de moléculas que actuaran como inhibidores de la TS con unos resultados computacionales de afinidad y energías de interacción similares o mejores a los que presenta el ligando de referencia **OED**, no se ha conseguido para el primer conjunto de moléculas

propuestas (grupo I). Todas las estructuras han presentado unos valores de afinidad bastante inferiores al valor de -8,19 Kcal/mol que presenta el ligado **OED**, como consecuencia de su menor tamaño. Del mismo modo, los resultados de energías de interacción tampoco han resultado mejorados para la mayoría de las moléculas pertenecientes a este primer grupo.

Sin embargo, para las moléculas que forman el grupo II sí se ha llegado a alcanzar el objetivo. La introducción de las estructuras de benzotiazol y benzoxazol ha incrementado notablemente la afinidad, aunque no se han presentado diferencias en cuanto a las energías de interacción. No obstante, la introducción de sustituyentes dadores de enlace de hidrógeno ha permitido la aparición de interacciones nuevas con residuos de aminoácidos diferentes del sitio activo y con unos valores, en algunos casos, superiores.

8. CONCLUSIONES.

En esta revisión se ha llevado a cabo una modelización molecular de 28 estructuras propuestas como posibles inhibidores de la enzima timidilato sintasa, en base al estudio previo de inhibidores descritos. El estudio *in-silico* se ha realizado mediante docking a través del programa informático MOE.2019, por el cual se han obtenido las siguientes conclusiones:

- La presencia del grupo amino del núcleo de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina sin sustituir resulta clave para que se produzca la interacción de éste con el residuo Ala³¹² (aminoácido esencial) del sitio activo de la proteína.
- El tamaño de las moléculas influye al parámetro de afinidad (S), mejorando éste con el aumento del tamaño de las estructuras. La mejor opción es la introducción de los fragmentos heterocíclicos de benzotiazol y benzoxazol.
- El tipo de sustituyente introducido influye tanto en el número como en la fortaleza de las interacciones que se establecen entre las diferentes moléculas y los aminoácidos. Los grupos dadores de enlace de hidrógeno son favorables frente a los aceptores, ya que contribuyen a la formación de enlaces covalentes con distintos residuos de aminoácidos del sitio activo.
- La posición de los sustituyentes influye en la generación de enlaces de hidrógeno y por tanto en el parámetro de energía de interacción. La posición más favorable de sustitución es la ocupación de las posiciones 4 y 7 del anillo de benzotiazol y/o benzoxazol.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- ALMONG, R., WADDLING, C. A., MALEY, F., MALEY, G. F., y VAN ROEY, P. (2001): "Crystal structure of a deletion mutant of human thymidylate synthase Δ (7-29) and its ternary complex with Tomudex and dUMP", *Protein Science*, 10(5), pp. 988–996.
- ANDERSON, A. C., PERRY, K. M., FREYMAN, D. M., y STROUD, R. M. (2000): "The crystal structure of thymidylate synthase from *Pneumocystis carinii* reveals a fungal insert important for drug design", *Journal of Molecular Biology*, 297(3), pp. 645–657.
- ASSARAF, Y. G., LEAMON, C. P., y REDDY, J. A. (2014): "The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment", *Drug Resistance Updates*, 17(4–6), pp. 89–95.
- AVEDAÑO, C., y MENÉNDEZ, J. C. (2008): "Antimetabolites", en *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier, pp. 10-51.
- AVENDAÑO, C., y MENÉNDEZ, J. C. (2008): "Introduction", en *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier, pp. 1–8.
- BERGER, S. H., BERGER, F. G., y LEBIODA, L. (2004): "Effects of ligand binding and conformational switching on intracellular stability of human thymidylate synthase", *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1696(1), pp. 15–22.
- CASAS FERNÁNDEZ DE TEJERINA ANA M^o, CORRAL JAIME JESÚS, y PÉREZ VALDERRAMA BEGOÑA. (2002): "Agentes antineoplásicos": Dosis, indicaciones y efectos secundarios, en *Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)* (Vol. 1), pp. 27–57.
- COSTI, M., FERRARI, S., VENTURELLI, A., CALO, S., TONDI, D., y BARLOCCO, D. (2005): "Thymidylate Synthase Structure, Function and Implication in Drug

Discovery”, *Current Medicinal Chemistry*, 12(19), pp. 2241–2258.

CZYZYK, D. J., VALHONDO, M., DEIANA, L., TIRADO-RIVES, J., JORGENSEN, W. L., y ANDERSON, K. S. (2019): “Structure activity relationship towards design of cryptosporidium specific thymidylate synthase inhibitors”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, pp. 111673.

DAHER, G. C., HARRIS, B. E., y DIASIO, R. B. (1990): “Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides”, *Pharmacology and Therapeutics*, 48(2), pp. 189–222.

FELDER, T., DUNLAP, R. B., DIX, D., y SPENCER, T. (2002): “Differences in natural ligand and fluoropyrimidine binding to human thymidylate synthase identified by transient-state spectroscopic and continuous variation methods”, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1597(1), pp. 149–156.

FERRARI, S., SEVERI, L., POZZI, C., QUOTADAMO, A., PONTERINI, G., LOSI, L., MARVERTI, G., & COSTI, M. P. (2018): “Human Thymidylate Synthase Inhibitors Halting Ovarian Cancer Growth”, en *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 107), Elsevier Inc, pp. 473–513.

FINER-MOORE, J. S., SANTI, D. V, y STROUD, R. M. (2003): “Lessons and Conclusions from Dissecting the Mechanism of a Bisubstrate Enzyme”, pp. 248–256.

GANGJEE, A., VIDWANS, A., ELZEIN, E., MCGUIRE, J. J., QUEENER, S. F., y KISLIUK, R. L. (2001): “Synthesis, antifolate, and antitumor activities of classical and nonclassical 2-amino-4-oxo-5-substituted-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), pp. 1993–2003.

GONEN, N., y ASSARAF, Y. G. (2012): “Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance”, *Drug Resistance Updates*, 15(4), pp. 183–210.

- JACKMAN, A. L., FORSTER, M., y NG, M. (2008): "Targeting thymidylate synthase by antifolate drugs for the treatment of cancer", en *Cancer Drug Design and Discovery*, Elsevier Inc, pp. 198–226.
- KHAIRULLINA, V. R., GIMADIEVA, A. R., GERCHIKOV, A. Y., MUSTAFIN, A. G., y ZARUDII, F. S. (2018): "Quantitative structure–activity relationship of the thymidylate synthase inhibitors of *Mus musculus* in the series of quinazolin-4-one and quinazolin-4-imine derivatives", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 85, pp. 198–211.
- KUMAR, V. P., FREY, K. M., WANG, Y., JAIN, H. K., GANGJEE, A., y ANDERSON, K. S. (2013): "Substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as *Cryptosporidium hominis* thymidylate synthase inhibitors", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(19), pp. 5426–5428.
- LATOSIŃSKA, J. N., y LATOSIŃSKA, M. (2013): "Anticancer Drug Discovery — From Serendipity to Rational Design", en *Drug Discovery*, InTech, pp. 35-74
- MCGUIRE, J. (2005): "Anticancer Antifolates, Current Status and Future Directions", *Current Pharmaceutical Design*, 9(31), pp. 2593–2613.
- SHPIGUN, L. K., y ANDRYUKHINA, E. Y. (2019): "A new electrochemical sensor for direct detection of purine antimetabolites and DNA degradation", *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, pp.1-8.
- TONG, X., ZHAO, F., y THOMPSON, C. B. (2009): "The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells", *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(1), pp. 32–37.
- WU, J. C., y SANTI, D. V. (1987): "Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase", *Journal of Biological Chemistry*, 262(10), pp. 4778–4786.