



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas – Programa de Doctorado en Ciencias con mención en
Química

**Diseño de nano-transportadores de fármacos dirigidos
hacia la proteína E-selectina para su potencial utilización
en tratamientos contra el cáncer.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en
Química

Pabla Andrea Barra Oliva
Concepción-Chile
2016

Profesor Guía: Joel Bernabé Alderete Triviños
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

A mi madre, que ha sido un apoyo incondicional siempre.



Agradecimientos

Con las próximas líneas quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas e instituciones que con su colaboración han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Verónica Jiménez por su incondicional ayuda y consejo y al Dr. Joel Alderete por haber aceptado dirigir esta tesis. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por hacer más amena cada jornada de trabajo. A mi amiga Karen por su grata compañía. A los profesores Pedro Fernandes, José Gavín y Antonio Daranas por su hospitalidad y amabilidad al momento de realizar las estancias de investigación. A CONICYT, MECESUP, Dirección de postgrado de la Universidad de Concepción y REDOC por el apoyo económico brindado durante la realización de la tesis doctoral.

También, quiero agradecer a mis padres y hermano por apoyarme y acompañarme durante este periodo, especialmente a mi madre Patricia Oliva, ya que gracias a sus oraciones y palabras de apoyo he podido lograr todas mis metas. Finalmente quiero agradecer a mi esposo Diego Rivas por su apoyo y comprensión a lo largo de esta etapa.

Tabla de contenido

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTOS | II |
| TABLA DE CONTENIDO | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS | V |
| ÍNDICE DE TABLAS | IX |
| LISTA DE ACRÓNIMOS | XI |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1 CÁNCER | 4 |
| 1.2 NANO-TRANSPORTADORES DIRIGIDOS DE FÁRMACOS | 5 |
| 1.3 E-SELECTINA COMO BLANCO PARA TERAPIA ANTI-CÁNCER | 9 |
| CAPÍTULO 2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN | 12 |
| 2.2 HIPÓTESIS | 14 |
| 2.3 OBJETIVO GENERAL | 14 |
| 2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA | 15 |
| 3.1 SCREENING VIRTUAL | 16 |
| 3.1.1 PREPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA E-SELECTINA | 18 |
| 3.1.2 BÚSQUEDA DE COMPUESTOS MEDIANTE SCREENING VIRTUAL | 19 |
| 3.2 SIMULACIONES DE DM | 21 |
| 3.3 CÁLCULOS DE ENERGÍA LIBRE | 22 |
| 3.3.1 METODOLOGÍA PARA EL CÁLCULO DE ENERGÍA LIBRE E-SELECTINA-LIGANDO | 25 |
| 3.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA | 27 |
| 3.5 DIFERENCIA DE TRANSFERENCIA DE SATURACIÓN POR RMN (STD-RMN) | 29 |
| 3.5.1 ESTUDIOS DE STD-RMN | 31 |
| 3.6 ANÁLISIS ESTRUCTURAL CUANTITATIVO PARA COMPLEJOS PROTEÍNA-LIGANDO. TEORÍA CORCEMA-ST | 32 |
| 3.6.1 CORCEMA-ST | 34 |
| 3.7 SÍNTESIS DEL NANO-TRANSPORTADOR DIRIGIDO | 34 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 3.8 | ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR..... | 36 |
| 3.8.1 | EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD CELULAR <i>IN VITRO</i> | 38 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 40 |
| 4.1 | SCREENING VIRTUAL..... | 41 |
| 4.2 | CÁLCULOS DE ENERGÍA LIBRE E-SELECTINA-LIGANDO | 45 |
| 4.2.1 | DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD E-SELECTINA-OLIGOSACÁRIDO MEDIANTE TI, BAR, MBAR, MM/PBSA Y MM/GBSA. | 45 |
| 4.2.2 | CÁLCULOS DE ENERGÍA DE INTERACCIÓN MEDIANTE MM/PBSA Y MMGBSA | 54 |
| 4.3 | DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE K_D E-SELECTINA-LIGANDO..... | 57 |
| 4.4 | CÁLCULOS DE STD-RMN..... | 61 |
| 4.5 | CÁLCULOS TEÓRICOS STD-RMN MEDIANTE CORCEMA-ST | 63 |
| 4.6 | ESTUDIO DE ASOCIACIÓN E-SELECTINA-LIGANDO MEDIANTE DM..... | 65 |
| 4.7 | SÍNTESIS NANO-TRANSPORTADOR DIRIGIDO HACIA E-SELECTINA | 73 |
| 4.8 | EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD CELULAR <i>IN VITRO</i> | 76 |
| CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES | | 79 |
| 5.1 | CONCLUSIONES | 80 |
| 5.2 | PROYECCIONES | 83 |
| CAPÍTULO 6. REFERENCIAS | | 84 |
| CAPÍTULO 7. ANEXOS..... | | 92 |
| 7.1 | PERFILES DE ENERGÍA EN CÁLCULOS DE ENERGÍA LIBRE (TI) E-SELECTINA-OLIGOSACÁRIDO | 93 |
| 7.2 | RMSDs PARA LOS SISTEMAS E-SELECTINA-LIGANDO RESPECTO A LA ESTRUCTURA PROMEDIO PARA UN TIEMPO TOTAL DE 20 NS DE SIMULACIÓN..... | 102 |

Índice de figuras

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 1. EJEMPLOS DE NANO-TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER. | 6 |
| FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DEL DENDRÍMERO PAMAM DE CUARTA GENERACIÓN (G4)..... | 7 |
| FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS PRINCIPALES INTERACCIONES DEL COMPLEJO E- SELECTIN- sLe^x (IZQUIERDA). ESTRUCTURA 2D DEL TETRASACÁRIDO DE LEWIS (sLe^x) (DERECHA). | 10 |
| FIGURA 4. CICLO TERMODINÁMICO EMPLEADO PARA CALCULAR LA ENERGÍA LIBRE RELATIVA PROTEÍNA-LIGANDO. LAS FLECHAS VERTICALES MUESTRAN LA TRANSFORMACIÓN ALQUÍMICA ENTRE LOS DIFERENTES LIGANDOS (A Y B) LIBRES EN DISOLUCIÓN (ΔG_3) Y ENLAZADOS A LA PROTEÍNA (ΔG_4). LAS FLECHAS HORIZONTALES INDICAN LA ENERGÍA LIBRE PARA LOS COMPLEJOS RECEPTOR-LIGANDO; A (ΔG_1) Y B (ΔG_2). | 23 |
| FIGURA 5. ESQUEMA GENERAL DE LOS PRIMEROS NIVELES DE ENERGÍA DE UNA MOLÉCULA ORGÁNICA. SE MUESTRA LA TRANSICIÓN ELECTRÓNICA INDUCIDA POR ABSORCIÓN DE UN FOTÓN Y POSTERIOR EMISIÓN FLUORESCENTE. | 28 |
| FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL EXPERIMENTO 1D STD-RMN EN UNA MUESTRA CONTENIENDO PROTEÍNA EN PRESENCIA DE UN EXCESO DE MOLÉCULAS. SE MUESTRA EL EXPERIMENTO DE REFERENCIA (I_0) Y EL EXPERIMENTO DONDE SE SATURAN SELECTIVAMENTE LOS PROTONES DE LA PROTEÍNA (I_{SAT}). EN EL ESPECTRO DE DIFERENCIA (I_{STD}) SE OBSERVAN SÓLO LOS HIDRÓGENOS DEL LIGANDO QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA, YA QUE RECIBEN PARTE DE LA SATURACIÓN POR NOE-INTERMOLECULAR. | 30 |
| FIGURA 7. MODELO CINÉTICO DE DOS ESTADOS SOBRE EL QUE SE BASA LA FORMULACIÓN DE LA TEORÍA DE CORCEMA-ST PARA LA PREDICCIÓN TEÓRICA DE DATOS DE STD..... | 32 |
| FIGURA 8. ESQUEMA DE LA SÍNTESIS DEL NANO-TRANSPORTADOR DIRIGIDO PAMAM(G4)-PEG(50%)-LIG-1.... | 35 |
| FIGURA 9. REPRESENTACIÓN DEL SISTEMA DE DIÁLISIS EMPLEADO PARA PURIFICAR EL NANO- TRANSPORTADOR PAMAM(G4)-PEG(50%)-LIG-1. | 36 |
| FIGURA 10. REDUCCIÓN DE LA Sonda RESAZURINA (AB) DE COLOR AZUL NO FLUORESCENTE A RESORUFINA; ALTAMENTE FLUORESCENTE DE COLOR ROSA. | 37 |
| FIGURA 11. REPRESENTACIÓN DEL ENSAYO DE AB EN UNA PLACA DE 96 POCILLOS. (I) 100 μ L DE MEDIO HEC, (II) 90 μ L DE MEZCLA AB-1/2 (MEDIO HEC MÁS AB) Y 10 μ L DPBS, (III) 90 μ L DE MEZCLA AB-1/2 Y 10 μ L TRITÓN (0.1%), (IV) 90 μ L DE MEZCLA AB-1/2 Y 10 μ L NANO-TRANSPORTADOR (1 μ M), (V) 90 μ L DE MEZCLA AB-1/2 Y 10 μ L NANO-TRANSPORTADOR (10 μ M), (VI) 90 μ L DE MEZCLA AB-1/2 Y 10 μ L NANO-TRANSPORTADOR (50 μ M), (VII) 90 μ L DE MEZCLA AB-1/2 Y 10 μ L NANO-TRANSPORTADOR (100 μ M), (VIII) 90 μ L DE MEZCLA AB-1/2 Y 10 μ L NANO-TRANSPORTADOR (200 μ M), (IX) 80 μ L DE MEZCLA AB-1/2 Y 20 μ L PAMAM-G4 (200 μ M). | 39 |
| FIGURA 12. ESTRUCTURAS DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE sLe^x CONSIDERADOS PARA REALIZAR LOS CÁLCULOS DE ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN RELATIVA E-SELECTINA-LIGANDO. EL OLIGOSACÁRIDO 1 ES EL COMPUESTO DE REFERENCIA, EL LIGANDO FISIOLÓGICO DE LA PROTEÍNA E-SELECTINA (sLe^x). EL OLIGOSACÁRIDO 2 FUE OBTENIDO MEDIANTE EL REMPLAZO DEL GRUPO GLCNAC POR EL GRUPO CICLOHEXANO-1,2-DIOL. EL OLIGOSACÁRIDO 3 FUE OBTENIDO MEDIANTE EL REMPLAZO DEL GRUPO GLCNAC POR EL GRUPO 3-METILCICLOHEXANO-1,2-DIOL. EL OLIGOSACÁRIDO 4 CONTIENE EL GRUPO ÁCIDO LÁCTICO (S)-CICLOHEXIL EN REMPLAZO DEL GRUPO NEU5AC. LOS OLIGOSACÁRIDOS 5 Y 6 PRESENTAN LAS MISMAS SUSTITUCIONES QUE LOS | |

| | |
|---|----|
| OLIGOSACÁRIDOS 2 Y 3 PERO CONTENIENDO ADEMÁS EL GRUPO ÁCIDO LÁCTICO (S)-CICLOHEXIL EN REMPLAZO DEL GRUPO NEU5AC..... | 46 |
| FIGURA 13. PERFILES DE ENERGÍA FORMADOS POR $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE LAMBDA (λ) PARA LA TRANSMUTACIÓN 1 \rightarrow 2 CONSIDERANDO EL OLIGOSACÁRIDO LIBRE EN SOLUCIÓN ACUOSA (A) Y ASOCIADO A LA PROTEÍNA (B) PARA EL CAMINO DIRECTO E INVERSO. CADA PROCESO DE TRANSMUTACIÓN HA SIDO DIVIDIDO EN TRES ETAPAS (VER SECCIÓN 4.4); EN ΔG^I LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REMOVIDAS, EN ΔG^{II} LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REEMPLAZADOS A CERO Y LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CREADOS, Y FINALMENTE EN ΔG^{III} LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CONSIDERADOS EN EL CÁLCULO..... | 48 |
| FIGURA 14. CORRELACIÓN ENTRE LAS ENERGÍAS LIBRES DE UNIÓN RELATIVAS ($\Delta \Delta G_{UNIÓN}$) EXPERIMENTALES Y OBTENIDAS MEDIANTE LOS MÉTODOS TI, BAR Y MBAR EN $KCAL\ MOL^{-1}$, PARA LOS COMPLEJOS E-SELECTINA-OLIGOSACÁRIDO ESTUDIADOS. LA CORRELACIÓN SE REALIZÓ EMPLEANDO NUEVE VALORES $\Delta \Delta G_{UNIÓN}$, TAL COMO SE DESCRIBEN EN LA TABLA 3..... | 51 |
| FIGURA 15. RMSDs PARA LOS COMPLEJOS E-SELECTINA-OLIGOSACÁRIDO DESDE EL COMPLEJO 1 (SLe ^x) AL 6 RESPECTIVAMENTE. RMSDs FUE OBTENIDO CONSIDERANDO EL ESQUELETO PROTEÍCO Y LOS ÁTOMOS PESADOS DE CADA OLIGOSACÁRIDO..... | 52 |
| FIGURA 16. CORRELACIÓN ENTRE LAS ENERGÍAS LIBRES DE UNIÓN RELATIVAS ($\Delta \Delta G_{UNIÓN}$) EXPERIMENTALES Y OBTENIDAS MEDIANTE LOS MÉTODOS MM/GBSA Y MM/PBSA EN $KCAL\ MOL^{-1}$, PARA LOS COMPLEJOS E-SELECTINA-OLIGOSACÁRIDO ESTUDIADOS. LA CORRELACIÓN SE REALIZÓ EMPLEANDO NUEVE VALORES $\Delta \Delta G_{UNIÓN}$, TAL COMO SE DESCRIBEN EN LA TABLA 3..... | 54 |
| FIGURA 17. ENERGÍA DE UNIÓN ($\Delta G_{UNIÓN}$) PROTEÍNA-LIGANDO PARA LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DESDE SCREENING VIRTUAL..... | 58 |
| FIGURA 18. DETERMINACIÓN DE K_D PARA LA ASOCIACIÓN E-SELECTINA-LIGANDO MEDIANTE LA MEDICIÓN DEL “QUENCHING” DE FLUORESCENCIA DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS A PH 7.4. [E-SELECTIN] = 1.6 mM; [COMPUESTO-1] = 0 - 3 mM; [COMPUESTO-2] = 0 - 1.5 mM; [COMPUESTO-3] = 0 - 3 mM; [COMPUESTO-4] = 0 - 2.5 mM..... | 59 |
| FIGURA 19. ESPECTRO STD-RMN PARA EL COMPUESTO 1 CON LA PROTEÍNA E-SELECTINA: (A) ESPECTRO RMN ¹ H DE REFERENCIA DEL COMPUESTO 1 CON LA PROTEÍNA E-SELECTINA Y (B) ESPECTRO STD-RMN DE LA SOLUCIÓN DEL COMPUESTO 1 (3.2 mM) CON LA PROTEÍNA E-SELECTINA (50 μ M) A UN TIEMPO DE SATURACIÓN DE 2.0 s..... | 62 |
| FIGURA 20. GRÁFICA STD-AF VERSUS EL TIEMPO DE SATURACIÓN (0.5s - 4.9s) PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE SATURACIÓN RELATIVO DE LOS HIDRÓGENOS H _A , H _B Y H _F DEL COMPUESTO 1. LOS EXPERIMENTOS SE REALIZARON CONSIDERANDO UN EXCESO DE LIGANDO CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE 762:1..... | 63 |
| FIGURA 21. GRÁFICA STD-AF VERSUS EL TIEMPO DE SATURACIÓN (0.5s - 4.9s) TEÓRICA PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE SATURACIÓN RELATIVO DE LOS DEL COMPUESTO 1..... | 64 |
| FIGURA 22. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DEL COMPLEJO E-SELECTINA-SLe ^x EXTRAÍDA DESDE LA DM..... | 65 |
| FIGURA 23. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DEL COMPLEJO E-SELECTINA-COMPUESTO 1 EXTRAÍDA DESDE LA DM..... | 67 |
| FIGURA 24. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DEL COMPLEJO E-SELECTINA-COMPUESTO 2 EXTRAÍDA DESDE LA DM..... | 69 |

| | |
|--|------------|
| FIGURA 25. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DEL COMPLEJO E-SELECTINA-COMPUESTO 3 EXTRAÍDA DESDE LA DM. | 71 |
| FIGURA 26. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DEL COMPLEJO E-SELECTINA-COMPUESTO 4 EXTRAÍDA DESDE LA DM. | 72 |
| FIGURA 27. ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UNA RAMA DEL NANO-TRANSPORTADOR PAMAM(G4)-PEG(48%)- COMPUESTO_1. | 73 |
| FIGURA 28. ESPECTRO RMN ¹ H EN D ₂ O PARA EL NANO-TRANSPORTADOR PAMAM(G4)-PEG(48%)- COMPUESTO_1, CON LA ASIGNACIÓN DE LOS HIDRÓGENOS CARACTERÍSTICOS DEL SISTEMA. | 74 |
| FIGURA 29. PORCENTAJES DE VIABILIDAD CELULAR PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NANO- TRANSPORTADOR PAMAM(G4)-PEG(48%)-COMPUESTO_1 SOBRE CÉLULAS HEK. (C+) CONTROL POSITIVO; (C-) CONTROL NEGATIVO, Y DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NANO-TRANSPORTADOR (1 μM – 200 μM). | 78 |
| FIGURA 30. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 1 → 2 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. | 93 |
| FIGURA 31. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 1 → 3 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. | 94 |
| FIGURA 32. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 2 → 3 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. | 95 |
| FIGURA 33. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 4 → 5 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. | 96 |
| FIGURA 34. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 4 → 6 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. | 97 |
| FIGURA 35. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 5 → 6 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. | 98 |
| FIGURA 36. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 1 → 4 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. EN ESTE CASO SE UTILIZARON ÁTOMOS “DUMMY” DEBIDO A QUE NO HABÍA DIRECTA RELACIÓN EN EL NÚMERO DE ÁTOMOS PARA EL PAR DE OLIGOSACÁRIDOS ESTUDIADOS EN LA TRANSMUTACIÓN. EL PROCESO DE TRANSMUTACIÓN FUE DIVIDIDO EN CUATRO SUB-ETAPAS; EN ΔG^I LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REMOVIDAS, EN ΔG^{II} LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REEMPLAZADOS A CERO, ΔG^{III} LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CREADOS, Y FINALMENTE, ΔG^{IV} LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CONSIDERADOS EN EL CÁLCULO. | 99 |
| FIGURA 37. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 1 → 5 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. EN ESTE CASO SE UTILIZARON ÁTOMOS “DUMMY” DEBIDO A QUE NO HABÍA DIRECTA RELACIÓN EN EL NÚMERO DE ÁTOMOS PARA EL PAR DE OLIGOSACÁRIDOS ESTUDIADOS EN LA TRANSMUTACIÓN. EL PROCESO DE TRANSMUTACIÓN FUE DIVIDIDO EN CUATRO SUB-ETAPAS; EN ΔG^I LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REMOVIDAS, EN ΔG^{II} LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REEMPLAZADOS A CERO, ΔG^{III} LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CREADOS, Y FINALMENTE, ΔG^{IV} LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CONSIDERADOS EN EL CÁLCULO. | 100 |

FIGURA 38. $\partial V/\partial \lambda$ (KCAL/MOL) EN FUNCIÓN DE λ CALCULADO PARA LA TRANSMUTACIÓN EN DIRECCIÓN DIRECTA E INVERSA ENTRE LOS OLIGOSACÁRIDOS 1 \rightarrow 6 EN (A) SOLUCIÓN ACUOSA Y (B) ENLAZADO A LA PROTEÍNA. EN ESTE CASO SE UTILIZARON ÁTOMOS “DUMMY” DEBIDO A QUE NO HABÍA DIRECTA RELACIÓN EN EL NÚMERO DE ÁTOMOS PARA EL PAR DE OLIGOSACÁRIDOS ESTUDIADOS EN LA TRANSMUTACIÓN. EL PROCESO DE TRANSMUTACIÓN FUE DIVIDIDO EN CUATRO SUB-ETAPAS; EN ΔG^I LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REMOVIDAS, EN ΔG^{II} LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE DESAPARECEN SON REEMPLAZADOS A CERO, ΔG^{III} LOS POTENCIALES DE VAN DER WAALS Y RADIOS ATÓMICOS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CREADOS, Y FINALMENTE, ΔG^{IV} LAS CARGAS PARCIALES ATÓMICAS DE LOS ÁTOMOS QUE APARECEN SON CONSIDERADOS EN EL CÁLCULO..... **101**



Índice de tablas

| | |
|--|-----------|
| TABLA 1. HERRAMIENTAS COMUNES PARA REALIZAR SCREENING VIRTUAL..... | 17 |
| TABLA 2. COMPUESTOS SELECCIONADOS DESDE SCREENING VIRTUAL. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS DE $\Delta G_{\text{UNIÓN}}$ OBTENIDOS POR LOS SOFTWARES AUTODOCK-VINA, AUTODOCK4 Y LA FUNCIÓN XSCORE EN KCALMOL^{-1} | 42 |
| TABLA 3. VALORES DE ENERGÍA LIBRE RELATIVA ($\Delta\Delta G_{\text{UNIÓN}}$) OBTENIDOS PARA EL ESTUDIO DE NUEVE TRANSMUTACIONES E-SELECTINA-OLIGOSACÁRIDO MEDIANTE LAS METODOLOGÍAS TI, BAR Y MBAR. LOS VALORES DE DESVIACIÓN ESTÁNDAR SE ENCUENTRAN REPORTADOS JUNTO A LOS VALORES CALCULADOS CORRESPONDIENTES A CADA MÉTODO. LOS VALORES DE ENERGÍA LIBRE EXPERIMENTALES FUERON OBTENIDOS DESDE MEDIDAS DE ITC REALIZADAS POR LA INVESTIGACIÓN DE ERNST Y COLABORADORES ⁶⁸ . LOS ERRORES ABSOLUTOS REPORTADOS SON LA DIFERENCIA ENTRE LOS VALORES DE ENERGÍA LIBRE RELATIVA EXPERIMENTAL Y LOS CALCULADOS. EL ERROR DE LOS VALORES EXPERIMENTALES ES ALREDEDOR DE 0.2 KCAL/MOL . EN LA TABLA, TODOS LOS VALORES SON REPORTADOS EN KCAL/MOL | 50 |
| TABLA 4. VALORES DE ENERGÍA LIBRE RELATIVA ($\Delta\Delta G$) PARA LAS NUEVE TRANSMUTACIONES E-SELECTINA-OLIGOSACÁRIDO OBTENIDAS POR MM/PBSA Y MM/GBSA EN KCALMOL^{-1} . LOS VALORES DE ENERGÍA LIBRE EXPERIMENTALES FUERON OBTENIDOS DESDE MEDIDAS DE ITC REALIZADAS POR LA INVESTIGACIÓN DE ERNST Y COLABORADORES ⁶⁸ . LOS ERRORES ABSOLUTOS REPORTADOS SON LA DIFERENCIA ENTRE LOS VALORES DE ENERGÍA LIBRE RELATIVA EXPERIMENTAL Y LOS CALCULADOS. EL ERROR DE LOS VALORES EXPERIMENTALES ES ALREDEDOR DE 0.2 KCAL/MOL . EN LA TABLA, TODOS LOS VALORES SON REPORTADOS EN KCAL/MOL | 53 |
| TABLA 5. ENERGÍAS LIBRES DE UNIÓN E-SELECTINA-LIGANDO OBTENIDAS DESDE SIMULACIONES DE DM MEDIANTE LOS MÉTODOS MM/PBSA Y MM/GBSA (KCAL MOL^{-1}). LAS DESVIACIONES ESTÁNDAR SON REPORTADAS JUNTO A LOS VALORES CORRESPONDIENTES A CADA MÉTODO. EL VALOR EXPERIMENTAL PARA LA ASOCIACIÓN E-SELECTINA-LIGANDO FUE OBTENIDO DESDE EXPERIMENTOS DE ITC REALIZADOS POR ERNST Y COLABORADORES..... | 56 |
| TABLA 6. ENERGÍAS LIBRES DE UNIÓN (KCAL MOL^{-1}) Y CONSTANTE DE DISOCIACIÓN (μM) E-SELECTINA-LIGANDO EXPERIMENTAL, OBTENIDA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA..... | 60 |
| TABLA 7. PERMANENCIA DE ENLACES DE HIDRÓGENO (%) ENTRE E-SELECTINA Y sLe^x A LO LARGO DE LA SIMULACIÓN DE DM Y DISTANCIA DE ENLACE PROMEDIO. VALORES EXTRAÍDOS DESDE LOS ÚLTIMOS 10 NS DE LA TRAYECTORIA DE DM..... | 66 |
| TABLA 8. PERMANENCIA DE ENLACES DE HIDRÓGENO (%) ENTRE E-SELECTINA Y COMPUESTO 1 A LO LARGO DE LA SIMULACIÓN DE DM Y DISTANCIA DE ENLACE PROMEDIO. VALORES EXTRAÍDOS DESDE LOS ÚLTIMOS 10 NS DE LA TRAYECTORIA DE DM..... | 68 |
| TABLA 9. PERMANENCIA DE ENLACES DE HIDRÓGENO (%) ENTRE E-SELECTINA Y COMPUESTO 2 A LO LARGO DE LA SIMULACIÓN DE DM Y DISTANCIA DE ENLACE PROMEDIO. VALORES EXTRAÍDOS DESDE LOS ÚLTIMOS 10 NS DE LA TRAYECTORIA DE DM..... | 69 |
| TABLA 10. PERMANENCIA DE ENLACES DE HIDRÓGENO (%) ENTRE E-SELECTINA Y COMPUESTO 3 A LO LARGO DE LA SIMULACIÓN DE DM Y DISTANCIA DE ENLACE PROMEDIO. VALORES EXTRAÍDOS DESDE LOS ÚLTIMOS 10 NS DE LA TRAYECTORIA DE DM..... | 71 |
| TABLA 11. PERMANENCIA DE ENLACES DE HIDRÓGENO (%) ENTRE E-SELECTINA Y COMPUESTO 4 A LO LARGO DE LA SIMULACIÓN DE DM Y DISTANCIA DE ENLACE PROMEDIO. VALORES EXTRAÍDOS DESDE LOS ÚLTIMOS 10 NS DE LA TRAYECTORIA DE DM..... | 72 |

TABLA 12. ASIGNACIÓN DE LAS SEÑALES OBTENIDAS EN EL ESPECTRO DE RMN ^1H PARA EL NANO-TRANSPORTADOR PAMAM(G4)-PEG(48%)-COMPUESTO_1..... **76**



Lista de acrónimos

| | |
|-----------------|---|
| DM | Dinámica molecular |
| MM/PBSA | Molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area |
| MM/GBSA | Molecular mechanics generalized-Born surface area |
| STD | Diferencia de transferencia de saturación |
| STD-AF | Factor de amplificación en la diferencia de transferencia de saturación |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| TI | Integración termodinámica |
| BAR | Bennett acceptance ratio |
| MBAR | Multi Bennett acceptance ratio |
| PAMAM-G4 | Poliamidoamina de cuarta generación |
| PEG | Poli(etilenglicol) |
| ACE | Acetilados |
| PDB | Base de datos de proteínas |
| CPU | Unidad central de procesamiento |
| NOE | Nuclear overhauser effect |
| SASA | Área superficial accesible al solvente |
| LCPO | Linear combinations of pairwise overlaps |

Resumen

En la actualidad, los aportes de la nano-tecnología han hecho posible el desarrollo de nuevos sistemas de detección y tratamiento para diversas enfermedades con mayor eficacia y especificidad. En particular, el desarrollo de nano-transportadores selectivos para el transporte y la liberación dirigida de fármacos, apunta a mejorar diversas limitaciones que presentan los tratamientos antineoplásicos convencionales, tales como; solubilidad, índice terapéutico y principalmente la limitada especificidad de los fármacos utilizados. Para dirigir de forma más selectiva los nano-transportadores al tejido tumoral se han buscado distintos receptores que se expresen preferentemente en la superficie de células tumorales. E-selectina, por ejemplo, es una proteína de adhesión molecular que se expresa en el endotelio vascular activado y cumple un rol importante en procesos inflamatorios y de metástasis celular, convirtiéndose en un blanco molecular de gran interés terapéutico.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue: diseñar, sintetizar y evaluar la citotoxicidad celular de un nuevo nano-transportador de fármacos dirigido hacia la proteína E-selectina. Para lograr este objetivo, se utilizó la técnica de Virtual Screening para realizar una exhaustiva búsqueda empleando una librería de más de quince millones de compuestos, lo cual permitió seleccionar diez compuestos con gran afinidad por la proteína. Además, con el fin de estudiar el modo de unión de los ligandos seleccionados en el sitio activo de la proteína y obtener las energías de interacción, se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular (DM). La afinidad experimental de los ligandos por la E-selectina fue obtenida mediante Espectroscopia de Fluorescencia, con valores de K_d que oscilan desde 333 μM a 1 mM. Ensayos de Diferencia de Transferencia de Saturación y análisis de CORCEMA-ST, fueron realizados para corroborar el modelo de asociación del ligando seleccionado con la proteína E-selectina obtenido desde DM. Finalmente, el nano-transportador dirigido fue sintetizado, mediante la conjugación superficial del dendrímero PAMAM de cuarta generación con poli(etilenglicol) y el ligando que presentó la mayor afinidad por la proteína. Los análisis biológicos dieron cuenta de que el nano-transportador dirigido no presenta citotoxicidad hacia las células HEK en el rango de concentraciones estudiada. En conclusión, los promisorios resultados expuestos en esta Tesis Doctoral pueden ser empleados como punto de partida en el diseño de nuevos y poderosos transportadores dirigidos de fármacos.

Abstract

Currently, nanotechnology contributions have made possible the development of new detection and treatment systems to various diseases with high efficacy and specificity. In particular, the development of selective nanocarriers to transport and targeted drug delivery, aims to improve diverse limitations that show the conventional antineoplastic treatments such as; solubility, therapeutic index and mainly limited specificity of drugs used. To selectively target the nanocarriers toward tumour tissue different receptors that are preferentially overexpressed on the surface tumour cells have been searched. E-selectin, is a molecular adhesion protein that is expressed on activate vascular endothelium and plays an important role in inflammatory process and cellular metastasis, becoming a target of high therapeutic interest.

The main objective of this PhD Thesis was to design, to synthetize and evaluate the cellular toxicity of a new drugs nanocarrier targeted to the E-selectin protein. To achieve this goal, an exhaustive search using Virtual Screening technique was performed to select ten compounds with high affinity for the protein. In order to study the binding mode of the ligands selected in the active site of protein and to identify the main amino acid residues that determine the protein-ligand association, molecular dynamics simulations (MD) followed by theoretical calculations were performed to obtain the energies of protein-ligand interaction. Experimental affinities of ligands to the E-selectin protein were obtained by Fluorescence Spectroscopy studies, K_d values ranging from 333 μM to 1 mM. Afterwards, Saturation Transfer Difference and CORCEMA-ST analysis were performed to corroborate the protein-ligand association model obtained by DM. Finally, the targeted nanocarrier was synthesized by superficial conjugation using PAMAM dendrimer of fourth generation with poly(ethylene glycol) and nine molecules of ligand with more affinity by the protein. Bioassays showed that the targeted nanocarrier does not exhibit cytotoxicity to HEK cells for all range of studied concentrations. In summary, here are presented promising results that can be used as a starting point to the design of new and powerful targeted nanocarriers for drug delivery therapy.

Capítulo 1. Introducción



1.1 Cáncer

El cáncer es una de las patologías más severas y de mayor afectación sobre la salud de las personas tanto a nivel fisiológico como psicológico. Este año, la sociedad americana del cáncer estima que sólo en Estados Unidos 1.7 millones de nuevos casos serán diagnosticados y ocurrirán más de 595.690 fallecimientos¹. En nuestro país, el cáncer representa la segunda causa de muerte tras las enfermedades del sistema circulatorio, alcanzando un 23,6% dentro de todas las causas de muerte de la población². Actualmente, el cáncer es considerado como un desorden de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos, se nutren del organismo y alteran su fisiología. Además, estas células pueden migrar e invadir tejidos lejanos, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando una metástasis, que en muchas ocasiones es la causa de muerte de los individuos afectados³.

Durante los últimos años, se ha logrado aumentar las tasas de supervivencia observada en los registros de cáncer gracias a diversas propuestas de intervención terapéutica como; cirugía, radioterapia y quimioterapia; siendo esta última uno de los métodos más utilizados a nivel mundial⁴. La quimioterapia consiste en la administración directa de fármacos antineoplásicos y citotóxicos para destruir células cancerígenas, sin embargo, este tratamiento presenta enormes limitaciones que lo hacen altamente nocivo e invasivo para el paciente, tales como; la baja solubilidad y la incorrecta bio-distribución del fármaco, que conllevan a la administración de altas dosificaciones del mismo para lograr el efecto deseado. Además, la nula selectividad de estos fármacos por un blanco terapéutico hace que no discriminen entre células sanas y células dañadas provocando diversos efectos secundarios en los pacientes. Es por este motivo que diversas disciplinas de las ciencias centran sus esfuerzos en desarrollar nuevas estrategias para la administración de fármacos que subsanen las deficiencias que presentan los tratamientos convencionales.

1.2 Nano-transportadores dirigidos de fármacos

La nano-tecnología es una poderosa herramienta que actualmente está revolucionando el diagnóstico y la terapia de diversas enfermedades como el cáncer. Durante las últimas décadas, esta disciplina ha presentado un crecimiento exponencial, contribuyendo en el desarrollo de nuevos materiales nano-métricos para su empleo en tratamientos selectivos y menos invasivos que mejoren la sobrevivencia y calidad de vida de los pacientes⁵.

Actualmente, los nano-materiales para el transporte y la liberación controlada de fármacos han sido una de las propuestas de intervención terapéutica con mayor relevancia para el diagnóstico y tratamiento del cáncer⁵. Estos nano-transportadores (1-100nm de diámetro) buscan maximizar la eficacia de ciertos fármacos que presentan citotoxicidad en el organismo durante el tratamiento, ya que permiten aumentar su solubilidad, protegerlos de una degradación prematura, aumentar su absorción celular, facilitando su difusión a través del epitelio, modificar su farmacocinética y su perfil de distribución en los tejidos. Distintos tipos de nano-transportadores han sido aprobados para uso clínico⁶. Sin embargo, hasta la fecha, son muy pocos los nano-transportadores capaces de dirigir los fármacos a blancos celulares específicos, es así que la especificidad de estos sistemas es aún una limitación importante⁵.

Tal como se muestra en el Figura 1, existen diversas clases de nano-transportadores de fármacos tales como; polímeros conjugados, nano-partículas poliméricas, transportadores basados en lípidos como liposomas y micelas, nanotubos de carbono, nano-partículas de oro incluyendo nanoshells y nanocages y finalmente, dendrímeros. Estos últimos, han despertado gran interés debido a sus versátiles propiedades. Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas sintéticas formados por una molécula central de cuál emergen ramas en forma radial hacia la superficie, originando una estructura tridimensional de capas concéntricas. El número de veces que se produce esta ramificación se conoce como generación del dendrímero y las zonas de las cuales estas ramificaciones emergen se conocen como nodos. Las propiedades de estos sistemas están determinadas por su generación y la naturaleza de sus grupos funcionales internos y superficiales. Los dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) (Figura 2) han demostrado promisorias aplicaciones biomédicas debido a que pueden ser

fácilmente conjugados con diferentes moléculas como; agentes de contraste y drogas, también tienen una gran solubilidad en agua y una estructura química muy bien definida, son biocompatibles y se eliminan rápidamente de la sangre a través de los riñones, gracias a su pequeño tamaño (<5 nm)⁷.

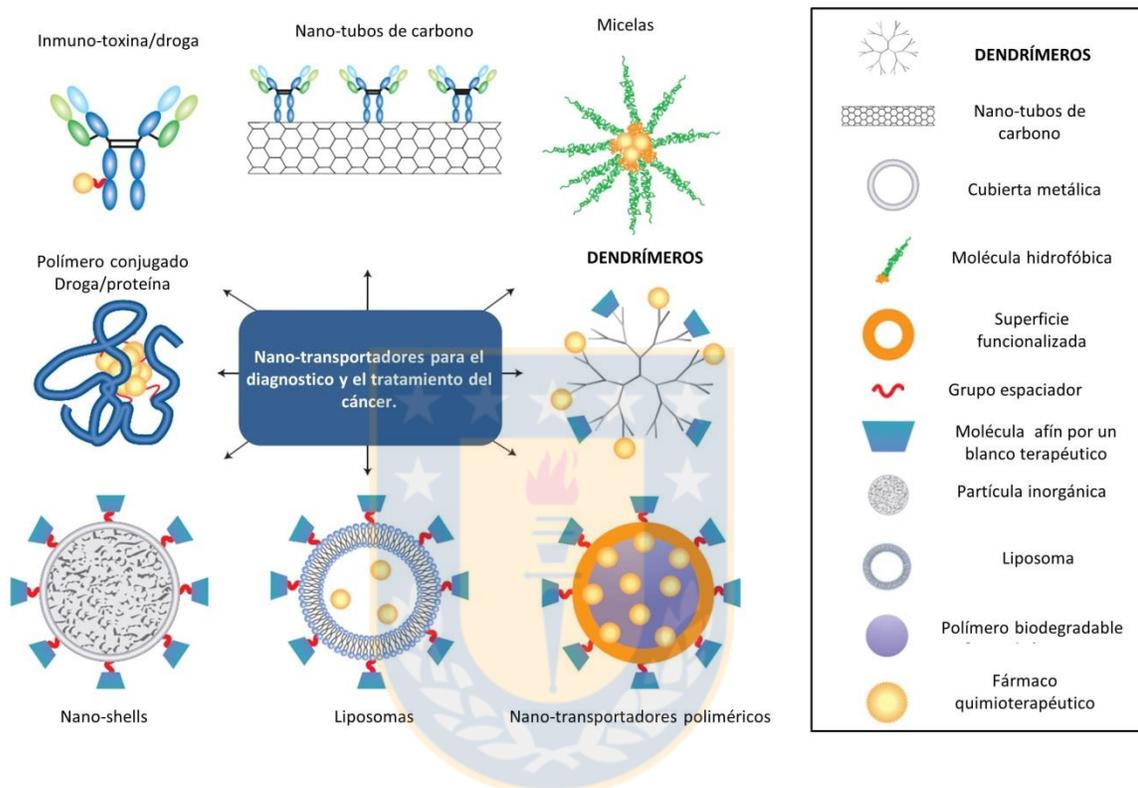


Figura 1. Ejemplos de nano-transportadores de fármacos utilizados para el tratamiento y diagnóstico del cáncer⁵.

Debido a las versátiles propiedades que poseen los dendrímeros PAMAM, diversos estudios se han centrado en estudiar y caracterizar la asociación PAMAM-fármaco bajo dos aproximaciones. En la primera, las moléculas de fármaco son unidas a la superficie de los dendrímeros a través de enlaces lábiles susceptibles al pH del medio. En cambio, la segunda se ha enfocado en estudiar la encapsulación de fármacos en el interior de los dendrímeros PAMAM mediante la formación de interacciones supramoleculares. Ambas estrategias estudiadas presentan ventajas y desventajas, sin embargo la supremacía de una sobre la otra aún no ha sido establecida. En relación a los complejos supramoleculares, existen diversos

estudios de asociación entre dendrímeros PAMAM y diversos fármacos tales como; 5-fluorouracil⁸, ácido mefenámico⁹, piroxicam¹⁰, diclofenaco¹¹, paclitaxel¹² y docetaxel¹³. Estos estudios demuestran que la asociación no covalente entre las moléculas de fármaco y el dendrímero presenta una mayor eficiencia terapéutica en comparación a las formulaciones de fármaco libre, puesto que se evidencia un aumento tanto de la solubilidad como en el tiempo de circulación del fármaco. Por otro lado, también existen estudios *in vitro* e *in vivo* que han motivado la utilización de dendrímeros PAMAM para desarrollar nuevos sistemas de señalización, transporte y liberación de fármacos contra el cáncer. Un ejemplo, es la investigación desarrollada por Kukowoska-Latallo y colaboradores, en la cual reportan que el nano-transportador PAMAM conjugado superficialmente con el fármaco anticancerígeno metotrexato, aumenta diez veces la actividad antitumoral en comparación a la utilización de metotrexato libre a una misma concentración de fármaco¹⁴.

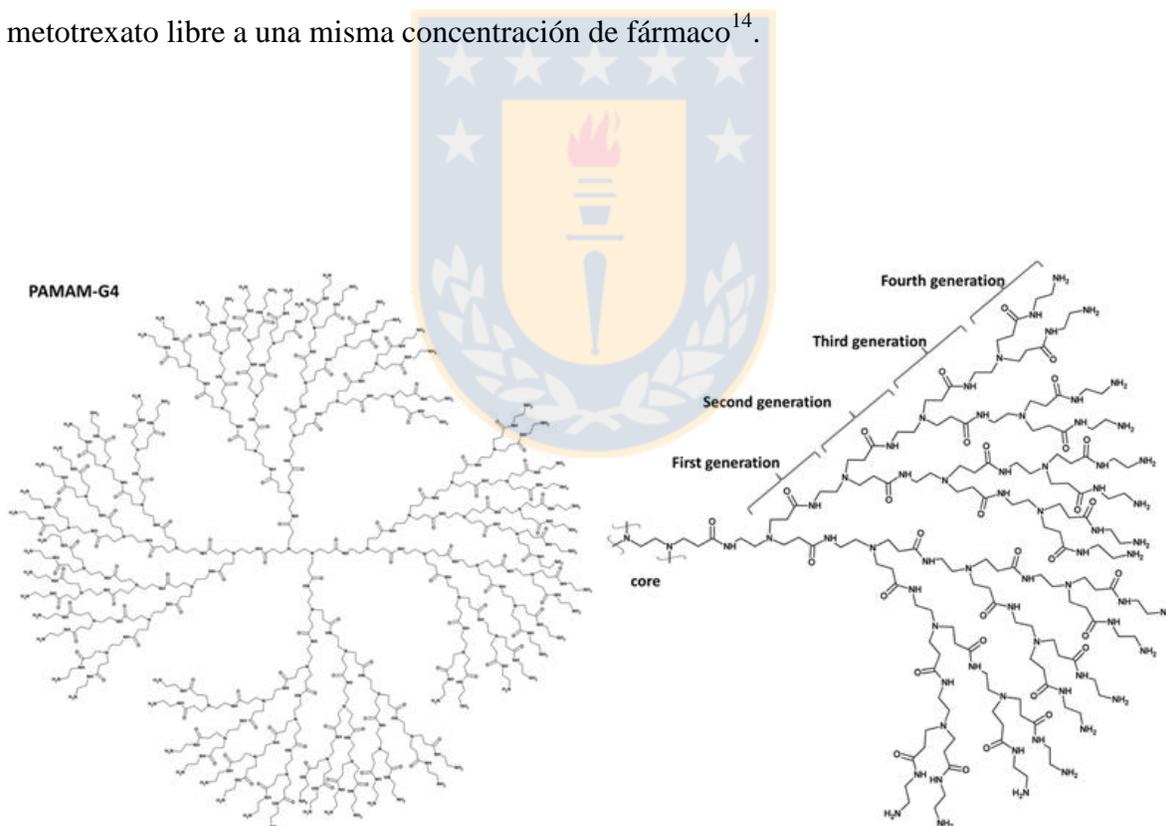


Figura 2. Representación del dendrímero PAMAM de cuarta generación (G4)¹⁵.

A pesar de la amplia aplicabilidad en el área biomédica, la utilización de los dendrímeros PAMAM en sistemas biológicos se ve limitada debido a la citotoxicidad que presentan, la cual está asociada a sus grupos superficiales catiónicos. Sin embargo, es posible superar este problema sustituyendo parcialmente los grupos amino superficiales con polímeros lineales solubles como el polietilenglicol (PEG) o mediante su acetilación (ACE)¹⁶⁻¹⁸. Estudios comparativos entre los sistemas sustituidos superficialmente PAMAM-PEG y PAMAM-ACE, han demostrado que los dendrímeros sustituidos con PEG presentan una menor toxicidad (13% a 53% de sustitución; 28-53% de supervivencia celular), en comparación a los dendrímeros parcialmente acetilados (44% a 63% de sustitución periférica, 5-28% de supervivencia celular), para el mismo rango de concentraciones estudiadas¹⁹. Hoy en día, la sustitución de los grupos amino superficiales del dendrímero PAMAM con PEG es la estrategia más empleada, ya que no sólo reduce significativamente los niveles de citotoxicidad, sino que también aumenta la solubilidad y la asociación de fármacos hidrofóbicos, minimiza la absorción no específica de los tejidos y mejora el efecto de permeabilidad y la retención (EPR) de los sistemas²⁰.

En relación a lo expuesto anteriormente, las investigaciones se han centrado en desarrollar sistemas avanzados de liberación de fármacos, capaces de hacer llegar el fármaco a un blanco terapéutico de forma más selectiva, modificando racionalmente la superficie de los dendrímeros PAMAM por diferentes vías químicas. Para esto se han utilizado ligandos como: anticuerpos, péptidos o moléculas pequeñas capaces de reconocer y unirse a receptores moleculares expresados sobre las células dañadas. De este modo, la obtención de esta nueva generación de nano-transportadores dirigidos ha despertado grandes expectativas para desarrollar nuevos tratamientos o tests de diagnóstico más específicos para ciertos tipos de cáncer.

1.3 E-selectina como blanco para terapia anti-cáncer

La E-selectina (64 kDa), también conocida como; CD62E, ELAM-1 y LECAM-2, es una proteína de adhesión molecular expresada específicamente en la membrana plasmática de las células endoteliales. Esta proteína se caracteriza por tener una estructura bien conservada, la cual incluye a un dominio tipo lectina, uno tipo factor de crecimiento epidérmico, una región transmembranal y una intracitoplásmica. Su expresión es estimulada por citoquinas como factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1) y lipopolisacárido bacteriano (LPS). Estudios sobre E-selectina han revelado su importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. Además, su preponderante rol en el proceso de metástasis celular, permitiendo la adhesión de células tumorales sobre el endotelio vascular, ha hecho que esta proteína sea considerada una potencial diana terapéutica para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades inflamatorias y el cáncer^{21,22}. Es por este motivo, que diversas investigaciones se centran en la búsqueda de nuevos compuestos que puedan provocar la inhibición selectiva de esta proteína, ya que podrían ser potenciales candidatos a fármacos anti-cancerígenos o anti-inflamatorios.

La E-selectina exhibe una alta afinidad por hidratos de carbonos sialilados y fucosilados como el tetrasacárido de Lewis (sLe^x; Neu5Ac α ₂₋₃Gal β ₁₋₄[Fuc α ₁₋₃]GlcNAc), lo cual ha proporcionado las bases para el desarrollo de diversos compuestos análogos con gran afinidad por el sitio activo de esta proteína. Utilizando el modelo de asociación E-selectina-ligando, obtenido por Sommers y colaboradores el año 2000 (Figura 3)²³, ha sido posible postular nuevos compuestos candidatos con mayor afinidad por la E-selectina. Basándose en este modelo de asociación, Ernst y su grupo de investigación han sintetizado diferentes análogos estructurales de sLe^x, los cuales han demostrado tener una mayor afinidad por la E-selectina que su ligando fisiológico²⁴. Sin embargo, los compuestos derivados de carbohidratos no son considerados buenos fármacos, debido a que son sensibles a la hidrólisis enzimática, tienen una reducida potencia, presentan pobres propiedades farmacocinéticas y sus rutas sintéticas son muy complejas²⁵. Por ende, actualmente el diseño o búsqueda de moléculas sintéticas de bajo peso molecular y que presenten una alta afinidad por la E-selectina, es de vital importancia para el formulación de nuevos ligandos inhibidores de la proteína.

Un aspecto importante a considerar en la búsqueda de nuevas moléculas con alta afinidad por E-selectina, es que esta proteína posee un sitio de unión superficial y accesible al solvente; razón por la cual, la interacción entre esta proteína y su ligando fisiológico (sLe^x) es débil ($IC_{50} \approx 1mM$). Mientras que esta característica estructural es necesaria para el normal funcionamiento fisiológico de E-selectina, es un reto para el descubrimiento de nuevos inhibidores con fines terapéuticos, los cuales también podrían ser empleados para orientar nuevos sistemas nano-transportadores de fármacos.

En consecuencia, la posibilidad de postular nuevas moléculas con gran afinidad por una proteína en particular, como la E-selectina, para ser empleadas en la orientación de sistemas para transportar fármacos, y así, mejorar su eficiencia terapéutica, constituiría un importante avance en el área biomédica. Asimismo, la implementación de tecnologías computacionales complementadas con metodologías experimentales, despierta grandes expectativas para lograr el desarrollo de estos innovadores sistemas, los cuales podrían ser empleados en futuras terapias farmacológicas contra enfermedades como el cáncer.

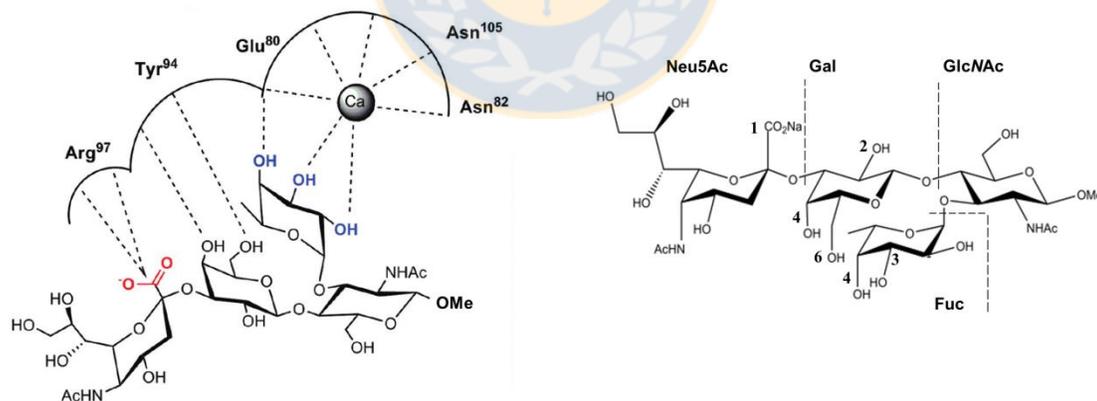


Figura 3. Representación esquemática de las principales interacciones del complejo E-selectin-sLe^x (izquierda). Estructura 2D del tetrasacárido de Lewis (sLe^x) (derecha).



Capítulo 2. Propuesta de Investigación, Hipótesis y Objetivos

2.1 Propuesta de investigación

Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo de nuevos nano-sistemas para el transporte y la liberación dirigida de fármacos es crucial para mejorar las diversas limitaciones que presentan tratamientos convencionales como la quimioterapia. De esta forma, la propuesta de esta tesis doctoral fue: realizar la síntesis de un nuevo nano-transportador de fármacos dirigido hacia la proteína diana E-selectina, utilizando para ello diversas herramientas computacionales y experimentales.

Las células cancerígenas tienen mecanismos propios de transporte mediados por receptores específicos que pueden ser utilizados para dirigir específicamente los sistemas nano-transportadores. En esta investigación se seleccionó la proteína E-selectina como receptor específico ya que juega un importante rol en el proceso de metástasis celular y no se expresa constitutivamente en las células endoteliales *in vivo*²².

En particular, la investigación se centró en la búsqueda de compuestos con gran afinidad por la proteína E-selectina, tomando como referencia la asociación entre la proteína y su ligando fisiológico sLe^x. Mediante la combinación de metodologías computacionales (Screening Virtual y Dinámica Molecular) y experimentales (Espectroscopia de Fluorescencia, Espectroscopia RMN ¹H y análisis *in vitro* de citotoxicidad), fueron propuestos cuatro compuestos como potenciales inhibidores de la E-selectina, los cuales presentaron constantes de disociación (K_d) que oscilan desde 333 μ M a 1 mM. Por otro lado, el dendrímero PAMAM de cuarta generación fue seleccionado para conformar la estructura central del nano-transportador, puesto que su arquitectura ramificada permite alojar y transportar en su interior fármacos anticancerígenos⁷. La superficie del dendrímero PAMAM-G4 fue conjugada con PEG, para disminuir la citotoxicidad del sistema. Finalmente, para dirigir el nano-transportador a la diana seleccionada, en los extremos del PEG fueron unidas covalentemente las moléculas del compuesto que exhibió la mayor afinidad por la proteína. Finalmente, mediante análisis *in vitro* se realizaron ensayos de citotoxicidad celular, en donde se corroboró que el sistema nano-transportador obtenido no presenta citotoxicidad dentro del rango de concentraciones estudiadas.

Los resultados aquí reportados demuestran que la combinación de técnicas computacionales y experimentales es una poderosa herramienta para ser utilizada en el desarrollo de nuevos transportadores de fármacos. Así, la importancia de esta investigación, estriba en el enorme potencial que supondría dirigir este sistema nano-transportador de fármacos de forma específica hacia células dañadas del organismo y no al resto de las células y tejidos sanos, disminuyendo los nocivos efectos colaterales que causan en los pacientes tratamientos invasivos como la quimioterapia.



2.2 Hipótesis

A partir de la utilización de metodologías químico computacionales complementadas con análisis experimentales, es posible encontrar compuestos con alta afinidad por el sitio activo de la proteína E-selectina, para posteriormente unir covalentemente el compuesto de mayor afinidad sobre la superficie del sistema PAMAM(G4)-PEG, obteniendo así un nano-transportador de fármacos dirigido.

2.3 Objetivo general

Diseñar un nano-transportador dirigido de fármacos hacia la proteína blanco E-selectina, empleando metodologías computacionales y experimentales.

2.4 Objetivos específicos

1. Seleccionar compuestos que presenten una gran afinidad por el sitio activo de la proteína E-selectina mediante la utilización de screening virtual.
2. Estudiar la formación de complejos E-selectina-ligando mediante simulaciones de DM y determinar los residuos aminoacídicos preponderantes en la asociación.
3. Estudiar la afinidad de los compuestos seleccionados con E-selectina mediante cálculos computacionales, espectroscopia de fluorescencia y STD-RMN.
4. Sintetizar un sistema nano-transportador de fármaco dirigido hacia la proteína E-selectina y evaluar su citotoxicidad, a través de ensayos de actividad biológica.

Capítulo 3. Metodología



A continuación se describen las técnicas metodológicas empleadas durante la realización de esta Tesis Doctoral. Al comienzo de cada metodología se describe una introducción sobre cada técnica y posteriormente la descripción metodológica empleada en esta investigación.

3.1 Screening Virtual

Según la revista Nature, “Screening Virtual” es una estrategia computacional para buscar e identificar estructuras químicas que puedan unirse a una diana terapéutica, a partir de una gran librería de compuestos²⁶. En la práctica, es una eficiente herramienta de búsqueda *in silico* que predice la orientación de un determinado ligando sobre el sitio activo de un receptor de interés (docking), estableciendo una puntuación para su potencial afinidad (score)²⁷. Aquellos compuestos con gran afinidad proteína-ligando se seleccionan para las siguientes fases de refinamiento estructural y posibles estudios *in-vitro*, y los que aprueban, posteriormente son utilizados para ensayos clínicos en humanos. Aunque empleando esta metodología se hayan descubierto varios compuestos que finalmente se han convertido en fármacos, el éxito de sus resultados es actualmente limitado, lo cual es atribuible a la imposibilidad de explorar de forma completa los cambios conformacionales que pueden ocurrir tanto en el ligando como en el receptor. Por otra parte, las funciones de puntuación no son capaces de incluir todos los factores que modulan las interacciones entre el ligando y la proteína, ya que sólo algoritmos computacionales acotados permiten la exploración de miles de compuestos en forma eficiente, es por esto que los programas suelen utilizar expresiones empíricas ajustadas mediante una parametrización basada en complejos ligando-receptor conocidos²⁸.

En la actualidad, existen diversos softwares para realizar Screening Virtual y más de treinta funciones de puntuación descritas. Básicamente, todos contienen dos componentes; una función de puntuación, que permite calcular el mínimo global de energía, el cual debiese coincidir con el mínimo global de energía libre del sistema proteína-ligando, y un algoritmo de búsqueda, que se utiliza para muestrear exhaustivamente todos los modos posibles de unión entre el ligando y el receptor. La diferencia entre estos softwares radica en los algoritmos de búsqueda utilizados, el manejo del ligando y la flexibilidad que le puede dar a las proteínas,

las funciones de puntuación que emplean y el tiempo de CPU requerido para evaluar la afinidad de cada sistema proteína-ligando. En la Tabla 1, se muestran los softwares más comunes para realizar Screening Virtual junto a su algoritmo de muestreo y función de puntuación.

Tabla 1. Herramientas comunes para realizar Screening Virtual²⁷.

| Método | Muestreo del ligando | Función de Puntuación |
|---------------------------------------|--|---|
| Dock ²⁹ | Crecimiento gradual | Campo de fuerza |
| AutoDock-Vina ³⁰ | Algoritmo genético | Combinación de campo de fuerza y función empírica |
| AutoDock-4 ^{31,32} | Ensamblajes Conformacionales | Campo de fuerza |
| GOLD ³³ | Algoritmo genético | Función empírica |
| FlexX ³⁴ | Crecimiento gradual | Función empírica |
| Glide (Schrodinger) ³⁵ | Búsqueda Exhaustiva | Función empírica |
| ICM ³⁶ | Muestreo Pseudo-Browniano y minimización local | Combinación de campo de fuerza y función empírica |
| FRED (Openeye Software) ³⁷ | Ensamblajes Conformacionales | Función de Gaussiana y función empírica |
| LigandFit (Accelrys) ³⁸ | Monte Carlo | Función empírica |

La búsqueda a gran escala de nuevos ligandos que presenten gran afinidad por un sitio activo en particular, ha sido la consigna de las industrias farmacéuticas en las últimas décadas. De esta forma los estudios de Screening Virtual están jugando un papel cada vez más importante en el diseño racional de fármacos. No obstante, debe quedar claro que los valores de afinidad proteína-ligando calculados mediante estos softwares son bastante aproximados y no coinciden con el valor de energía libre de unión real. Asimismo, es necesario refinar los resultados obtenidos mediante la utilización de otras técnicas computacionales que consideren otros factores como por ejemplo; efectos del solvente en la interacción³⁹.

A continuación se detalla el protocolo de Screening virtual empleado para realizar la búsqueda de compuestos candidatos, los cuales orientarán al sistema nano-transportador hacia la proteína E-selectina.

3.1.1 Preparación de la estructura de la proteína E-selectina

La estructura cristalina del dominio extracelular E-selectin Lectin/EGF, fue obtenido desde la base de datos de proteínas; Protein Data Bank (código de referencia 1G1T²³), y fue utilizado como estructura de partida para realizar la simulación de DM. La estructura cristalina reportada presenta una resolución cristalográfica de 1.5 Å y contiene en su sitio activo la estructura del sLe^x.

Con el fin de relajar el sitio activo de la proteína E-selectina, previo al screening virtual se realizó una simulación de DM al complejo E-selectina-sLe^x, utilizando el módulo de SANDER implementado en el software AMBER14⁴⁰. La carga del ion calcio que se encuentra estructuralmente constituido en el sitio activo de la proteína es 2+. Los parámetros utilizados para describir este el ion calcio son: épsilon 0.014 kcal/mol y radio de van der Waals 1.79 Å. El campo de fuerza ff12SB fue utilizado para describir la proteína y el campo de fuerza GLYCAM_06j⁴¹ fue empleado para describir al sLe^x. Los estados de protonación de los residuos ionizables de la proteína fueron determinados usando los programas PROPKA⁴² y H++⁴³ (<http://biophysics.cs.vt.edu/>), considerando condiciones de pH 7.4. El sistema fue centrado en una caja de agua cúbica con una distancia de 12 Å entre el soluto y el borde la caja. El modelo de agua TIP3P⁴⁴ fue utilizado en la simulación debido a que es un modelo de agua computacionalmente eficiente. Se utilizaron condiciones periódicas de contorno en conjunto con particle-mesh Ewald summation⁴⁵ para tratar las interacciones de largo alcance. Un cutoff de 12 Å fue usado para tratar las interacciones no enlazantes. Luego de construir el sistema y determinar los parámetros para el cálculo en el archivo de configuración, el sistema fue minimizado en tres etapas: en la primera, las moléculas de agua agregadas con la herramienta XLEAP fueron minimizadas, en una segunda etapa, los átomos de hidrógeno de la

proteína y el ligando fueron minimizados, finalmente en la tercera etapa, el sistema completo fue minimizado. 1500 pasos fueron usados para cada etapa, para los primeros 500 pasos el algoritmo *steepest decent* fue utilizado, y para los pasos restantes gradiente conjugado. El sistema minimizado fue equilibrado durante 1 ns. La temperatura fue aumentando gradualmente desde 0 K a 300 K bajo un ensamble NVT. Terminado el proceso de equilibrio, se realizó la simulación de DM por 20 ns utilizando el ensamble NPT y un *time-step* de 2 fs. La condición de temperatura y presión constantes en la simulación se logró mediante el acople de un termostato y baróstato de Langevin⁴⁶. Las distancias de enlace fueron restringidas a sus valores iniciales mediante el algoritmo SHAKE⁴⁷. Una estructura representativa de la proteína fue obtenida a partir de la DM utilizando el software VEGA ZZ⁴⁸ mediante una clusterización de las conformaciones del complejo extraídas desde la trayectoria, en base a la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) de coordenadas atómicas entre dos conformaciones, utilizando un RMSD 1.5 Å. La estructura representativa promedio resultante, fue utilizada como referencia para realizar el Screening virtual.

3.1.2 Búsqueda de compuestos mediante Screening virtual

El programa AutoDock-Vina (versión 1.1.2)⁴⁹ fue empleado para realizar el cálculo automatizado de docking molecular. Para realizar el cálculo la estructura de la proteína se mantuvo rígida, mientras que los ligandos fueron tratados como moléculas flexibles. Este programa emplea una función de puntuación híbrida (ecuación 1) combinando enfoques basados en el conocimiento y empíricos, lo cual significa que extrae información empírica sobre preferencias conformacionales proteína-ligando y medidas de afinidad experimentales. La energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) es obtenida mediante las siguientes contribuciones: término atractivo (ΔG_{gauss}), término repulsivo ($\Delta G_{\text{repulsión}}$), término para enlaces de hidrógeno (ΔG_{hbond}), término para interacciones hidrofóbicas ($\Delta G_{\text{hidrofóbicas}}$) y un término para describir el número de enlaces rotables (ΔG_{tors}).

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{gauss}} + \Delta G_{\text{repulsión}} + \Delta G_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{hidrofóbicas}} + \Delta G_{\text{tors}} \quad (1)$$

Para realizar este estudio, se utilizó la librería de compuestos Drug-like (~ 15 millones de compuestos) de la base de datos de compuestos Zinc⁵⁰ (<http://zinc.docking.org/>). La base de datos con compuestos denominados “drug-like”, contiene moléculas con peso molecular en el rango de 150 g/mol a 500 g/mol y $\log P_{\text{ocu/H}_2\text{O}} \leq 5$. Esta librería de compuestos fue filtrada por grupo funcional, reteniendo los compuestos que en su estructura poseían; grupos carboxílicos y átomos de azufre nucleofílicos, quedando 126.261 compuestos para realizar el screening virtual. El grupo carboxílico fue seleccionado debido a su importancia en la asociación de ligandos con el sitio activo de la E-selectina. Por otro lado, el átomo de azufre nucleofílico fue seleccionado por su capacidad de unión al grupo maleimida, el cual está presente en un extremo del PEG que se utilizará en el diseño del sistema-nanotransportador dirigido (véase apartado 3.7). El ligando fisiológico (sLe^x) fue agregado en la librería filtrada, para comprobar la efectividad de los resultados del screening. MGL tools (versión 1.5.4) fue utilizado para convertir las moléculas y el receptor a archivos PDBQT, agregando los hidrógenos polares y las cargas parciales. El software con interfaz gráfica PyMOL (versión 1.3 Schrödinger, LLC; <http://pymol.org/>) fue utilizado para analizar los resultados. El tamaño de la caja utilizada en el estudio (22Å × 20Å × 20Å) fue calculado desde las coordenadas atómicas de la estructura representativa del complejo E-selectina-sLe^x obtenida desde la simulación de DM previa. Con el fin de validar el uso de la estructura representativa en el estudio de screening virtual, se comparó la afinidad del sLe^x por la proteína obtenida desde DM y la cristalográfica. Los resultados mostraron que la estructura representativa obtenida por simulación de DM es altamente consistente con la información cristalográfica ($\Delta G_{\text{unión}}$ -6.5 kcal/mol y -6.1 kcal/mol, respectivamente; RMSD 2.12 Å). La estructura del ligando no presentó desplazamientos relevantes y la red de interacciones dentro del sitio activo de la proteína se mantuvieron estables.

3.2 Simulaciones de DM

La dinámica molecular (DM) es una de las principales herramientas para el estudio de biomoléculas. Las simulaciones de DM permiten el estudio de procesos dinámicos complejos de los sistemas biológicos tales como; estabilidad de proteínas, cambios conformacionales, reconocimiento molecular de biomoléculas, transporte de iones, etc. Es una herramienta teórica clave en el desarrollo de nuevos fármacos⁵¹ y en la determinación estructural de proteínas junto a rayos X y RMN⁵². Actualmente, existen reconocidos programas para realizar simulaciones de DM tales como; AMBER⁴⁰ y NAMD⁵³, los cuales utilizan técnicas de paralelización para optimizar el tiempo de cálculo.

Con el fin de obtener los modelos de asociación E-selectina-ligando se realizaron simulaciones de DM para los complejos de E-selectina con los ligandos seleccionados desde el screening virtual, utilizando el módulo de SANDER de AMBER 14. Las coordinadas iniciales de los complejos para realizar las simulaciones de DM, fueron tomadas desde los resultados de docking. Las cargas atómicas parciales para los compuestos seleccionados fueron calculadas utilizando el software Gaussian09 utilizando el método HF/6-31G*⁵⁴ y considerando la conformación de mínima energía de cada ligando en el complejo. Las cargas parciales sobre los átomos fueron definidas usando el método Restrained Electrostatic Potential (RESP)⁵⁵ implementado en el programa ANTECHAMBER de AMBER 14. Todos los complejos E-selectina-ligando fueron centrados y solvatados en una caja cúbica con el modelo de agua TIP3P y a una distancia de 12 Å entre el soluto y el borde la caja. Las simulaciones de DM fueron llevadas a cabo tal como se describió anteriormente (véase apartado 3.1.1).

3.3 Cálculos de energía libre

La energía libre es posiblemente la magnitud más importante de la termodinámica, es una medida de la cantidad de trabajo que puede realmente obtenerse de un sistema y juega un papel fundamental en todos los procesos químicos. En particular, la obtención de este parámetro es crucial en el campo de diseño de fármacos, ya que permite evaluar la afinidad relativa de complejos proteína-ligando. Se expresa mediante la función de Helmholtz (A) o la función de Gibbs (G), según las condiciones del proceso. Como la mayoría de los procesos se realizan bajo condiciones de temperatura y presión constante, la función de Gibbs es la más empleada.

La energía libre es una magnitud difícil de obtener, sobre todo en sistemas biológicos, donde la superficie energética presenta una gran cantidad de mínimos separados por barreras energéticas bajas. Es por esto que ha sido un desafío su determinación empleando DM, puesto que no es capaz de muestrear regiones del espacio de las fases que hacen contribuciones importantes a la energía libre (regiones de alta energía). No obstante, DM si puede determinar la energía potencial, ya que las zonas de alta energía en la hiperficie conformacional no hacen aportes sustantivos al valor de la energía potencial global del sistema.

Los métodos basados en DM más exitosos para calcular energías de interacción proteína-ligando han sido Integración termodinámica (TI), Bennett acceptance ratio⁵⁶ (BAR) y multistate Bennett acceptance ratio⁵⁷ (MBAR). Estos, son llamados también métodos “alquímicos” pues suponen la transformación de un sistema desde el estado inicial A al final B, implicando la creación y eliminación de átomos. En el método de TI el cambio en energía libre relativa entre dos estados A y B para un sistema determinado puede ser obtenido a partir de la integral de la derivada de la energía potencial sobre el parámetro de acoplamiento lambda (λ), tal como se muestra en la ecuación 2.

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (2)$$

La determinación de la energía libre por TI se lleva a cabo variando sistemáticamente el valor de λ desde el estado inicial 0 al estado final 1. La integración se lleva a cabo sobre el promedio de la derivada de energía potencial a un valor de λ determinado. Para evaluar la energía libre de cualquier proceso biológico es necesario definir un ciclo termodinámico, tal como se muestra en la Figura 4.

De acuerdo a este ciclo, la energía libre relativa de la unión receptor-ligando puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta G_{unión} = \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_4 - \Delta G_3 \quad (3)$$

donde, ΔG_1 y ΔG_2 representan la energía libre de unión para los ligandos A y B con el receptor, mientras ΔG_3 y ΔG_4 representan el cambio de energía libre correspondiente a la transformación alquímica del ligando libre en disolución acuosa y enlazado al receptor, respectivamente.

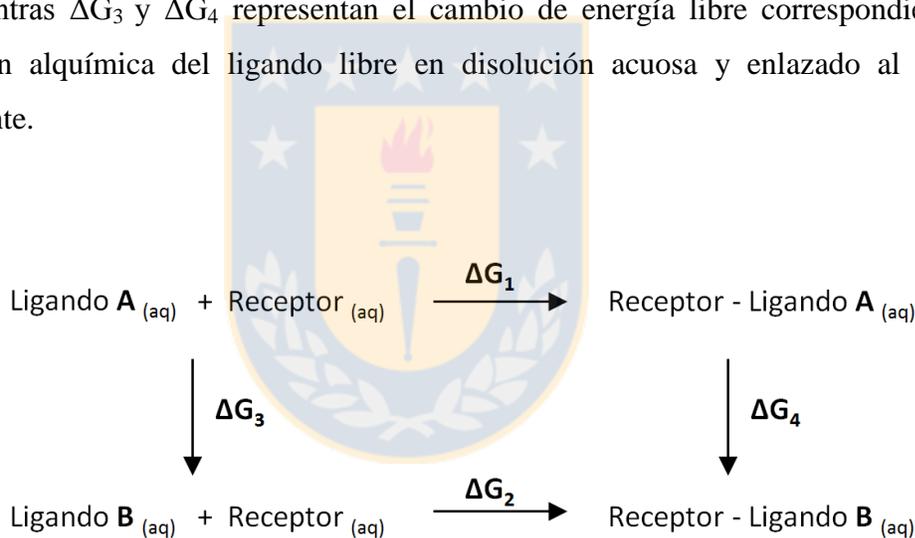


Figura 4. Ciclo termodinámico empleado para calcular la energía libre relativa proteína-ligando. Las flechas verticales muestran la transformación alquímica entre los diferentes ligandos (A y B) libres en disolución (ΔG_3) y enlazados a la proteína (ΔG_4). Las flechas horizontales indican la energía libre para los complejos receptor-ligando; A (ΔG_1) y B (ΔG_2).

Un enfoque alternativo para la determinación de energía libre relativa es el método BAR, el cual utiliza las diferencias en la energía potencial de dos estados en ambas direcciones para obtener estimaciones de energía libre más precisas y con errores promedios menores que TI. Otro método utilizado para el cálculo de energía libre relativa es MBAR, el cual es una extensión directa de BAR, ya que permite la evaluación de los datos de energía potencial para todos los estados y predecir la energía libre en un estado no muestreado. De esta forma, utilizando cualquiera de estos tres enfoques es posible obtener valores confiables de energías libre de unión proteína-ligando. No obstante, la limitación más importante que presentan estos métodos es el costo computacional asociado al enorme número de átomos de los sistemas estudiados en un entorno de solvente explícito.

En el desarrollo de metodologías alternativas para describir sistemas biológicos, que permitan reducir el costo computacional sin que ello suponga una pérdida drástica en la capacidad para predecir las diferencias de afinidad entre ligandos; probablemente, MM/PBSA y MM/GBSA han sido las más exitosas⁵⁸. Estas técnicas combinan una descripción discreta del complejo ligando-receptor con un tratamiento simplificado del solvente basado en un modelo continuo.

Los métodos MM/PBSA y MM/GBSA calculan la variación de energía libre entre el estado unido y libre entre una proteína y un ligando, utilizando diferentes conformaciones del complejo proteína-ligando extraídas desde una simulación de DM. En términos generales, en el método de MM/PBSA el cálculo de la energía de interacción en fase gas entre la proteína y el ligando (ΔE_{MM}), es la suma de las energías de interacción electrostáticas y de van der Waals. La energía libre de solvatación (ΔG_{solv}) es la suma de las contribuciones polares (ΔG_{PB}) y no polares (ΔG_{SA}). El término ΔG_{PB} es calculado resolviendo la ecuación de Poisson-Boltzmann. La contribución no polar es determinada sobre las bases del área superficial accesible al solvente (SASA) usando el método LCPO; $\Delta G_{SA}=0.0072 \times \Delta SASA$. Por otro lado, en el método MM/GBSA la energía de interacción en fase gas (ΔE_{MM}) y la contribución no polar (ΔG_{SA}) para el cálculo de energía de solvatación se calculan de la misma manera que en la metodología MM/PBSA. No obstante, la contribución polar (electrostática) a la energía de solvatación (ΔG_{GB}) se obtiene utilizando el modelo Generalizado de Born.

3.3.1 Metodología para el cálculo de energía libre E-selectina-ligando

Utilizando las trayectorias de DM se obtuvieron los valores de energía libre relativa para una serie de complejos E-selectin-oligosacáridos mediante los métodos de TI, BAR y MBAR. Todas las simulaciones de DM independientes, fueron realizadas empleando solvente explícito y bajo condiciones periódicas de contorno. El espacio de muestra fue definido mediante nueve valores de lambda (λ) (0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80 y 0.90). Los valores de $\lambda = 0$ y $\lambda = 1$ fueron extrapolados linealmente. Para cada valor de λ , fueron considerados 1000 pasos de minimización seguido por 500 ps de tiempo de equilibrio y 0.5ns de producción bajo un colectivo NPT. La temperatura y la presión fueron controladas a 300 K y 1 atm utilizando un termostato y baróstato de Langevin. Para cada valor de λ , las derivadas de la energía libre ($\partial V/\partial\lambda$) fueron recolectadas independientemente. Durante la fase de producción de las DM los valores de ($\partial V/\partial\lambda$) para TI, BAR y MBAR fueron guardados cada 100 pasos. Para asegurarse de la estabilidad de la simulación, las transformaciones fueron realizadas en tres etapas; en la primera, las cargas parciales atómicas sobre los átomos que iban a desaparecer fueron removidas (ΔG^I); en una segunda etapa, los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que van a desaparecer son modificados a cero, mientras que los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que aparecen son ahora considerados en el cálculo (ΔG^{II}); finalmente, las cargas parciales atómicas sobre los átomos que aparecen son considerados (ΔG^{III}). Cabe mencionar que fue necesario utilizar *softcore potentials*⁵⁹ en la etapa número dos. De esta manera, a partir de la ecuación 3 y del diagrama de energía libre (Figura 4) la energía libre relativa de unión ($\Delta\Delta G_{unión}$) puede ser obtenida como función de ΔG^I , ΔG^{II} y ΔG^{III} , tal como se expresa en las ecuaciones 4, 5 y 6.

$$\Delta\Delta G_3 = \Delta G_{Ligando}^I + \Delta G_{Ligando}^{II} + \Delta G_{Ligando}^{III} \quad (4)$$

$$\Delta\Delta G_4 = \Delta G_{Complejo}^I + \Delta G_{Complejo}^{II} + \Delta G_{Complejo}^{III} \quad (5)$$

$$\Delta\Delta G_{unión} = (\Delta G_{Complejo}^I + \Delta G_{Complejo}^{II} + \Delta G_{Complejo}^{III}) \\ - (\Delta G_{Ligando}^I + \Delta G_{Ligando}^{II} + \Delta G_{Ligando}^{III}) \quad (6)$$

El tiempo total de simulación necesario para transformar un oligosacárido en otro fue de 54ns (27 ns en la dirección directa y 27 ns en la dirección inversa). El tiempo de simulación contempla el estudio del ligando libre en solución y el complejo.

Para el caso del post-procesamiento de BAR y MBAR, los valores de energía potencial recopilados desde las DM fueron analizados con el código pyMBAR⁵⁷, creado por Shirts y Chodera. Este programa es libre y puede ser descargado desde el siguiente link; <https://simtk.org/home/pymbar>.

Debido al alto costo computacional que conlleva la obtención de energías libres relativas por métodos como TI, BAR y MBAR, fue necesario utilizar otras metodologías como; MM/PBSA y MM/GBSA para obtener los valores de energías libre de unión E-selectina-ligando ($\Delta G_{unión}$) para los ligandos seleccionados desde el screening virtual (ecuación 7). Estos métodos proporcionan un valor promedio de energía libre, calculado desde una serie de estructuras extraídas desde una trayectoria de una DM. Los cálculos de energía libre mediante MM/PBSA y MM/GBSA fueron obtenidos mediante el uso del script Python MMPBSA.py⁶⁰, implementado en el software de AMBER 14. Para realizar los cálculos, fueron extraídos 200 estructuras de los últimos 10 ns de cada trayectoria de DM. Las contribuciones a la energía libre fueron calculadas utilizando el módulo SANDER implementado en el programa AMBER 14 extrayendo los parámetros del campo de fuerza utilizado para crear los archivos de parámetros y topologías. Para el cálculo de MM/PBSA fue empleado el método ipb =2; el cual extrae los parámetros de radio atómico y carga parcial desde el archivo de parámetros; y para el cálculo de MM/GBSA fue empleado el modelo estándar (igb=1). Para ambos métodos, fue utilizado el valor de 80 para la constante dieléctrica del medio y un valor de 1 para representar la constante dieléctrica del soluto.

$$\Delta G_{unión} = G_{complejo} - (G_{Receptor} + G_{Ligando}) \quad (7)$$

3.4 Espectroscopia de Fluorescencia

Existen varios métodos experimentales que pueden ser utilizados para determinar afinidades proteína-ligando. Uno de los más utilizados es la espectroscopia de fluorescencia, gracias a su gran sensibilidad y a su mayor intervalo de respuesta lineal. La emisión de fluorescencia tiene lugar en la escala de nanosegundos, periodo de tiempo en el cual suceden numerosos procesos moleculares de interés biológico, que pueden inducir modificaciones en alguna de las propiedades de los compuestos fluorescentes (espectros, vidas medias, rendimiento cuántico, anisotropía de fluorescencia, etc.).

La fluorescencia es uno de los fenómenos luminiscentes en el cual las moléculas son capaces de absorber radiación electromagnética de cierta longitud de onda y posteriormente, emitirla a una longitud de onda mayor (Figura 5). Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética experimenta una transición a un estado electrónico de mayor energía o estado excitado. Desde ese estado las moléculas vuelven a su estado fundamental emitiendo fotones mediante; fluorescencia y fosforescencia. La primera se lleva a cabo desde un estado excitado singlete, mientras que la fosforescencia lo hace desde un estado triplete. El resto de los procesos de desactivación son no radiativos; relajación vibracional, conversión interna, conversión externa y cruce entre sistemas.

La intensidad de fluorescencia puede disminuir debido a una amplia variedad de procesos. Tales disminuciones en la intensidad de fluorescencia son llamadas “quenching”⁶¹. La determinación de este parámetro proporciona la oportunidad de estudiar la afinidad de diferentes ligandos fluorescentes por el sitio activo de algún receptor y cambios conformacionales en proteínas. Asimismo, es posible determinar cuantitativamente constantes de disociación (K_d) proteína-ligando utilizando protocolos y análisis matemáticos no complejos.

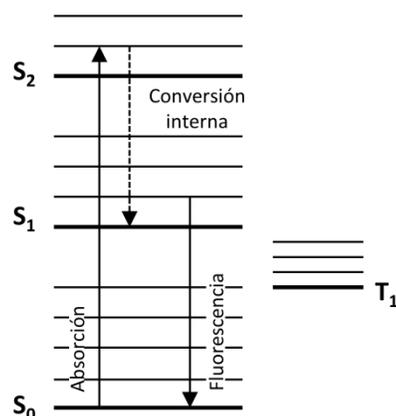


Figura 5. Esquema general de los primeros niveles de energía de una molécula orgánica. Se muestra la transición electrónica inducida por absorción de un fotón y posterior emisión fluorescente.

Mediante espectroscopia de fluorescencia fueron determinadas las afinidades experimentales de los compuestos seleccionados por la proteína E-selectina. Las medidas de fluorescencia fueron realizadas utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse acoplado a un termostato de multicelda Peltier. Las soluciones fueron preparadas utilizando un buffer fosfato (50 mM) a pH 7.4. La concentración de la proteína (E-selectina recombinante de rata, His Tag; ThermoFisher) fue 1.6 μM . Las muestras de los compuestos fueron preparadas el día del experimento. En el caso del compuesto **3** y el compuesto **1**, las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 390 nm (ranura de 5 nm) y la emisión de fluorescencia fue guardada a una longitud de onda de 400 nm (ranura de 5 nm). Para los compuestos **4** y **2**, las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 360 nm (ranura de 5 nm) y la emisión de fluorescencia fue guardada a una longitud de onda de 370 nm (ranura de 5 nm).

3.5 Diferencia de transferencia de saturación por RMN (STD-RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares en disolución, particularmente compuestos de interés biológico. Entre las técnicas de RMN conocidas, la espectroscopia de STD-RMN fue diseñada para detectar interacciones de moléculas pequeñas con sus receptores en presencia de otras que no interaccionasen, es por eso que ha tenido una creciente aplicación en la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos fármacos. STD-RMN se basa en el efecto NOE (Nuclear Overhauser Effect), el cual puede definirse como el cambio observable en la intensidad de la señal de resonancia de un núcleo cuando las transiciones de otro núcleo, dipolarmente acoplado, se perturban mediante excitación selectiva. El NOE es una interacción dipolo-dipolo y como tal depende de la potencia r^{-6} .

En la práctica, en un experimento STD-RMN se adquieren dos espectros (normalmente de ^1H) mono-dimensionales de forma alterna (Figura 6). En el primer experimento se saturan selectivamente los protones de la proteína mediante la irradiación con radiofrecuencias a baja potencia (I_{SAT}) en una zona del espectro en la que sólo debe haber señales de la proteína (on-resonance). En el otro experimento, la irradiación (I_0) se fija en una zona de frecuencias que esté libre de señales de cualquiera de las especies presentes en la muestra, normalmente a valores de desplazamiento químico por encima de 25 ppm (off-resonance). La diferencia entre ambos espectros mostrará exclusivamente la intensidad de señal de STD de las moléculas pequeñas que hayan estado enlazadas a la proteína. Las señales de las moléculas que no interaccionen con la proteína son canceladas debido a que sus intensidades son exactamente igual en ambos experimentos. La diferencia en intensidad debido a la transferencia de saturación puede ser cuantificada y constituye un indicador de la unión ligando/receptor, tal como se muestra en la ecuación; $I_{\text{STD}} = I_0 - I_{\text{SAT}}$ ⁶².

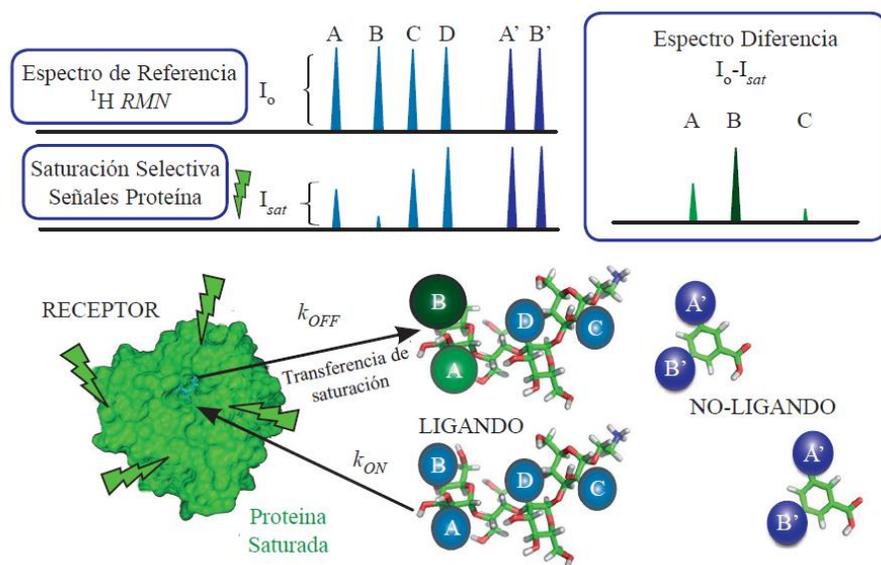


Figura 6. Representación esquemática del experimento 1D STD-RMN en una muestra conteniendo proteína en presencia de un exceso de moléculas. Se muestra el experimento de referencia (I_0) y el experimento donde se saturan selectivamente los protones de la proteína (I_{SAT}). En el espectro de diferencia (I_{STD}) se observan sólo los hidrógenos del ligando que interactúan con la proteína, ya que reciben parte de la saturación por NOE-intermolecular.

Un aspecto relevante a considerar, es que sólo los hidrógenos de las moléculas que se encuentren en contacto con el receptor a una distancia menor o igual a 5 Å, podrán recibir transferencia de magnetización y por ende, aparecer en el espectro de diferencia. Asimismo, aquellos hidrógenos que estén en estrecho contacto con el receptor tendrán señales más intensas debido a una transferencia de saturación más eficiente.

Por otra parte, el efecto STD puede ser mejor analizado si el factor de amplificación (STD-AF) es utilizado. El STD-AF es obtenido multiplicando el efecto STD relativo de un hidrógeno (I_{STD}/I_0) a una determinada concentración de ligando ($[L]$) con la razón molar de exceso de ligando en la proteína ($[L]/[P]$), tal como se muestra en la ecuación 8.

$$STD - AF = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} \quad (8)$$

Para un determinado tiempo de saturación, el STD-AF puede también ser representado como el número promedio de moléculas de ligando saturadas por una molécula de receptor. Las diferencias en STD-AF para diferentes hidrógenos pueden ser cuantitativamente obtenidos mediante la normalización de todas las intensidades, asignando arbitrariamente un valor de 100% al hidrógeno que exhibe la mayor intensidad de STD. Así, el porcentaje de STD-AF refleja la relativa proximidad que presenta un determinado hidrógeno al sitio de unión del receptor.

3.5.1 Estudios de STD-RMN

Los espectros de RMN ^1H para el compuesto 1 en agua deuterada fueron adquiridos en un espectrómetro de RMN Bruker Avance III 600 equipado con una sonda criogénica TCI de 5 mm usando tubos de RMN de 3 mm. La muestra de RMN se compone de una solución de ligando liofilizada en buffer fosfato a pH 7.4 y E-selectina (50 $\mu\text{g}/200\mu\text{L}$) disuelta en agua deuterada (HDO). La concentración final de ligando en la muestra fue 3.2 mM en una relación de E-selectina-ligando 1:762. El espectro de STD-RMN fue tomado a 298K con 32 scans y con una saturación selectiva para la proteína a 10 ppm (30 ppm para el espectro off resonance) utilizando una serie de 40 pulsos Gaussian-shaped (50 ms, 1 ms de retardo entre pulso), para un tiempo de saturación total de 4.9 s. Los espectros saturados y de referencia fueron adquiridos en el mismo set de datos mediante la creación de un pseudo experimento-2D. Los espectros STD a distintos tiempos de saturación obtenidos mediante la substracción del espectro de referencia al espectro saturado fueron adquiridos sin supresión de la señal del agua.

3.6 Análisis estructural cuantitativo para complejos proteína-ligando.

Teoría CORCEMA-ST

Los datos de los experimentos de STD-RMN pueden ser cuantificados teóricamente mediante el programa CORCEMA-ST, desarrollado por el profesor Rama Krishna⁶³. Éste se basa en una modificación de la teoría de la matriz de relajación completa e intercambio conformacional (CORCEMA) descrita para el análisis de experimentos de NOE transferido por intercambio. La aplicación permite predecir las intensidades STD a partir de coordenadas cartesianas atómicas de un complejo proteína-ligando.

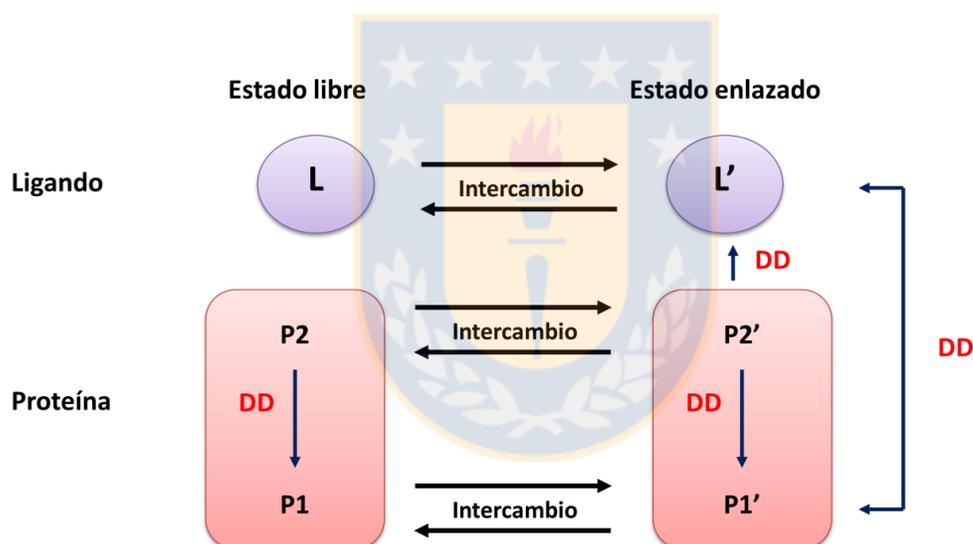


Figura 7. Modelo cinético de dos estados sobre el que se basa la formulación de la teoría de CORCEMA-ST para la predicción teórica de datos de STD⁶³.

Tal como se muestra en la figura 7, el proceso de intercambio en CORCEMA-ST se inicia con la identificación de dos especies moleculares, la proteína (P) y el ligando (L). Los protones de la proteína son subdivididos de forma general en dos conjuntos; P1 y P2. Los

protones P2 son los irradiados de forma selectiva. En la proteína, por tanto la saturación se origina en P2 y por difusión de spin se extiende a todo el conjunto P1 y al ligando instantáneamente enlazado, el cual, por intercambio químico rápido la transfiere y acumula en la disolución (ligando libre). En flechas negras se muestran las etapas de transferencia de saturación por intercambio químico, mientras que en azul aquellas que se producen por NOE (relajación cruzada dipolo-dipolo DD). Tomando en cuenta el esquema mostrado en la figura 7, las intensidades de protón observables, vienen dadas por la ecuación general:

$$I(t) = I_0 + [1 - \exp\{-(R + K)t\}](R + K)^{-1}Q \quad (9)$$

donde R+K es la matriz dinámica (relajación + intercambio) y Q es una matriz que cuantifica la relajación cruzada de los protones del ligando con los protones de la proteína saturados directamente por la radiofrecuencia en el experimento on-resonance.

Así, se puede analizar de una manera cuantitativa la compatibilidad de un modelo obtenido a partir de datos cristalográficos o generado computacionalmente, con las intensidades observadas experimentalmente en los espectros de STD-RMN. La relación entre el STD calculado y el STD experimental es definida por la función matemática denominada factor R-NOE (ecuación 10), donde i corresponde a las intensidades obtenidas a un determinado tiempo de saturación.

$$R_{NOE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=2}^N (STD_{calc,i} - STD_{exp,i})^2}{\sum_{i=2}^N (STD_{exp,i})^2}} \quad (10)$$

3.6.1 CORCEMA-ST

La teoría de CORCEMA-ST y los detalles sobre su utilización en el cálculo teórico de intensidades de STD, han sido descritas por el Prof. Krishna el año 2002⁶³. CORCEMA puede ser utilizado para predecir valores de STD para un determinado complejo proteína-ligando, bajo condiciones experimentales utilizando un modelo de coordenadas atómicas⁶⁴. El programa (*script*) está diseñado para su ejecución exclusivamente en MATLAB (The Mathworks, Natick, MA). Para obtener teóricamente el espectro de STD, 100 estructuras del complejo E-selectina-compuesto **1** se extrajeron desde una simulación de DM. Los desplazamientos químicos de los hidrógenos de la proteína E-selectina fueron calculados teóricamente mediante el programa ShiftX⁶⁵. La distancia considerada para el sitio activo fue de 6 Å. Se utilizaron las mismas concentraciones de ligando y proteína usada en los experimentos de STD-RMN. Para el cálculo, se asumió una $K_{on} = 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ Hz}$ para la asociación controlada por difusión y un valor de 0.85 para describir los grupos metilos con tiempo de correlación de $\tau=10$ ps. Finalmente, el factor R_{NOE} fue calculado con el fin de comparar los valores de STD teóricos con los experimentales a partir de la ecuación 8.

3.7 Síntesis del nano-transportador dirigido

La síntesis del nano-transportador dirigido se realizó mediante la asociación entre; dendrímero PAMAM-G4 (SKU-412449; Sigma Aldrich), crosslinker PEG SM(PEG)₄ (N° catalogo 22104; TermoFisher) y compuesto **1** (Pharmeks Ltd). El crosslinker hetero-bifuncional SM(PEG)₄ presenta en uno de sus extremos N-hidroxi-succinimida éster (NHS) que permite la conjugación covalente con las aminas superficiales del PAMAM-G4 a pH 7-9 a través de enlace amidas, y el grupo maleimida que interacciona con el compuesto **1** mediante la formación de un enlace tioéter a pH 6.5-7.5 (Figura 8).

En primer lugar, a 0.25 mL de dendrímero PAMAM-G4 al 10% en metanol se le extrajo todo el solvente mediante evaporación. A continuación el dendrímero fue disuelto en DMSO seco y depositado en un matraz de 5 mL. Luego, al matraz de reacción se vertieron lentamente 250 μ L de SM(PEG)₄ manteniendo el sistema en agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente. El pH de la reacción fue ajustado a 7-8 mediante la adición de pequeñas alícuotas de NaOH_(conc). A continuación, se agregó al matraz de reacción 1 mL de compuesto **1** (20 mg disueltos en DMSO seco) manteniendo el sistema en agitación constante a temperatura ambiente por 7 días.

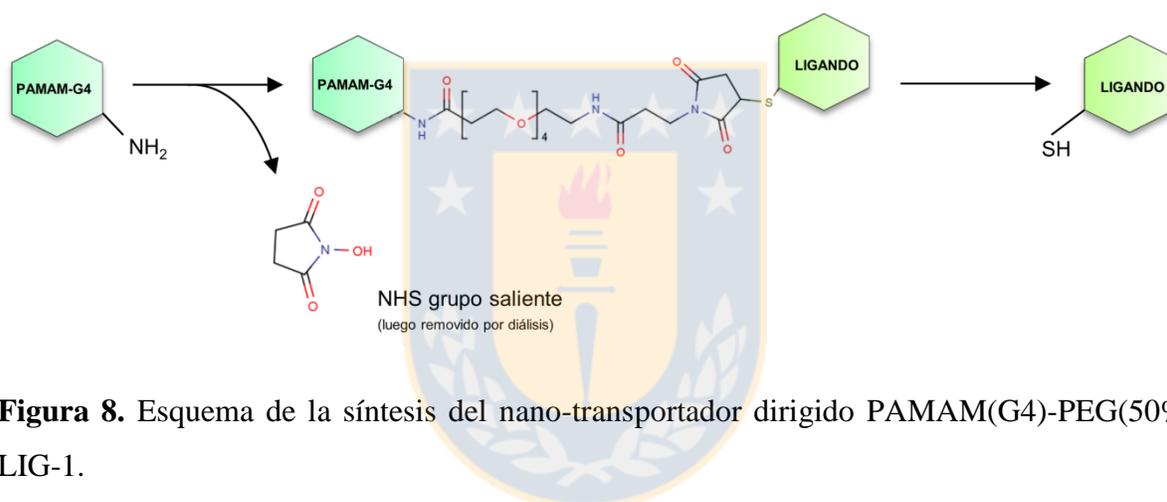


Figura 8. Esquema de la síntesis del nano-transportador dirigido PAMAM(G4)-PEG(50%)-LIG-1.

Posteriormente el producto de la reacción fue depositado dentro de una bolsa de diálisis (diámetro de poro 14000 Da) para su purificación durante una semana empleando agua calidad miliQ. La figura 9 representa el sistema de diálisis empleado para la purificación del sistema nano-transportador. Una vez finalizada la diálisis, el producto fue liofilizado y caracterizado por espectroscopia RMN ^1H .

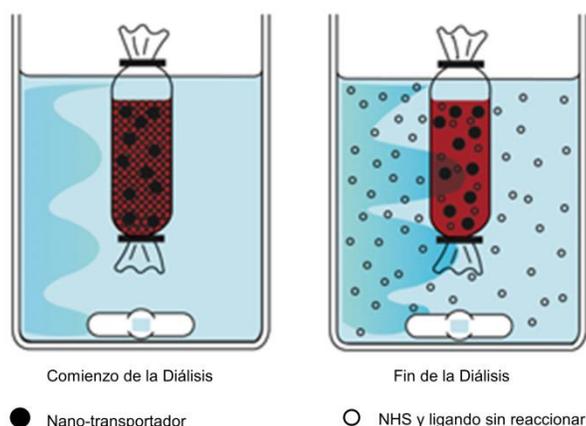


Figura 9. Representación del sistema de diálisis empleado para purificar el nano-transportador PAMAM(G4)-PEG(50%)-LIG-1.

3.8 Ensayos de citotoxicidad celular

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Diferentes autores han desarrollado diversas técnicas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios como líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentra el ensayo de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la reducción de resazurina; 7-hidroxi-10-oxidofenoxazin-10-ium-3-ona (Alamar Blue) entre otros⁶⁶. Este último, es uno de los más empleados para estudiar viabilidad o tasa de proliferación celular, ya que es un método sensible y sencillo en comparación con otros. El año 2012 PubMed informó la publicación de más de 200 artículos citando a Alamar Blue (AB) en estudios sobre cáncer⁶⁷. El compuesto activo del colorante es la resazurina, también conocido como diazo-resorcinol, es soluble en agua, estable en medios de cultivo, no es tóxico y es permeable a través de las membranas celulares. Por lo tanto, es posible su monitoreo en forma continua en las células de

cultivo. La resazurina es un colorante no fluorescente de color azul que se reduce irreversiblemente a resorufina, un compuesto de color rosado altamente fluorescente (Figura 10). La resazurina posee un potencial de oxidación-reducción de 380 mV a pH 7.0 a 25°C. Asimismo, se puede reducir por NADPH ($E_0 = 320$ mV), FADH ($E_0 = 220$ mV), FMNH ($E_0 = 290$ mV), así como por los citocromos ($E_0 = 290$ mV a 80 mV). Además otras reductasas mitocondriales que se encuentran en el citoplasma y la mitocondria, pueden también reducir al AB. Por lo tanto, su reducción significa una alteración del metabolismo celular. El cambio de estado a medida que AB acepta electrones (color azul no fluorescente al rosa fluorescente), permite su detección cuantitativa mediante lecturas colorimétricas y/o fluorescentes (siendo esta última la más sensible). Este método se encuentra estandarizado, por lo tanto si la detección se realiza mediante medidas de absorbancia espectrofotométrica las longitudes de onda que suelen ser seguidas son: 570 nm y 600 nm o 540 nm y 630 nm (dependiendo del material de la placa utilizada). Por otro lado las señales de fluorescencia son medidas utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm a 560 nm y de emisión a 590 nm.



Figura 10. Reducción de la sonda resazurina (AB) de color azul no fluorescente a resorufina; altamente fluorescente de color rosa.

3.8.1 Evaluación de citotoxicidad celular *in vitro*

La determinación de la citotoxicidad del sistema nano-transportador fue cuantificada mediante el ensayo de supervivencia celular Alamar Blue. Una placa transparente de 96 pocillos fue utilizada para realizar el ensayo (Figura 11). Alamar Blue (resazurina) (SKU-199303; Sigma Aldrich) fue directamente agregado al medio de cultivo, constituido por células Human Embryonic Kidney (HEK; 10^6 por pocillo) diluidas en DPBS. 100 μL de la mezcla fue depositada sobre los pocillos marcados con AB/medio.

El rango de concentraciones de nano-transportador estudiadas fue $1\mu\text{M} - 200\mu\text{M}$. También fue estudiado el dendrímero PAMAM-G4 sin conjugar ($200\mu\text{M}$). El control positivo (100% supervivencia celular) fue constituido por AB/medio más DPBS. Por otro lado, el control negativo (0% supervivencia) fue AB/medio más Tritón 0.1%. El medio de cultivo sin AB remanente fue utilizado como control externo. El ensayo fue realizado bajo una campana de flujo laminar para garantizar una zona de trabajo limpia y libre de partículas contaminantes que podrían interferir en los resultados. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados cada muestra fue replicada seis veces. Cumplido el tiempo de incubación (a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en una estufa de cultivo celular), la placa fue leída a una longitud de onda de excitación $\lambda_{\text{excitación}} = 544\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 590\text{ nm}$ de emisión en un lector NOVOstar. Todos los materiales utilizados en el ensayo se encontraban esterilizados. El ensayo fue realizado en el laboratorio de Neurofisiología molecular bajo la supervisión del Dr. Leonardo Guzmán.

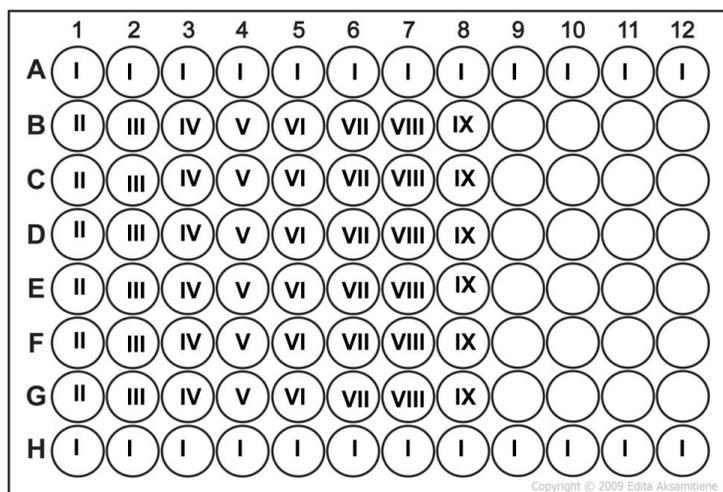


Figura 11. Representación del ensayo de AB en una placa de 96 pocillos. (I) 100 μL de medio HEC, (II) 90 μL de mezcla AB-1/2 (medio HEC más AB) y 10 μL DPBS, (III) 90 μL de mezcla AB-1/2 y 10 μL Tritón (0.1%), (IV) 90 μL de mezcla AB-1/2 y 10 μL nano-transportador (1 μM), (V) 90 μL de mezcla AB-1/2 y 10 μL nano-transportador (10 μM), (VI) 90 μL de mezcla AB-1/2 y 10 μL nano-transportador (50 μM), (VII) 90 μL de mezcla AB-1/2 y 10 μL nano-transportador (100 μM), (VIII) 90 μL de mezcla AB-1/2 y 10 μL nano-transportador (200 μM), (IX) 80 μL de mezcla AB-1/2 y 20 μL PAMAM-G4 (200 μM).

Capítulo 4. Resultados y Discusión



4.1 Screening virtual

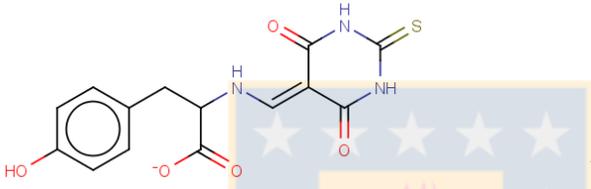
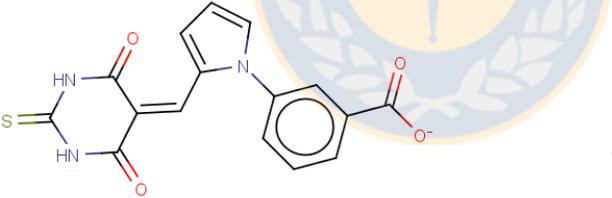
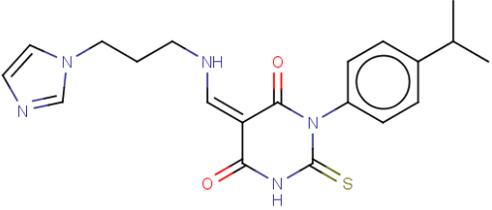
La metodología de Virtual Screening fue empleada para identificar nuevos compuestos con mayor afinidad por la proteína E-selectina que el ligando fisiológico (sLe^x). El estudio de Screening Virtual se basa en la realización de un “docking” masivo y automatizado, empleando el software AutoDock-Vina y asumiendo que los compuestos de la librería filtrada (126.261 compuestos) interaccionan en la misma región del sitio activo que el tetrasacárido sLe^x. El criterio usado para filtrar la librería se encuentra descrito en el apartado 3.1.2. En la práctica, del estudio de screening virtual se obtuvieron los valores de energía libre de interacción ($\Delta G_{\text{unión}}$; afinidad de un ligando por la proteína) y las constantes de disociación proteína-ligando (K_d) para cada estructura.

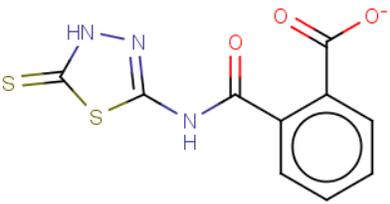
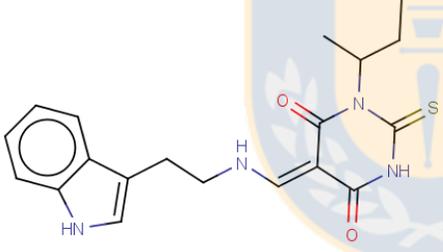
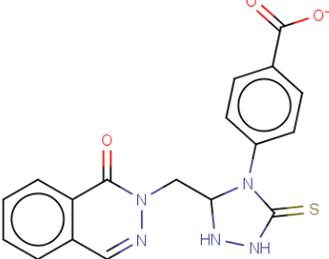
Los resultados obtenidos, posicionaron a la estructura de sLe^x dentro de los veinte mejores compuestos con una afinidad de $-6.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ y una constante de disociación de 17 μM . Para reducir la cantidad de ligandos, se estudió la asociación E-selectina-ligando mediante la utilización de otros programas de docking molecular. Los programas empleados fueron Auto-Dock4 y X-SCORE utilizando los mismos parámetros empleados en AutoDock-Vina. A partir de estos resultados se seleccionaron diez compuestos, los cuales presentaron el mayor valor de energía de unión E-selectina-ligando ($\Delta G_{\text{unión}}$). La Tabla 2 muestra la estructura, el nombre IUPAC y los valores de energía libre de unión proteína-ligando obtenidos para los diez compuestos seleccionados. Los resultados muestran que los compuestos candidatos presentan sólo un leve incremento en la energía de unión en comparación al ligando fisiológico (sLe^x) de la proteína E-selectina. No obstante, estos valores de afinidad E-selectina-ligando son alentadores, puesto que tal como se mencionó anteriormente, la asociación del complejo E-selectina-ligando se caracteriza por tener una baja afinidad de asociación⁶⁸.

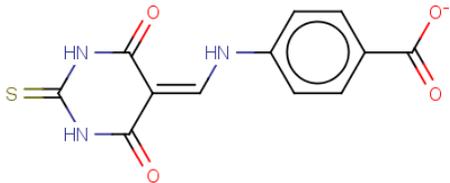
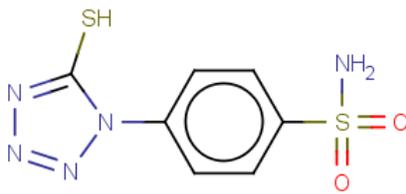
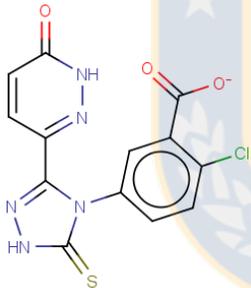
Es importante tener presente que la energía de unión proteína-ligando calculada por estos métodos *in silico* es aún aproximada y no representa la energía real de asociación. Existen otros métodos computacionales más robustos para el cálculo de energía libre proteína-ligando basados en dinámica molecular, los cuales incluyen efectos entrópicos, del solvente y

flexibilidad del receptor. A continuación se obtendrán los valores de energía libre de asociación proteína-ligando mediante la utilización de estas metodologías.

Tabla 2. Compuestos seleccionados desde Screening Virtual. Se muestran los resultados de $\Delta G_{\text{unión}}$ obtenidos por los softwares AutoDock-Vina, AutoDock4 y la función XSCORE en kcalmol^{-1} .

| N° | Estructura y nombre IUPAC | AutoDock-Vina | AutoDock4 | XSCORE |
|----|---|---------------|-----------|--------|
| 1 |  <p>2-[[[(4,6-dioxo-2-sulfanylidene-1,3-diazinan-5-ylidene)methyl]amino]-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate</p> | -7.4 | -5.0 | -7.7 |
| 2 |  <p>3-{2-[[[(4,6-dioxo-2-sulfanylidene-1,3-diazinan-5-ylidene)methyl]-1H-pyrrol-1-yl]benzoate</p> | -7.2 | -4.9 | -7.4 |
| 3 |  <p>(5Z)-5-([3-(1H-imidazol-1-yl)propyl]amino)methylidene)-1-[4-(propan-2-yl)phenyl]-2-sulfanylidene-1,3-diazinane-4,6-dione</p> | -7.0 | -4.3 | -6.8 |

| | | | | |
|---|--|------|------|------|
| 4 |  <p>2-[(5-sulfanylidene-4,5-dihydro-1,3,4-thiadiazol-2-yl)carbamoyl]benzoate</p> | -6.9 | 4.7 | -7.1 |
| 5 |  <p>2-[[[(4,6-dioxo-2-sulfanylidene-1,3-diazinan-5-ylidene)methyl]amino]-3-(1H-indol-3-yl)propanoate</p> | -6.8 | -4.0 | -6.9 |
| 6 |  <p>(5Z)-1-(butan-2-yl)-5-([2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino)methylidene)-2-sulfanylidene-1,3-diazinane-4,6-dione</p> | -6.8 | -4.4 | -6.8 |
| 7 |  <p>4-{3-[(1-oxo-1,2-dihydrophthalazin-2-yl)methyl]-5-sulfanylidene-1,2,4-triazolidin-4-yl}benzoate</p> | -6.7 | -4.9 | -7.7 |

| | | | | |
|----|--|------|------|------|
| 8 |  <p>4-[[[(4,6-dioxo-2-sulfanylidene-1,3-diazinan-5-ylidene)methyl]amino]benzoate</p> | -6.7 | -5.1 | -7.4 |
| 9 |  <p>4-(5-sulfanyl-1H-1,2,3,4-tetrazol-1-yl)benzene-1-sulfonamide</p> | -6.6 | -4.2 | -6.8 |
| 10 |  <p>2-chloro-5-[3-(6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)-5-sulfanylidene-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-4-yl]benzoate</p> | -6.6 | -4.1 | -6.5 |

4.2 Cálculos de Energía libre E-selectina-ligando

Actualmente existen diversas metodologías para la obtención de energía libre proteína-ligando, las cuales pueden dividirse en dos categorías; cálculos alquímicos que tratan el solvente en forma explícita (TI, BAR y MBAR), y métodos aproximados que combinan cálculos de mecánica molecular y modelos de solvatación continua (MM/PBSA y MM/GBSA). Diversas investigaciones han reportado que los métodos TI, BAR y MBAR son más rigurosos, costosos y poco eficientes para realizar el cálculo de energía libre, en cambio, MM/GBSA y MM/PBSA son una alternativa eficiente y económica computacionalmente.

Con el fin de determinar la supremacía de un método sobre otro al obtener la energía libre de unión, se utilizó un sistema de asociación modelo E-selectina-ligando para determinar la energía libre mediante los métodos: TI, BAR, MBAR, MM/PBSA y MM/GBSA. El modelo de asociación seleccionado consta de seis diferentes complejos E-selectina-oligosacárido (cinco oligosacáridos y sLe^x). Estos oligosacáridos fueron sintetizados y caracterizados mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) por el grupo de investigación de Ernst y colaboradores²⁴. En consecuencia, el método más eficiente será empleado posteriormente para estudiar la asociación entre los compuestos seleccionados desde el estudio de Screening virtual y la proteína E-selectina.

4.2.1 Determinación de la afinidad E-selectina-oligosacárido mediante TI, BAR, MBAR, MM/PBSA y MM/GBSA.

Para evaluar el desempeño de los diferentes métodos usualmente empleados para el cálculo de energía libre, a continuación se estudiará la energía libre de asociación E-selectina-oligosacárido mediante diferentes metodologías basadas en DM. Los oligosacáridos empleados son sLe^x y cinco derivados del mismo, los cuales presentan modificaciones estructurales sobre los anillos; N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetil-D-neuramínico (Neu5Ac) tal como se muestra en la figura 12.

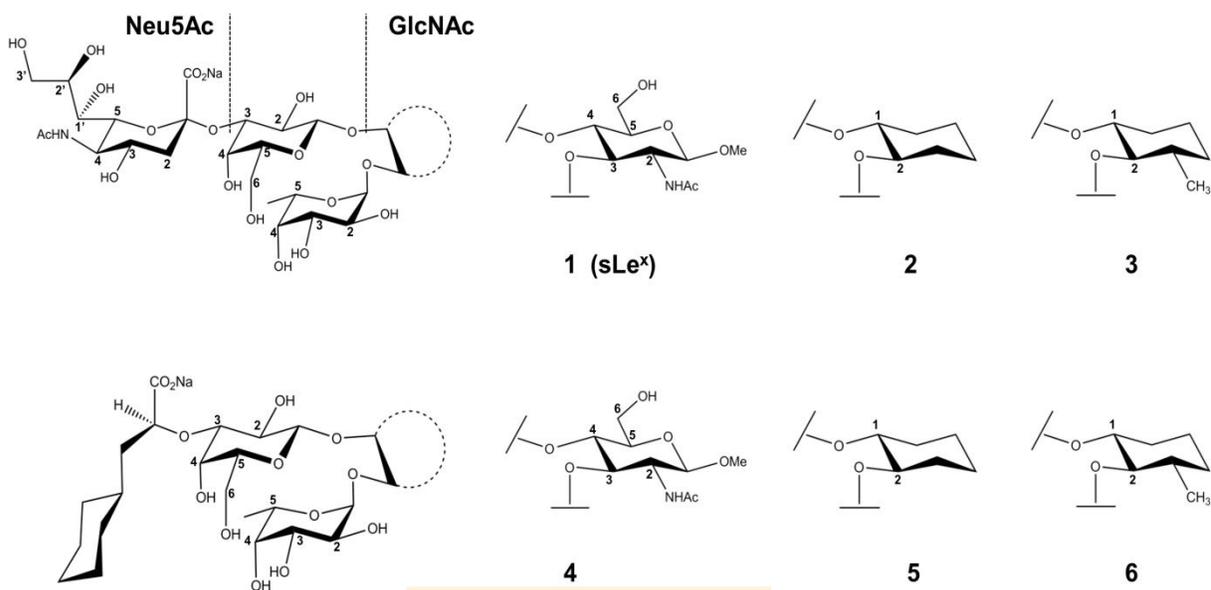


Figura 12. Estructuras de los oligosacáridos derivados de sLe^x considerados para realizar los cálculos de energía libre de unión relativa E-selectina-ligando. El oligosacárido 1 es el compuesto de referencia, el ligando fisiológico de la proteína E-selectina (sLe^x). El oligosacárido 2 fue obtenido mediante el remplazo del grupo GlcNAc por el grupo ciclohexano-1,2-diol. El oligosacárido 3 fue obtenido mediante el remplazo del grupo GlcNAc por el grupo 3-metilciclohexano-1,2-diol. El oligosacárido 4 contiene el grupo ácido láctico (S)-ciclohexil en remplazo del grupo Neu5Ac. Los oligosacáridos 5 y 6 presentan las mismas sustituciones que los oligosacáridos 2 y 3 pero conteniendo además el grupo ácido láctico (S)-ciclohexil en remplazo del grupo Neu5Ac.

Como se mencionó anteriormente, los métodos más rigurosos para la obtención de energías libres en sistemas biológicos bajo simulación de DM son los llamados métodos “alquímicos”, los cuales suponen la transformación de un sistema desde el estado inicial A al final B, implicando la creación y eliminación de átomos. Estos métodos (TI, BAR y MBAR) permiten obtener la energía libre relativa ($\Delta\Delta G$) y no la absoluta (ΔG) debido al gran costo

computacional que implica determinar la energía libre considerando factores como el solvente y cambios conformacionales del sistema.

Un desafío importante en el uso de los métodos alquímicos es asegurar que el camino utilizado para obtener el cambio de energía libre desde un estado inicial a uno final sea reversible. Esto es particularmente relevante al emplear estos métodos, ya que involucran la transmutación de un gran número de átomos. Por esta razón, se han obtenido los valores de energía libre relativa de todas las transmutaciones considerando el camino de ida (directo) y el de vuelta (inverso). Además de asegurar la reversibilidad en el proceso de transmutación, estudiar ambas direcciones en el cambio de energía libre también nos da indicio sobre la histéresis asociada al proceso. En la figura 13 se muestran los perfiles de energía para la transmutación entre el ligando 1 y 2, considerando el camino directo e inverso. Los perfiles de energía para las otras transmutaciones se encuentran en la sección 7.1 del capítulo 7.

De acuerdo a los perfiles de energía obtenidos de las transmutaciones estudiadas, se puede aseverar que las condiciones empleadas en el cálculo son apropiadas para obtener valores de energía libre de interacción E-selectina-oligosacárido. Sin embargo, es importante destacar que incluso si los resultados fueran convergentes y las transformaciones totalmente reversibles, los resultados tendrán errores inherentes asociados a los parámetros del campo de fuerza utilizado para construir los sistemas en estudio. No obstante, estos errores son equivalente para todos los métodos utilizados.

En la tabla 3 se muestran los valores de energía libre de unión relativa E-selectina-oligosacáridos para análogos de sLe^x , considerando al sLe^x como compuesto de referencia para las transmutaciones desde $1 \rightarrow 2$ a $1 \rightarrow 6$ ($\Delta G_{(sLe^x)} - \Delta G_{(análogo)}$), los valores de desviación estándar correspondientes, los valores experimentales de la energía libre de interacción y las diferencias absolutas entre los valores medidos y calculados mediante TI, BAR y MBAR. Para todas las transmutaciones realizadas se ha reportado el valor de energía libre relativa promedio entre la dirección directa e inversa. Asimismo, un valor de energía libre relativa de unión E-selectina-oligosacárido positivo indica una gran afinidad de la proteína a asociarse con el compuesto derivado que con sLe^x . Por otro lado, para estudiar el efecto de la adición del grupo metilo al C3 del grupo ciclohexano-1,2-diol se han estudiado dos transmutaciones adicionales

(2 → 3 y 5 → 6). Finalmente, se estudiaron también las transmutaciones 4 → 5 y 4 → 6 para estudiar el efecto en el remplazo del grupo GlcNAc por el grupo ciclohexano-1,2-diol y el grupo 3-metil-1,2-ciclohexano-1,2-diol tal como se observa en las transmutaciones 1 → 2 y 1 → 3.

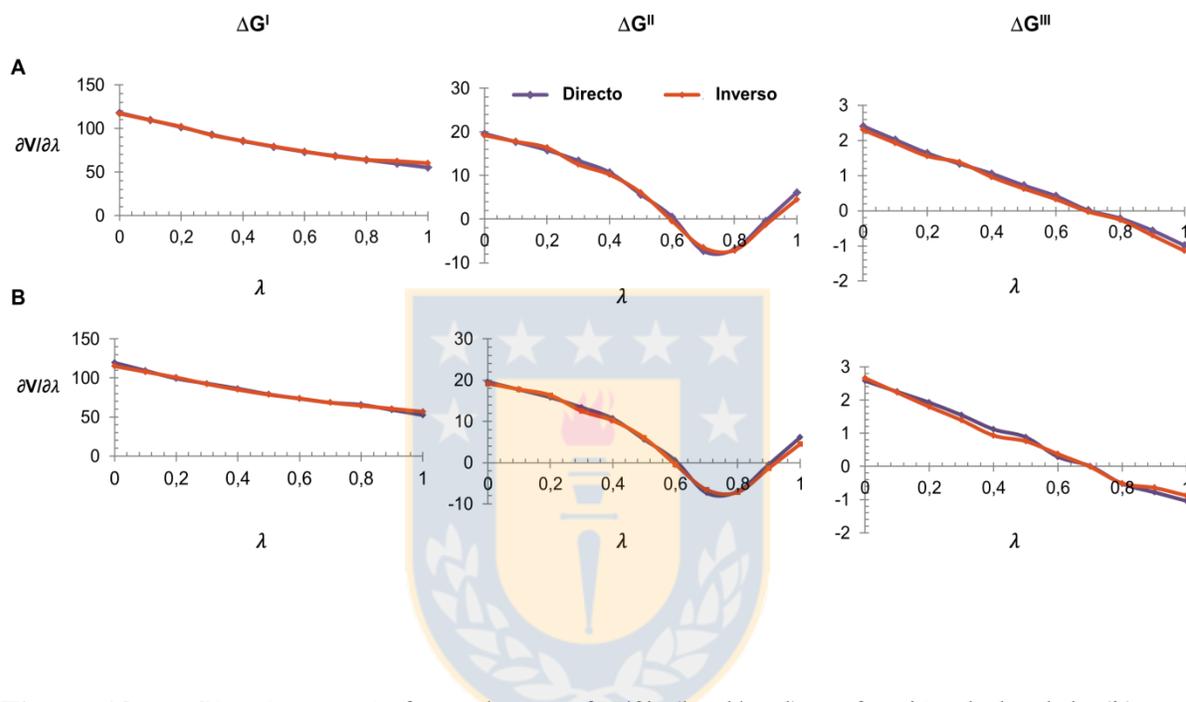


Figura 13. Perfiles de energía formados por $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de lambda (λ) para la transmutación 1 → 2 considerando el oligosacárido libre en solución acuosa (A) y asociado a la proteína (B) para el camino directo e inverso. Cada proceso de transmutación ha sido dividido en tres etapas (ver sección 4.4); en ΔG^I las cargas parciales atómicas de los átomos que desaparecen son removidas, en ΔG^{II} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que desaparecen son reemplazados a cero y los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que aparecen son creados, y finalmente en ΔG^{III} las cargas parciales atómicas de los átomos que aparecen son considerados en el cálculo.

Los valores de desviación estándar fueron estimados a través de análisis de datos por bloque para corregir los efectos de correlación entre los datos procesados. El análisis por

bloque consiste en dividir la lista de $\partial V/\partial\lambda$ obtenidos desde las dinámicas de DM en N_b bloques, a continuación se calcula el promedio de $\partial V/\partial\lambda$ para cada bloque y la desviación estándar de la media de estos bloques y finalmente se hace lo mismo con bloques de diferente tamaño hasta encontrar el bloque más grande con un mínimo error. En general, se elige el tamaño de bloque más grande posible para evitar la correlación entre bloques. Para cada lambda, el error estándar de la media es calculado tal como se muestra en la ecuación 11, donde $\partial V/\partial\lambda_i$ es la diferencia de energía libre del bloque i, $\partial V'/\partial\lambda$ es el promedio de la diferencia de energía libre y N_b es el número total de bloques.

$$\sigma_{dV/d\lambda}^{bloque} = \frac{1}{N_b} \sqrt{\sum_{i=1}^{N_b} (dV/d\lambda - dV/d\lambda_i)^2} \quad (11)$$

Los valores de energía libre relativa de interacción E-selectina-oligosacárido, muestran que los derivados de sLe^x tienen una mayor afinidad en comparación al compuesto de referencia (sLe^x), los cuales son consistentes con la evidencia experimental obtenidos por estudios de ITC. De acuerdo a estos resultados, el método de TI entrega la mejor correlación con los valores de energías libres de unión experimentales ($r^2=0.84$) en comparación a lo observado con el método BAR ($r^2=0.73$) y MBAR ($r^2=0.80$), tal como se muestra en la figura 14. El promedio de desviaciones estándar de todos los métodos es aproximadamente ± 0.2 kcal/mol y el promedio de los errores absolutos para las metodologías TI, BAR y MBAR son 0.33, 0.32 y 0.30 kcal/mol, lo cual puede ser considerado como un resultado excelente, considerando el número de átomos transmutados y la marcada diferencia estructural entre los oligosacáridos estudiados. Estos resultados indican que las condiciones utilizadas para realizar las DM y los parámetros del campo de fuerza empleados para construir los sistemas, son apropiados para determinar energías libres relativas de los sistemas aquí estudiados. Particularmente, el método de TI resulta ser el más adecuado para el estudio de complejos E-selectina-oligosacárido, ya que reproduce de buena manera diferencias muy sutiles en las

energías libres de unión con un error por debajo de 0.7 kcal/mol para el conjunto de oligosacáridos estudiado.

Tabla 3. Valores de energía libre relativa ($\Delta\Delta G_{\text{unión}}$) obtenidos para el estudio de nueve transmutaciones E-selectina-oligosacárido mediante las metodologías TI, BAR y MBAR. Los valores de desviación estándar se encuentran reportados junto a los valores calculados correspondientes a cada método. Los valores de energía libre experimentales fueron obtenidos desde medidas de ITC realizadas por la investigación de Ernst y colaboradores⁶⁸. Los errores absolutos reportados son la diferencia entre los valores de energía libre relativa experimental y los calculados. El error de los valores experimentales es alrededor de 0.2 kcal/mol. En la tabla, todos los valores son reportados en kcal/mol.

| Transmutación | Número de átomos transmutados | Energía libre de unión relativa ($\Delta\Delta G$) | | | | Error Absoluto | | |
|---------------|-------------------------------|--|------------|------------|--------------|----------------|------|------|
| | | Métodos Alquímicicos | | | Experimental | TI | BAR | MBAR |
| | | TI | BAR | MBAR | | | | |
| 1 → 2 | 13 | 0.53 ± 0.3 | 0.84 ± 0.2 | 0.91 ± 0.2 | 0.60 | 0.07 | 0.24 | 0.31 |
| 1 → 3 | 10 | 1.44 ± 0.1 | 1.76 ± 0.1 | 1.96 ± 0.1 | 1.86 | 0.42 | 0.10 | 0.10 |
| 1 → 4 | 12 | 0.62 ± 0.2 | 1.28 ± 0.1 | 1.16 ± 0.2 | 0.71 | 0.09 | 0.57 | 0.45 |
| 1 → 5 | 25 | 1.20 ± 0.3 | 1.34 ± 0.2 | 1.36 ± 0.3 | 1.60 | 0.40 | 0.26 | 0.24 |
| 1 → 6 | 22 | 1.69 ± 0.1 | 2.56 ± 0.3 | 2.65 ± 0.2 | 2.29 | 0.60 | 0.27 | 0.36 |
| 2 → 3 | 03 | 0.65 ± 0.1 | 0.74 ± 0.3 | 0.89 ± 0.1 | 1.26 | 0.65 | 0.52 | 0.37 |
| 5 → 6 | 03 | 0.37 ± 0.1 | 0.32 ± 0.1 | 0.35 ± 0.1 | 0.69 | 0.32 | 0.37 | 0.34 |
| 4 → 5 | 13 | 1.04 ± 0.2 | 0.53 ± 0.2 | 0.56 ± 0.1 | 0.88 | 0.16 | 0.35 | 0.32 |
| 4 → 6 | 10 | 1.28 ± 0.1 | 1.83 ± 0.1 | 1.79 ± 0.1 | 1.58 | 0.30 | 0.25 | 0.21 |

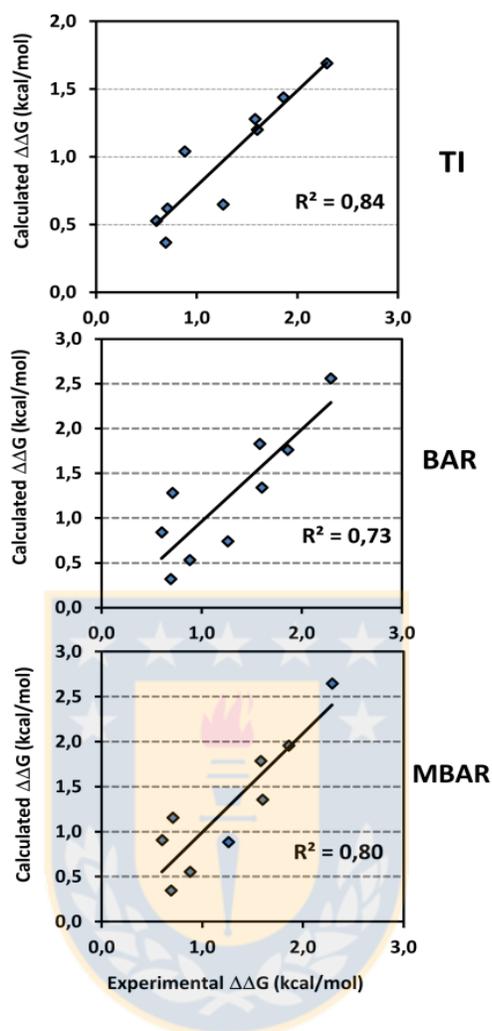


Figura 14. Correlación entre las energías libres de unión relativas ($\Delta\Delta G_{\text{unión}}$) experimentales y obtenidas mediante los métodos TI, BAR y MBAR en kcal mol^{-1} , para los complejos E-selectina-oligosacárido estudiados. La correlación se realizó empleando nueve valores $\Delta\Delta G_{\text{unión}}$, tal como se describen en la tabla 3.

Un segundo enfoque para realizar el cálculo de energía libre de asociación E-selectina-oligosacárido es mediante el uso de métodos menos rigurosos que combinan cálculos de mecánica molecular y modelos de solvatación continua como MM/PBSA y MM/GBSA. Para obtener estimaciones precisas de la energía libre de asociación estos métodos requieren trayectorias de DM equilibradas. Para determinar la energía de asociación de los seis

complejos E-selectina-oligosacárido fueron realizadas simulaciones de DM de 20ns utilizando el campo de fuerza GLYCAM y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2. La determinación de la evolución en el tiempo del sistema, representado por la desviación cuadrada media (RMSD) revela que los sistemas alcanzan el equilibrio después de los 10ns, tal como se muestra en la figura 15.

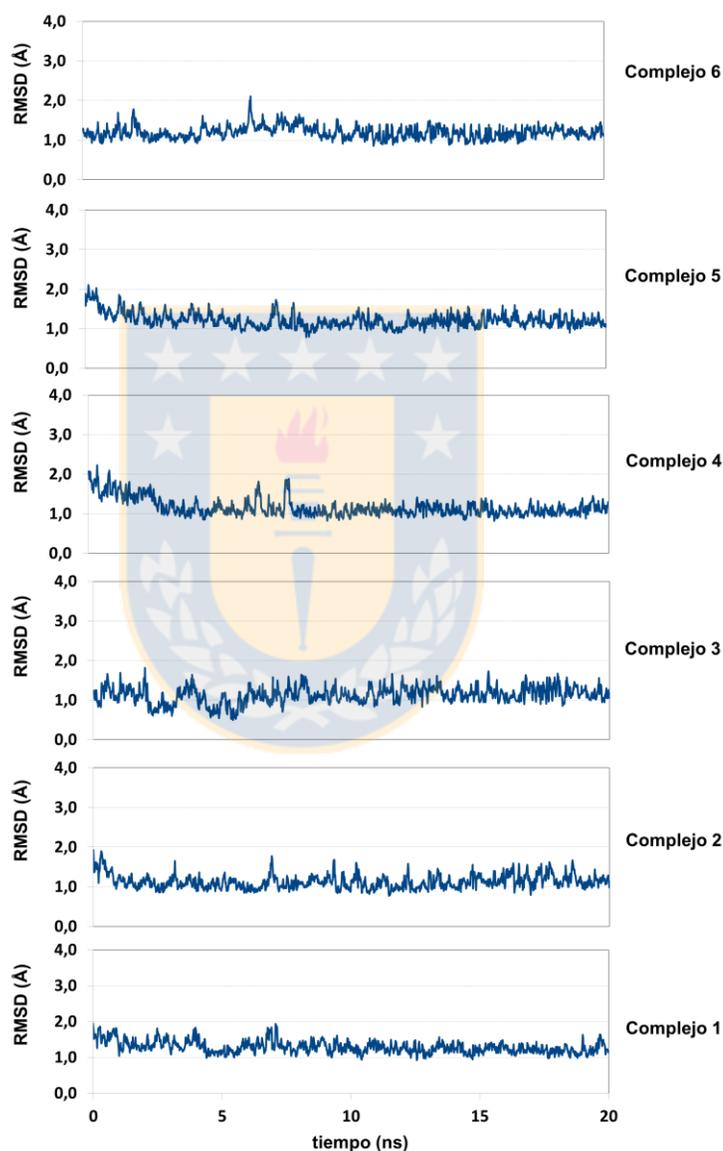


Figura 15. RMSDs para los complejos E-selectina-oligosacárido desde el complejo 1 (sLe^x) al 6 respectivamente. RMSDs fue obtenido considerando el esqueleto proteico y los átomos pesados de cada oligosacárido.

La tabla 4 resume los valores de energía libre relativa de asociación obtenidos por los métodos MM/PBSA y MM/GBSA para las nueve transmutaciones E-selectina-oligosacárido estudiadas. La correlación entre los valores calculados y los experimentales depende en gran medida del modelo de solvatación implícita empleado en los cálculos (PBSA o GBSA). En relación a estos resultados, el método MM/GBSA correlaciona mejor los resultados ($r^2 = 0.75$) que el método MM/PBSA ($r^2 = 0.73$) para los sistemas estudiados (Figura 16). El promedio de desviación estándar para estos métodos es aproximadamente ± 0.1 kcalmol⁻¹. El error absoluto promedio para la obtención de las energías libres relativas para MM/GBSA y MM/PBSA son 2.7 kcalmol⁻¹ y 0.3 kcalmol⁻¹, respectivamente. En consecuencia, estos resultados nos permiten aseverar que los métodos aproximados son capaces de reproducir los valores de energía de unión E-selectina-oligosacárido como los métodos más rigurosos.

Tabla 4. Valores de energía libre relativa ($\Delta\Delta G$) para las nueve transmutaciones E-selectina-oligosacárido obtenidas por MM/PBSA y MM/GBSA en kcalmol⁻¹. Los valores de energía libre experimentales fueron obtenidos desde medidas de ITC realizadas por la investigación de Ernst y colaboradores⁶⁸. Los errores absolutos reportados son la diferencia entre los valores de energía libre relativa experimental y los calculados. El error de los valores experimentales es alrededor de 0.2 kcal/mol. En la tabla, todos los valores son reportados en kcal/mol.

| Sistemas | Energía libre Relativa ($\Delta\Delta G$) | | | Error Absoluto | |
|----------|---|------------|--------------|----------------|---------|
| | MM/GBSA | MM/PBSA | Experimental | MM/GBSA | MM/PBSA |
| 1 → 2 | 0.05 ± 0.0 | 0.49 ± 0.1 | 0.60 | 0.55 | 0.11 |
| 1 → 3 | 5.02 ± 0.1 | 2.06 ± 0.1 | 1.86 | 3.16 | 0.20 |
| 1 → 4 | 4.96 ± 0.0 | 0.33 ± 0.0 | 0.71 | 4.25 | 0.38 |
| 1 → 5 | 1.54 ± 0.1 | 1.23 ± 0.2 | 1.60 | 0.06 | 0.37 |
| 1 → 6 | 3.88 ± 0.1 | 1.57 ± 0.2 | 2.29 | 1.59 | 0.72 |
| 2 → 3 | 2.34 ± 0.1 | 1.58 ± 0.0 | 1.26 | 1.08 | 0.32 |
| 5 → 6 | 3.80 ± 0.0 | 0.34 ± 0.0 | 0.69 | 3.11 | 0.35 |
| 4 → 5 | 5.34 ± 0.1 | 0.90 ± 0.2 | 0.88 | 4.46 | 0.02 |
| 4 → 6 | 7.68 ± 0.1 | 1.24 ± 0.2 | 1.58 | 6.10 | 0.34 |

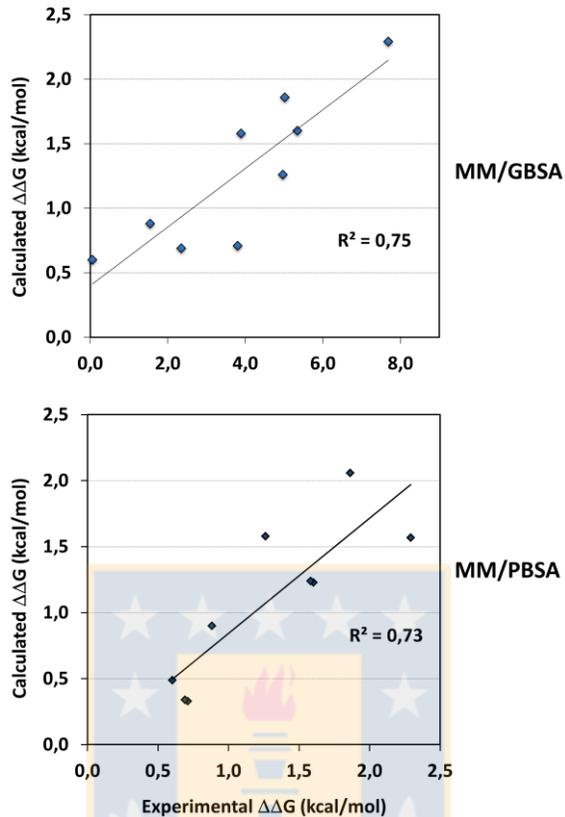


Figura 16. Correlación entre las energías libres de unión relativas ($\Delta\Delta G_{\text{unión}}$) experimentales y obtenidas mediante los métodos MM/GBSA y MM/PBSA en kcal mol^{-1} , para los complejos E-selectina-oligosacárido estudiados. La correlación se realizó empleando nueve valores $\Delta\Delta G_{\text{unión}}$, tal como se describen en la tabla 3.

4.2.2 Cálculos de energía de interacción mediante MM/PBSA y MMGBSA

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior, y debido al alto costo computacional que implica la obtención de energías libres relativas para complejos E-selectina-ligando por métodos como TI, BAR y MBAR, se han seleccionado los métodos MM/PBSA y MM/GBSA para determinar la energía libre de los compuestos seleccionados

desde el estudio de screening virtual. Como se mencionó anteriormente, estos métodos requieren trayectorias de DM equilibradas para obtener una estimación más precisa de las propiedades termodinámicas del sistema en estudio. De esta forma, para determinar la energía libre de asociación E-selectina-ligando se consideró un tiempo de simulación de 20 ns por cada complejo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. Para determinar la estabilidad en el tiempo de los complejos estudiados, fue obtenido el RMSD de cada sistema, tal como se muestra en el anexo 7.2. A partir del análisis del RMSD para cada complejo, se pudo inferir que luego de 10 ns de simulación los complejos estudiados alcanzan el equilibrio, manteniendo trayectorias estables para realizar los cálculos de energía libre. El cálculo de energía libre de unión mediante estos métodos aproximados se realizó considerando una constante dieléctrica de 80 para representar al solvente y una constante dieléctrica de 1 para representar el soluto. Los valores de energía libre de unión obtenidos para los complejos formados por los compuestos seleccionados desde el estudio de Screening virtual y la proteína E-selectina se encuentran reportados en la tabla 5.

Con el fin de comparar los resultados de energía libre de los compuestos seleccionados desde el estudio de screening virtual y el sLe^x, fue obtenido el valor de energía libre (ΔG) del tetrasacárido de Lewis desde el estudio anterior, el cual presenta valores de energía libre de interacción (ΔG) -13 ± 0.5 kcalmol⁻¹ y -12.8 ± 0.2 kcalmol⁻¹, obtenidos por MM/GBSA y MM/PBSA, respectivamente. De acuerdo a este valor, los resultados obtenidos para los sistemas E-selectina-ligando muestran que sólo los compuestos **1** y **6** podrían antagonizar la interacción entre la proteína E-selectina y sLe^x. Por otro lado los resultados muestran que el resto de los compuestos presentan valores de afinidad similares por la proteína E-selectina (~ 9.0 kcalmol⁻¹) a excepción de los compuestos 7 y 10, los cuales difieren en más de 9 kcalmol⁻¹ en comparación al ligando fisiológico. Basado en estos resultados, sólo el compuesto **1** y **6** puede ser considerado como potenciales inhibidores de la proteína E-selectina ya que los compuestos restantes exhiben una gran diferencia energética en comparación a sLe^x (≥ 4 kcal/mol). No obstante, es necesario tener en cuenta que estos métodos son aún aproximados y no representan el valor de la energía libre de unión real. Con el fin de obtener la energía libre de unión E-selectina-ligando experimental de los compuestos seleccionados desde Screening

virtual, fueron realizados estudios de espectroscopia de Fluorescencia, tal como se muestra en la sección 4.3.

Tabla 5. Energías libres de unión E-selectina-ligando obtenidas desde simulaciones de DM mediante los métodos MM/PBSA y MM/GBSA (kcal mol^{-1}). Las desviaciones estándar son reportadas junto a los valores correspondientes a cada método. El valor experimental para la asociación E-selectina-ligando fue obtenido desde experimentos de ITC realizados por Ernst y colaboradores.

| Complejos | Energía Libre E-selectina-ligando ($\Delta G \text{ kcal mol}^{-1}$) | |
|--------------------------|--|-----------------|
| | MM/GBSA | MM/PBSA |
| E-selectina-compuesto 1 | -15.2 \pm 0.5 | -14.5 \pm 0.4 |
| E-selectina-compuesto 2 | -9.1 \pm 0.2 | -8.6 \pm 0.6 |
| E-selectina-compuesto 3 | -8.0 \pm 0.1 | -8.1 \pm 0.2 |
| E-selectina-compuesto 4 | -9.3 \pm 0,7 | -9.1 \pm 0.3 |
| E-selectina-compuesto 5 | -8.2 \pm 0.3 | -7.0 \pm 0.3 |
| E-selectina-compuesto 6 | -16.4 \pm 0.8 | -14.2 \pm 0.4 |
| E-selectina-compuesto 7 | -4.6 \pm 0.1 | -3.1 \pm 0.2 |
| E-selectina-compuesto 8 | -9.6 \pm 0.9 | -9.3 \pm 0.6 |
| E-selectina-compuesto 9 | -12.8 \pm 1.2 | -10.3 \pm 0.5 |
| E-selectina-compuesto 10 | -4.0 \pm 0.6 | -4.8 \pm 0.4 |

4.3 Determinación experimental de K_d E-selectina-ligando

Con el fin de obtener los valores experimentales de energía de asociación proteína-ligando, los diez compuestos seleccionados fueron adquiridos comercialmente (Pharmeks, Moscú, Rusia; <http://pharmeks.com/>). Posteriormente, se realizaron estudios de afinidad mediante el uso de espectroscopia de fluorescencia. Sin embargo, durante el proceso de análisis sólo fue posible estudiar cuatro compuestos de los diez adquiridos comercialmente, debido a que seis compuestos resultaron tener baja o nula solubilidad en agua. La figura 17 muestra la estructura y los valores de afinidad obtenidos (AutoDock-Vina, MM/PBSA y MM/GBSA) para los compuestos estudiados experimentalmente.

La determinación experimental de las constantes de disociación (K_d) E-selectina-ligando para los cuatro compuestos seleccionados desde Screening virtual, se ha realizado mediante espectroscopia de fluorescencia. Las K_d para los compuestos fueron determinadas mediante un método indirecto midiendo el “quenching” de fluorescencia de cada compuesto en presencia de la proteína E-selectina. Los valores obtenidos fueron analizados utilizando la siguiente ecuación:

$$F_0 - F = \frac{(F_0 - F_\infty)L_0}{K_D + L_0} \quad (12)$$

donde; F y F_0 son las medidas en la intensidad de emisión de fluorescencia del ligando en solución en presencia y en ausencia de la proteína, respectivamente, F_∞ es la intensidad de fluorescencia cuando la proteína se encuentra saturada con el ligando, y L_0 la concentración total de ligando enlazado y no enlazado a la proteína. Esta ecuación considera estequiometrias proteína-ligando de 1:1. Las constantes de disociación (K_d) E-selectina-ligando fueron obtenidas directamente desde un ajuste de datos no lineal de mínimos cuadrados. La figura 18 muestra la gráfica de regresión no lineal para la determinación de K_d utilizando el “quenching” de fluorescencia a diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados desde

Screening virtual, en presencia de la proteína E-selectina. Las energías libres de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) y las constantes de disociación E-selectina-ligando para los cuatro compuestos y el sLe^x se encuentran en la tabla 6.

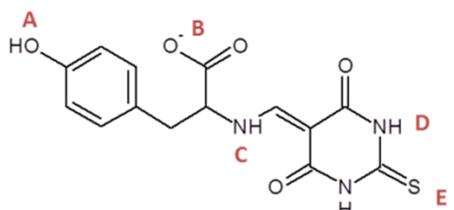
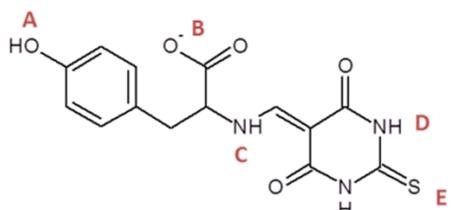
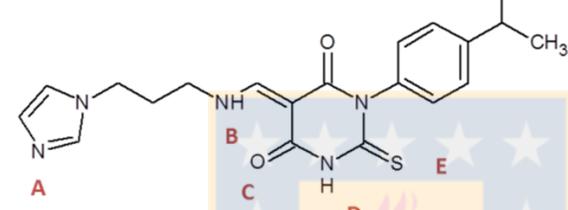
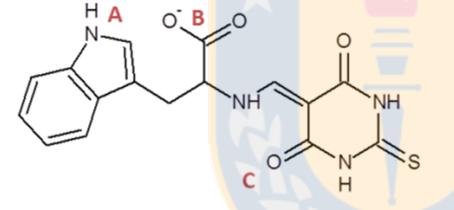
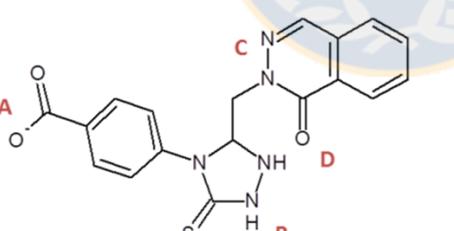
| |  | $\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal mol ⁻¹) | | |
|----------|---|---|--------------|--------------|
| | | AutoDock-Vina | MM/GBSA | MM//PBSA |
| 1 |  | -7.4 | -15.2 | -14.5 |
| 3 |  | -7.0 | -8.0 | -8.1 |
| 5 |  | -6.8 | -8.2 | -7.0 |
| 7 |  | -6.7 | -4.6 | -3.1 |

Figura 17. Energía de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) proteína-ligando para los compuestos seleccionados desde screening virtual.

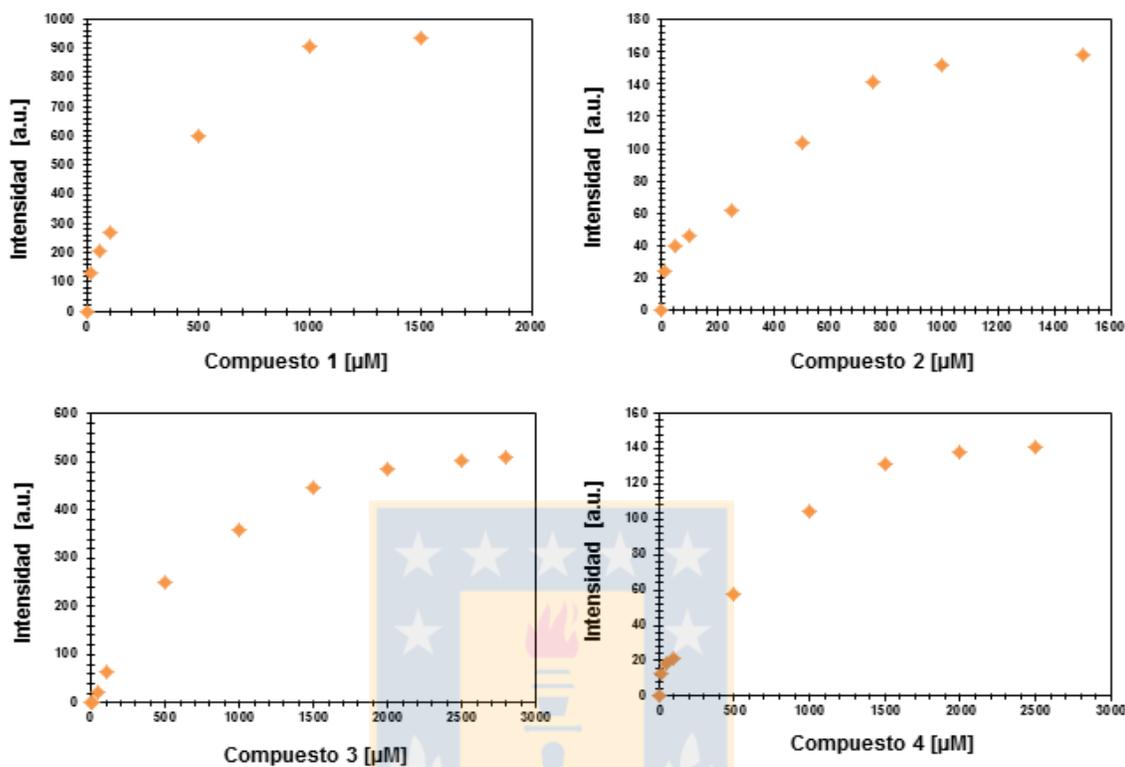


Figura 18. Determinación de K_d para la asociación E-selectina-ligando mediante la medición del “quenching” de fluorescencia de los compuestos seleccionados a pH 7.4. [E-selectin] = 1.6 μM ; [compuesto-1] = 0 - 3 mM; [compuesto-2] = 0 - 1.5 mM; [compuesto-3] = 0 - 3 mM; [compuesto-4] = 0 - 2.5 mM.

El valor de K_d para sLe^x reportado por otras investigaciones fluctúa entre 878 μM - 2 mM^{69,70}. Basándose en estos resultados, se puede inferir que los compuestos seleccionados pueden ser propuestos como inhibidores candidatos de la proteína E-selectina ya que presentan afinidades muy similares o mayores que la afinidad del ligando fisiológico, experimentalmente reportado por Ernst y colaboradores ($\Delta G_{\text{unión}} -4.2 \pm 0.1$; $K_d \sim 878 \pm 93$)²⁴.

Por otro lado, la correlación de los valores de energía libre obtenidos con las diversas metodologías computacionales establece que el método de screening virtual AutoDock-Vina permite reproducir de mejor manera los valores de energía libre E-selectina-ligando obtenidos desde estudios experimentales ($r^2 = 0.84$) en comparación a los métodos MM/PBSA y MM/GBSA, los cuales presentan valores de correlación de 0.76 y 0.64, respectivamente. Si bien los resultados obtenidos por AutoDock-Vina correlacionan los valores con mayor exactitud que los métodos MM/GBSA y MM/PBSA, es necesario la utilización de otras metodologías para determinar la afinidad de un ligando por una diana cualquiera. De esta forma, con este resultado sólo aseveramos que AutoDock-Vina es un excelente programa para realizar la búsqueda masiva de compuestos y, a pesar de las restricciones conformacionales de la proteína, el algoritmo de búsqueda que utiliza para muestrear exhaustivamente todos los modos posibles de unión entre el ligando y el receptor es muy preciso.

En conclusión, de acuerdo a los resultados computacionales y experimentales obtenidos, se sugiere que el compuesto **1** ($K_d = 333 \mu\text{M}$) podría ser considerado como potencial inhibidor de la proteína E-selectina y candidato a ser utilizado para dirigir los sistemas nano-transportadores de fármacos hacia esta diana terapéutica.

Tabla 6. Energías libres de unión (kcal mol^{-1}) y constante de disociación (μM) E-selectina-ligando experimental, obtenida por espectroscopia de fluorescencia.

| Complejos | Energía libre de unión E-selectina-ligando ($\Delta G_{\text{unión}}$) | K_d (μM) |
|-------------------------|--|-------------------------|
| E-selectina-compuesto 1 | -4.7 ± 0.2 | 333 ± 110 |
| E-selectina-compuesto 2 | -4.6 ± 0.2 | 429 ± 140 |
| E-selectina-compuesto 3 | -4.2 ± 0.1 | 876 ± 69 |
| E-selectina-compuesto 4 | -4.1 ± 0.2 | 1012 ± 257 |

4.4 Cálculos de STD-RMN

Los experimentos de STD-RMN permiten estudiar las interacciones receptor-ligando en solución. Brevemente, en un experimento de STD-RMN la magnetización de los protones del receptor es específicamente transferida a los protones del ligando durante el estado enlazado y, si se cumplen las condiciones de intercambio químico rápido, esta magnetización transferida es recolectada en el estado libre y observada como un diferencial de intensidad ($I_0 - I_{sat}$). Se espera que aquellos protones del ligando en estrecho contacto con el receptor en el estado enlazado exhiban intensidades significativas, de modo que desde una cuantificación de la distribución de la intensidad, es posible obtener información sobre el epítipo de unión del ligando. De esta manera, STD-RMN se ha utilizado para identificar los protones del ligando que facilitan la unión con el sitio activo de la proteína E-selectina mediante la obtención de los factores de amplificación (STD-AF). Para un cierto tiempo de saturación, los STD-AF representan el número promedio de moléculas de ligando saturados por molécula de receptor y son obtenidos mediante la multiplicación del efecto STD relativo de un hidrógeno dado (I_{STD}/I_0) a una determinada relación molar de ligando en exceso en relación a la proteína (L_T/P), tal como se muestra en la ecuación 13.

$$STD - AF = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \frac{L_T}{P} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{L_T}{P} \quad (13)$$

La figura 19 muestra el espectro RMN 1H de referencia para el compuesto **1** con la proteína E-selectina en un exceso de 762 veces de ligando (A) y el espectro STD-RMN correspondiente (B). El espectro STD muestra las señales de los hidrógenos aromáticos, demostrando que el compuesto **1** se enlaza a la proteína E-selectina. Las señales de los hidrógenos a campo alto, cercanos a las señales de los hidrógenos de la proteína, no pueden ser identificados desde el espectro STD-RMN debido a que la proteína contiene una alta concentración de azúcar debido a su formulación que impide su caracterización (5% manitol y 5% trealosa). De acuerdo al análisis de epítipo para el compuesto **1**, fue asignado un valor de

100% al hidrógeno con la mayor intensidad relativa de STD, y las otras señales fueron calculadas considerando la intensidad de éste hidrógeno como referencia.

La figura 20 muestra el grado relativo de saturación para los hidrógenos aromáticos H_a y H_b y el hidrógeno H_f de acuerdo a la gráfica STD-AF versus el tiempo de saturación para un exceso de ligando de 762:1 en relación a la concentración de proteína. De acuerdo a esta gráfica, el 100% de intensidad de STD fue asignada a los hidrógenos aromáticos H_a , a continuación, considerando al hidrógeno H_a como referencia, se asignó un 81% de intensidad STD al hidrógeno H_f y finalmente un 77% de intensidad de STD a los hidrógenos aromáticos H_b . Por lo tanto, se observa claramente que los hidrógenos H_a establecen un mayor contacto con la proteína que el resto de los hidrógenos del compuesto y evidencia que el anillo aromático es importante para la interacción con el sitio activo de la E-selectina.

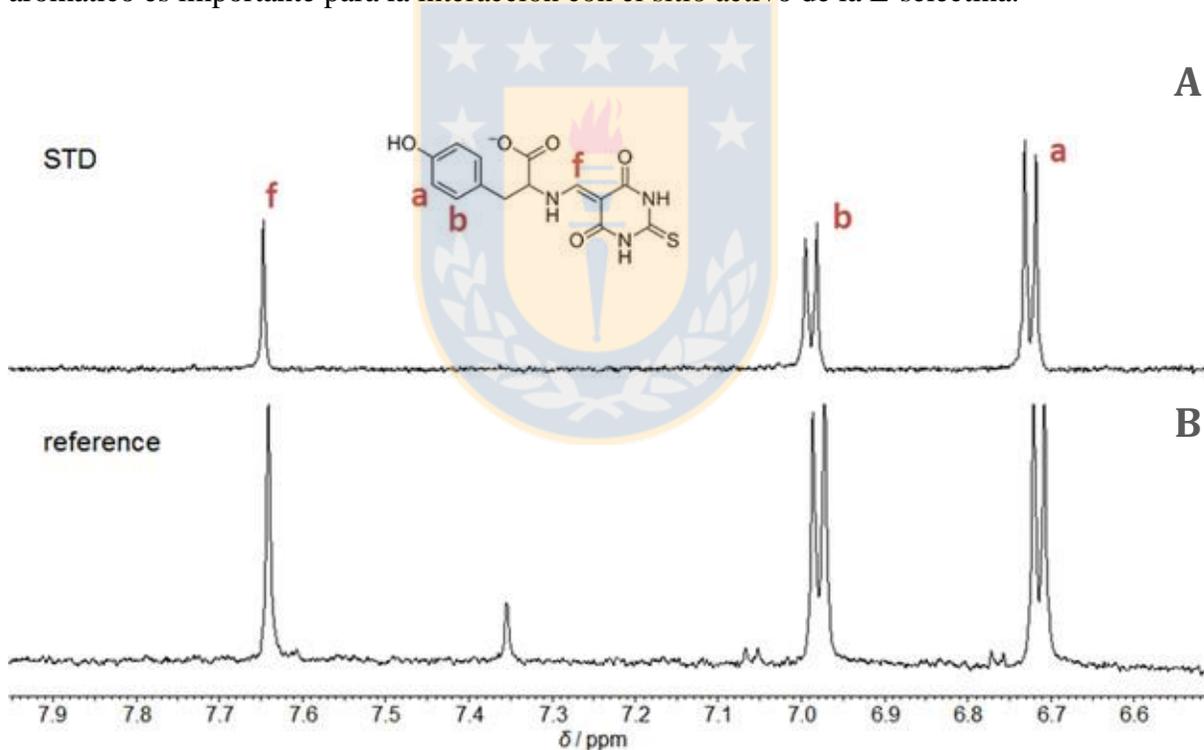


Figura 19. Espectro STD-RMN para el compuesto 1 con la proteína E-selectina: (A) espectro RMN ^1H de referencia del compuesto 1 con la proteína E-selectina y (B) espectro STD-RMN de la solución del compuesto 1 (3.2 mM) con la proteína E-selectina (50 μM) a un tiempo de saturación de 2.0 s.

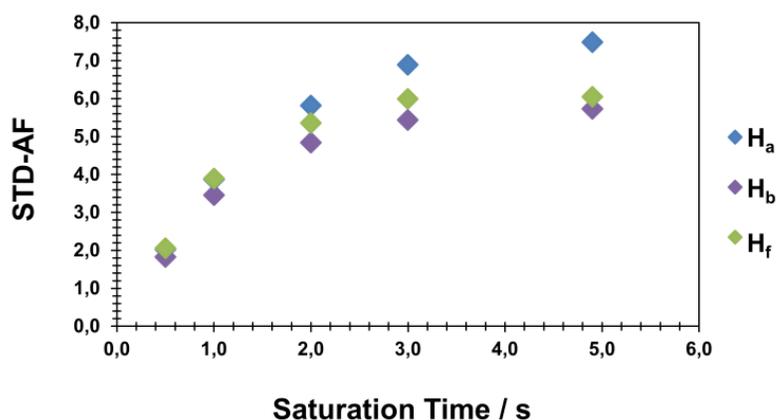


Figura 20. Gráfica STD-AF versus el tiempo de saturación (0.5s – 4.9s) para la obtención del grado de saturación relativo de los hidrógenos H_a, H_b y H_f del compuesto **1**. Los experimentos se realizaron considerando un exceso de ligando con respecto a la concentración de proteína de 762:1.

4.5 Cálculos teóricos STD-RMN mediante CORCEMA-ST

El software CORCEMA-ST fue utilizado para validar los resultados obtenidos desde los experimentos de STD-RMN y además para postular un modelo de asociación entre el compuesto **1** y la proteína E-selectina. Para los cálculos con el software CORCEMA-ST, fueron consideradas 100 estructuras, extraídas desde la trayectoria equilibrada de DM, para emplearlas como punto de partida en los cálculos.

La figura 21 muestra las curvas teóricas normalizadas con las intensidades STD-AF obtenidas por el software CORCEMA-ST para cada hidrógeno del compuesto **1**. Los resultados de CORCEMA-ST representan el promedio de intensidades de STD a un tiempo de saturación dado. Conforme a los resultados experimentales obtenidos previamente, los resultados teóricos indican que los hidrógenos H_a y H_b del anillo aromático del compuesto **1** están en íntimo contacto con el sitio activo de la proteína E-selectina. Por consiguiente, los hidrógenos aromáticos H_a fueron asignados con un 100% de intensidad de STD y las

intensidades de los hidrógenos restantes se asignaron teniendo en cuenta esta señal como referencia. Seguidamente, los hidrógenos aromáticos H_b fueron asignados con un 77% de intensidad de STD, resultado que comprueba que el anillo aromático permanece en constante contacto con el sitio activo de la proteína E-selectina. Además, los resultados muestran que el hidrógeno H_f presenta una intensidad de 47% y los hidrógenos $H_{c,d}$ y H_e 28% y 23%, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los obtenidos desde el estudio de DM, en donde se observa que los hidrógenos $H_{c,d}$ y H_e no están en contacto directo con la proteína. Por lo tanto, no se espera que esta parte del compuesto interactúe fuertemente a la proteína, lo cual se ve reflejado en los reducidos porcentajes de STD. Con el fin de obtener la correlación entre los valores de intensidad de STD teóricos y experimentales se calculó el factor R_{NOE} de acuerdo a la ecuación 5. Este parámetro fue calculado considerando sólo los hidrógenos H_a , H_b y H_f a un tiempo de saturación de 2s, debido a que son los únicos valores experimentales disponibles. El factor R_{NOE} obtenido (0.57) demuestra que existe una buena relación entre los valores experimentales y los calculados. Un valor de R_{NOE} 0.5 es considerado aceptable en literatura⁷¹. No obstante, para una correcta interpretación del factor R_{NOE} es necesario considerar todos los hidrógenos del compuesto, lo cual en este caso no fue posible.

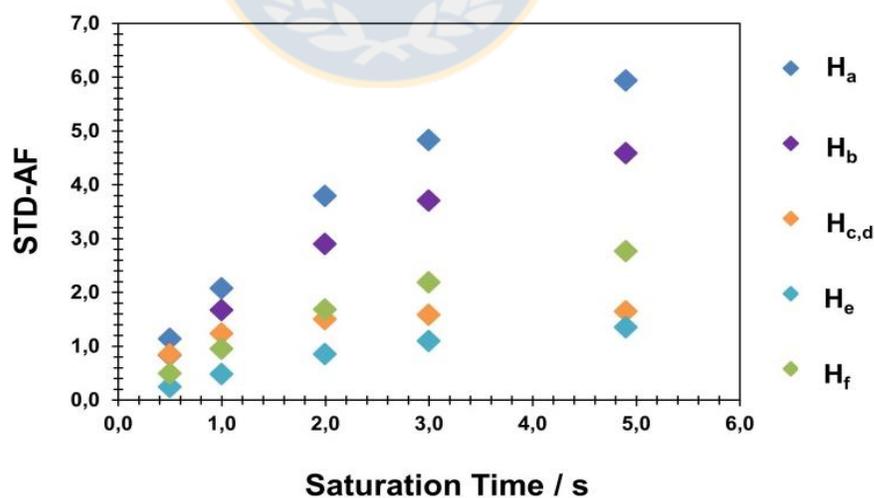


Figura 21. Gráfica STD-AF versus el tiempo de saturación (0.5s – 4.9s) teórica para la obtención del grado de saturación relativo de los del compuesto 1.

4.6 Estudio de asociación E-selectina-ligando mediante DM.

Con el fin de estudiar las principales interacciones entre la proteína E-selectina y los cuatro compuestos seleccionados desde el estudio de screening virtual (Figura 17) se realizaron simulaciones de DM. Las conformaciones iniciales (a $t = 0$ ns) de las estructuras de los complejos E-selectina-ligando fueron obtenidas desde el estudio de screening virtual. Las simulaciones de DM fueron llevadas a cabo por un tiempo de 20 ns, tiempo en el cual se identificaron los principales modos de interacción para cada compuesto con los residuos del sitio activo de la proteína E-selectina. Para estudiar el modelo de asociación de cada complejo se empleó el HBonds plugin implementada en el software VMD el cuál puede ser descargado desde el siguiente link: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>. El criterio empleado para realizar el análisis fue utilizar una distancia máxima de 3.0 Angstroms entre dador y aceptor de enlace de hidrógeno, considerando el ángulo D-H-A por defecto en el plugin 20° (20° menos que el ángulo cutoff que es 180°). Con respecto al número de estructuras estudiadas, se utilizaron los últimos 200 estructuras de cada DM.

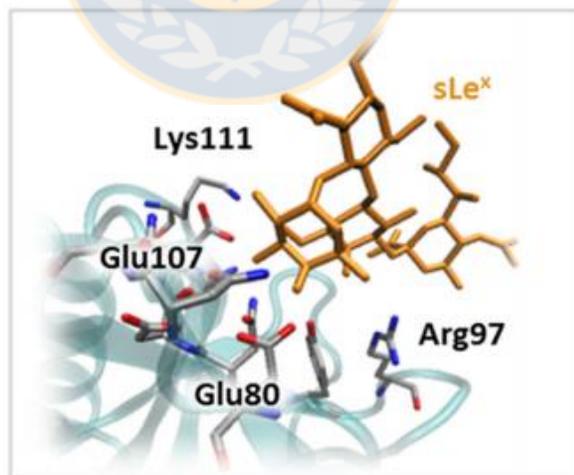


Figura 22. Estructura representativa del complejo E-selectina-sLe^x extraída desde la DM.

En la figura 22, se observa que el tetrasacárido sLe^x establece una red de enlaces de hidrógeno estables con los residuos del sitio activo de la proteína E-selectina Tyr94, Lys111, Asn105 y Glu107 con una permanencia de 100% a lo largo de toda la dinámica. Además el anillo de fucosa también estabiliza a la formación del complejo a través de seis enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y los residuos Asn105, Asn83, Asn82, Glu80 y Asp106. Para finalizar, el grupo ácido siálico (Neu5Ac) interacciona con los residuos de las cadenas principales Arg97, Lys111 y Lys113 a través de interacciones electrostáticas con ~ 90% de permanencia durante la simulación. El análisis detallado de permanencia de enlaces de hidrógeno a lo largo de la DM para el complejo E-selectina-sLe^x se encuentra especificado en la tabla 7. El modelo de interacción del complejo E-selectina-sLe^x analizado por simulaciones de DM demuestra que el oligosacárido sLe^x presenta los patrones de interacción similares a los que han sido reportados por otras investigaciones⁷².

Tabla 7. Permanencia de enlaces de hidrógeno (%) entre E-selectina y sLe^x a lo largo de la simulación de DM y distancia de enlace promedio. Valores extraídos desde los últimos 10 ns de la trayectoria de DM.

| Residuos E-selectina | sLe ^x | Permanencia (%) | Distancia promedio (Å) |
|----------------------|------------------|-----------------|------------------------|
| Glu80 | Fuc-4-OH | 100 | 1.68 |
| Asn82 | Fuc-4-OH | 100 | 2.39 |
| Asn83 | Fuc-3-OH | 100 | 2.49 |
| | Fuc-2-OH | 95 | 2.18 |
| Tyr94 | Gal-4-OH | 72 | 3.21 |
| Asn105 | Gal-6-OH | 100 | 2.65 |
| | Fuc-3-OH | 83 | 3.83 |
| Asp106 | Fuc-3-OH | 100 | 3.00 |
| Glu107 | Gal-6-OH | 94 | 2.50 |
| Lys111 | Gal-6-OH | 93 | 3.26 |

El análisis de asociación E-selectina-compuesto **1** mediante DM se muestra en la tabla 8. La asociación entre este compuesto con la proteína E-selectina es principalmente mediante la formación de diversos enlaces de hidrógeno (Figura 23) envolviendo; la cadena lateral de Arg97 y el grupo hidroxilo del anillo fenilo (A) con un porcentaje de permanencia de 100%, los residuos Tyr94 y Asn95 y el grupo amino (C) con permanencias de 65% y 78%, respectivamente, la cadena lateral de Lys113 y el átomo de azufre (E) con una permanencia de 86 %, los residuos Lys111 y Glu107 y el grupo amino del anillo 2-sulfanylidene-1,3-diazinane-4,6-dione (D) con permanencias de 77% y 80% respectivamente, los residuos Asn105 y Asn82 y el átomo de oxígeno del grupo carboxilato (B) con permanencias de 82% y 25%, respectivamente.

El compuesto **1** también es estabilizado por cuatro interacciones electrostáticas entre el grupo carboxilato y los residuos Arg97, Lys111, Lys113 y Arg108 con permanencia de 100% cada una, a lo largo de toda la DM.

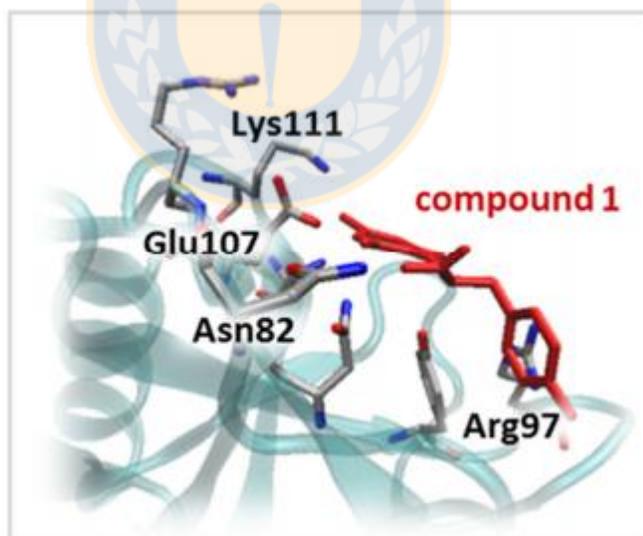


Figura 23. Estructura representativa del complejo E-selectina-compuesto 1 extraída desde la DM.

La interacción del compuesto **1** y la proteína E-selectina fue estudiada mediante STD-RMN, tal como se discute en la sección anterior. Los resultados de este estudio concuerdan con el modelo de asociación obtenido por DM, en el cual se corrobora que el grupo fenilo permanece en contacto directo con el sitio activo de la proteína E-selectina al momento de la asociación. Este resultado demuestra que la metodología empleada para parametrizar las moléculas de ligando y el campo de fuerza utilizado para modelar la proteína y aguas del sistema permite describir las interacciones intermoleculares que dan paso a la formación del complejo de asociación molecular E-selectina-ligando.

Tabla 8. Permanencia de enlaces de hidrógeno (%) entre E-selectina y compuesto 1 a lo largo de la simulación de DM y distancia de enlace promedio. Valores extraídos desde los últimos 10 ns de la trayectoria de DM.

| Residuos E-selectina | Compuesto 1 | Permanencia (%) | Distancia promedio (Å) |
|----------------------|-------------|-----------------|------------------------|
| Asn82 | C=O (B) | 25 | 4.52 |
| Tyr94 | NH (C) | 65 | 3.32 |
| Arg97 | OH (A) | 100 | 2.77 |
| Asn105 | C=O (B) | 82 | 3.28 |
| | NH (C) | 78 | 3.76 |
| Glu107 | NH (D) | 80 | 3.42 |
| Lys111 | NH (D) | 77 | 3.86 |
| Lys113 | C=S (E) | 86 | 3.11 |

Tabla 9. Permanencia de enlaces de hidrógeno (%) entre E-selectina y compuesto 2 a lo largo de la simulación de DM y distancia de enlace promedio. Valores extraídos desde los últimos 10 ns de la trayectoria de DM.

| Residuos E-selectina | Compuesto 2 | Permanencia (%) | Distancia promedio (Å) |
|----------------------|-------------|-----------------|------------------------|
| Glu80 | NH (B) | 60 | 3.92 |
| Asn82 | C=O (C) | 81 | 3.34 |
| Asn83 | C=O (C) | 91 | 3.16 |
| | NH (D) | 67 | 3.81 |
| Arg84 | C=S (E) | 36 | 4.23 |
| Arg97 | N (A) | 80 | 3.32 |
| Asn105 | NH (B) | 39 | 4.12 |
| Asp106 | NH (B) | 87 | 3.34 |

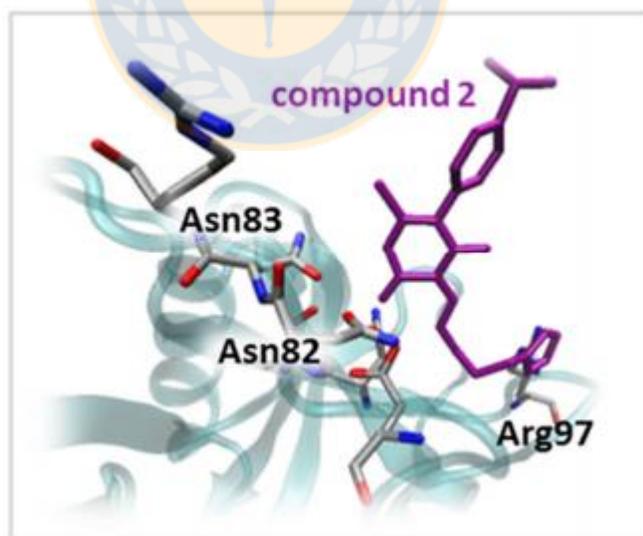


Figura 24. Estructura representativa del complejo E-selectina-compuesto 2 extraída desde la DM.

La figura 24 muestra una representación del complejo formado por la proteína E-selectina y el compuesto **2**. Tal como se describe en la tabla 5, la formación de este complejo se asocia a la formación de seis enlaces de hidrógeno formados entre la cadena lateral del residuo Arg97 y el átomo de nitrógeno del anillo imidazol (A) con un porcentaje de permanencia de 80%, la cadena lateral del residuo Arg84 y el átomo de azufre del anillo 2-sulfanylidene-1,3-diazinane-4,6-dione (E) con 36% de permanencia, los residuos Asn105, Glu80 y Asp101 y el grupo amida (B) con permanencias de 39%, 60% y 8 %, respectivamente, los residuos Asn83 y Asn82 y el átomo de oxígeno del anillo 2-sulfanylidene-1,3-diazinane-4,6-dione (C) con permanencias de 91% y 81%, respectivamente, y finalmente el átomo de nitrógeno del anillo 2-sulfanylidene-1,3-diazinane-4,6-dione (D) y la cadena lateral del residuo Asn83 con un porcentaje de permanencia de 67%.

La figura 25 muestra una representación del complejo formado por la proteína E-selectina y el compuesto **3**. Este compuesto establece seis enlaces de hidrógeno con diferentes residuos del sitio activo de la proteína E-selectina, responsables de la estabilidad del complejo (tabla 10). La formación de enlaces de hidrógeno involucra; a los residuos Arg97 y Lys99 y el grupo carboxilato (B) con un 100% y 91% de permanencia a lo largo de la DM respectivamente, el residuo Tyr94 y el átomo de hidrógeno del anillo indol (A) con un 62% de permanencia, los residuos Lys113 y Lys111 con el átomo de oxígeno del anillo 2-sulfanylidene-1,3-diazinane-4,6-dione (C) con porcentajes de permanencias de 80% y 82% respectivamente, y finalmente entre el átomo de nitrógeno del anillo indol y la cadena lateral del residuo Glu107 con un 54% de permanencia. Al igual que el compuesto **1** este compuesto establece cinco interacciones electrostáticas con los residuos del sitio activo de la E-selectina; Arg97, Lys99, Lys111, Lys113 y Arg108 con permanencias de 100% a durante la DM.

Tabla 10. Permanencia de enlaces de hidrógeno (%) entre E-selectina y compuesto 3 a lo largo de la simulación de DM y distancia de enlace promedio. Valores extraídos desde los últimos 10 ns de la trayectoria de DM.

| Residuos E-selectina | Compuesto 3 | Permanencia (%) | Distancia promedio (Å) |
|----------------------|-------------|-----------------|------------------------|
| Tyr94 | NH (A) | 62 | 4.15 |
| Arg97 | C=O (B) | 100 | 2.28 |
| Lys99 | C=O (B) | 91 | 3.16 |
| Glu107 | NH (A) | 54 | 4.21 |
| Lys111 | C=O (C) | 82 | 3.20 |
| Lys113 | C=O (C) | 80 | 3.24 |

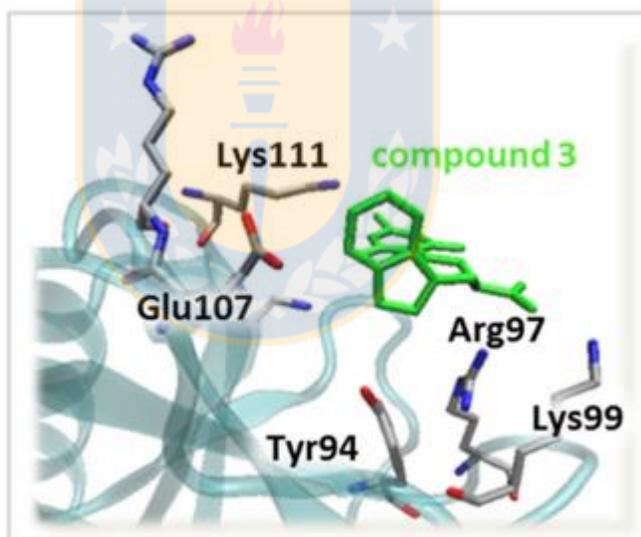


Figura 25. Estructura representativa del complejo E-selectina-compuesto 3 extraída desde la DM.

La figura 26 muestra que el complejo E-selectina-compuesto 4 es estabilizado por cuatro enlaces de hidrógeno, entre; los residuos Asp100 y Lys99 y el átomo de nitrógeno del

grupo 1,2,4-triazolidine-3-thione con permanencias de 91% y 100% durante la DM respectivamente, la cadena lateral del residuo de Arg97 y el átomo de nitrógeno del anillo de dihydrophthalazin con 75% de permanencia y el grupo amina del 1,2,4-triazolidine-3-thione y el residuo Val101 con 81% de permanencia (Tabla 11). El complejo también es estabilizado por dos interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de los residuos Arg97 y Lys99 y el grupo carboxilato del grupo benzoato, ambas con 100% de permanencia a lo largo de la trayectoria de la DM.

Tabla 11. Permanencia de enlaces de hidrógeno (%) entre E-selectina y compuesto 4 a lo largo de la simulación de DM y distancia de enlace promedio. Valores extraídos desde los últimos 10 ns de la trayectoria de DM.

| Residuos E-selectina | Compuesto 4 | Permanencia (%) | Distancia promedio (Å) |
|----------------------|-------------|-----------------|------------------------|
| Arg97 | N (C) | 75 | 3.33 |
| Lys99 | C=O (D) | 100 | 2.63 |
| Asp100 | NH (B) | 91 | 3.11 |
| Val101 | NH (B) | 81 | 3.29 |

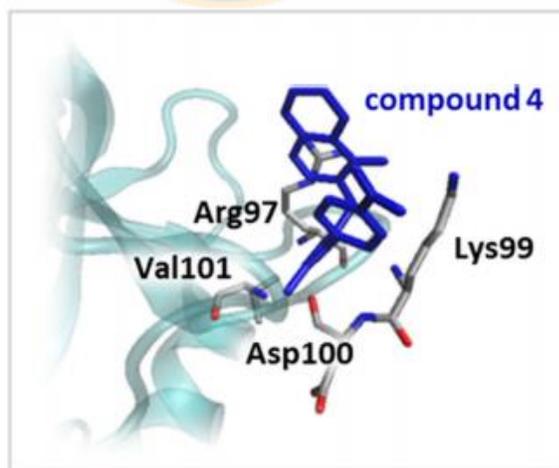


Figura 26. Estructura representativa del complejo E-selectina-compuesto 4 extraída desde la DM.

4.7 Síntesis nano-transportador dirigido hacia E-selectina

A partir de la búsqueda de compuestos y los análisis energéticos y estructurales realizados complementando metodologías computacionales y experimentales, se ha seleccionado el compuesto **1** para orientar el sistema nano-transportador de fármacos. La síntesis del nano-transportador se realizó mediante el uso de dendrímeros PAMAM de cuarta generación (G4), el crosslinker PEG SM(PEG)₄ y el compuesto **1** según lo descrito en la sección 4.9. La figura 11 muestra el esquema de la síntesis del nano-transportador dirigido PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1, en la cual el grupo éster de NHS reacciona específicamente y en forma eficiente a pH 7-9 con los grupos amino superficiales que se encuentran en el dendrímero mediante la formación de un enlace amida y el grupo maleimida reacciona con el grupo tiona a pH 6.5-7.5 mediante la formación de un enlace tioéter.

El nano-transportador obtenido desde la síntesis de acoplamiento (Figura 27), fue posteriormente liofilizado y caracterizado mediante espectroscopia RMN ¹H (Figura 28). Desde la caracterización del nano-transportador mediante RMN ¹H, en D₂O (δ 4.708 ppm), es posible determinar el grado de sustitución superficial mediante las integrales de señales características de los hidrógenos presentes en la macromolécula. Asimismo, es posible determinar el número de ligandos acoplados sobre las cadenas de PEG. En la tabla 12 se muestran las integrales de las señales características de los hidrógenos presentes en el nano-transportador PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1.

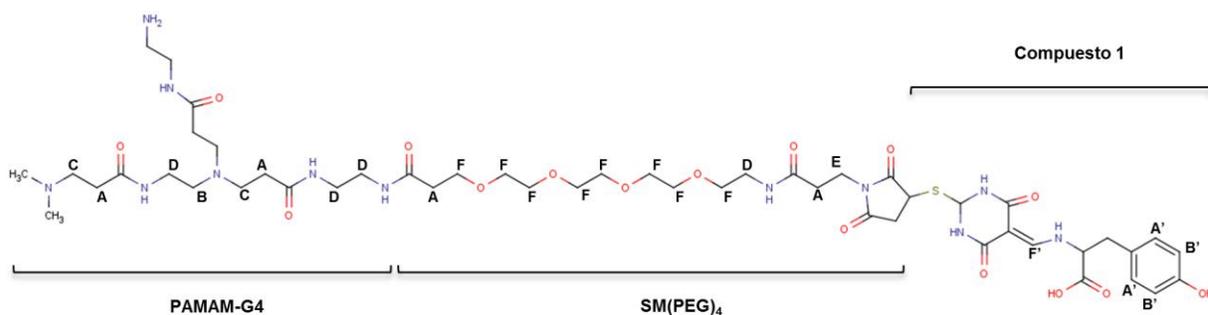


Figura 27. Esquema simplificado de una rama del Nano-transportador PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1.

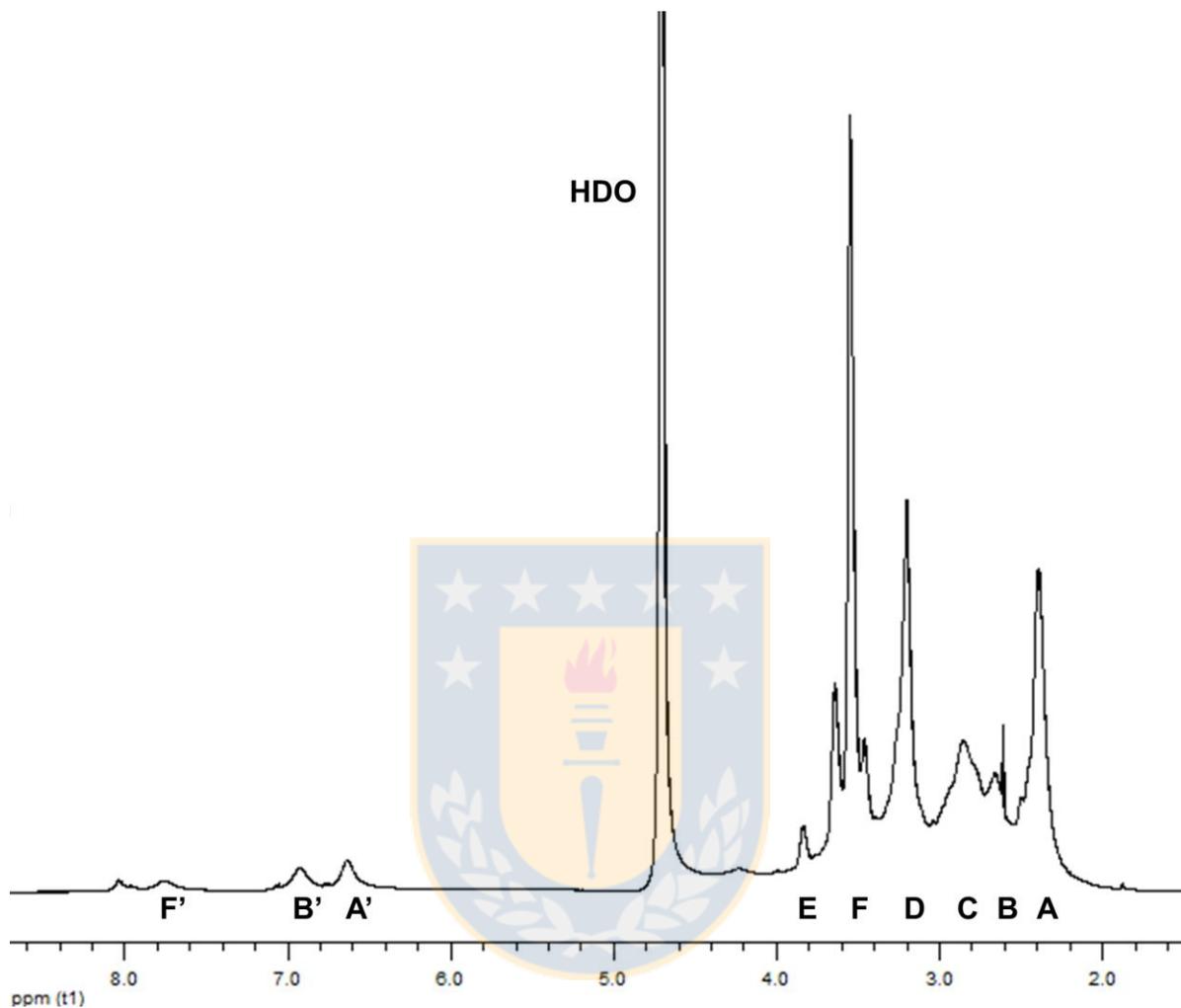


Figura 28. Espectro RMN ^1H en D_2O para el nano-transportador PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1, con la asignación de los hidrógenos característicos del sistema.

A partir del espectro RMN ^1H del nano-transportador se puede observar que la síntesis de acoplamiento fue exitosa, ya que aparecen las señales de los hidrógenos del crosslinker E y F, y las señales de los hidrógenos del compuesto 1 A', B' y F'.

Ya que no es posible realizar la determinación del grado de sustitución superficial utilizando señales características de los hidrógenos del dendrímero PAMAM, puesto que también son características de los hidrógenos del crosslinker, se debió utilizar el método del tanteo para tener una aproximación del número de cadenas superficiales de PEG mediante la cuantificación de los hidrógenos F, ya que esta señal es característica sólo de los hidrógenos metileno de las cadenas de PEG. Además se utilizaron las integrales de las señales de los hidrógenos E del crosslinker y A del dendrímero PAMAM para tener una mayor precisión en la determinación del número de PEG unido al sistema. Como la reacción de acoplamiento se realizó tomando en cuenta relaciones estequiométricas entre las cantidades de reactivo para alcanzar un máximo de 50% de sustitución periférica, el espectro de RMN ^1H se normalizó, en una primera instancia, asignando el máximo de sustitución y corroborando las señales de los hidrógenos E y A. De esta forma, se concluye que existe un 48% de sustitución superficial en el dendrímero, ya que al normalizar el espectro tomando en cuenta este porcentaje de sustitución (496 hidrógenos) se alcanzó la mayor correlación entre las integrales de los hidrógenos E y A obtenidos en el espectro y los calculados teóricamente. A partir de esta misma normalización, las integrales de los hidrógenos A', B' y F' dan referencia a que sólo nueve moléculas de compuesto 1 se enlazaron a las cadenas de PEG enlazadas al nano-transportador.

Es importante señalar, que la conjugación superficial de los dendrímeros PAMAM con el crosslinker bifuncional $\text{SM}(\text{PEG})_4$, da lugar a una serie de sistemas con distintos grados de sustitución. Por lo cual, el grado de sustitución superficial obtenido a partir del espectro de RMN ^1H , es un promedio. Asimismo, a medida que ocurre la sustitución superficial la estructura del dendrímero pierde simetría, lo cual se ve reflejado en el ensanchamiento de las señales de los hidrógenos y la pérdida de su resolución.

Tabla 12. Asignación de las señales obtenidas en el espectro de RMN ^1H para el nano-transportador PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1.

| H | δ (ppm) | Integral |
|-----------|----------------------------------|-----------------|
| A | 2.389 | 373.2 |
| B | 2.662 | 213.2 |
| C | 2.852 | 298.3 |
| D | 3.199 | 372.5 |
| E | 3.837 | 61.9 |
| F | 3.548 | 496.0* |
| A' | 6.636 | 17.7 |
| B' | 6.922 | 17.5 |
| F' | 7.762 | 9.1 |

*Señal escogida para normalizar el espectro de RMN ^1H .

4.8 Evaluación de citotoxicidad celular *in vitro*

Con el fin de evaluar la citotoxicidad *in vitro* del nano-transportador de fármacos dirigido hacia la proteína E-selectina, se estudiaron diferentes concentraciones de nano-transportador ($1\mu\text{M}$ – $200\mu\text{M}$) sobre muestras de células HEK (10^6 por pocillo). Los resultados del ensayo se muestran en la figura 29, en donde se muestran graficados los porcentajes de supervivencia celular del control positivo (C+), el control negativo (C-) y finalmente del nano-transportador a distintas concentraciones. Los porcentajes de supervivencia celular fueron asignados tomando como referencia el valor promedio del C+ como 100%. De acuerdo a esto, el porcentaje de supervivencia celular obtenido para el C- fue

7.2% y ~100% para el nano-transportador para todas las concentraciones estudiadas. Por lo tanto, de estos resultados se concluye que el nano-transportador dirigido PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1 no produce citotoxicidad celular para la línea celular estudiada. Por otro lado, el dendrímero PAMAM-G4 sin conjugación superficial también fue estudiado, obteniéndose un porcentaje de supervivencia celular de $65.7 \pm 3.8\%$. Este resultado, confirma que la conjugación superficial del dendrímero, con moléculas neutras como el PEG, disminuye su citotoxicidad celular sin disminuir su solubilidad, convirtiendo a estos sistemas en excelentes candidatos para ser utilizados en el transporte y la liberación de fármacos en sistemas biológicos.

Un punto a destacar, es la baja desviación estándar de los resultados obtenidos, lo cual demuestra la fiabilidad del ensayo y comprueba que las condiciones empleadas para su realización fueron las óptimas.

Así, con los resultados obtenidos desde este ensayo, se sugiere que el nano-transportador dirigido PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1 puede ser un potencial candidato para liberar fármacos en el organismo, ya que no presenta citotoxicidad para el rango de concentraciones estudiadas. Sin embargo, es necesario verificar en ensayos *in vivo* la información aquí reportada. Por otro lado, en este estudio se ha comprobado la reproducibilidad y rapidez, que presenta el método de AB al momento de evaluar la citotoxicidad de compuestos con potencial actividad citotóxica.

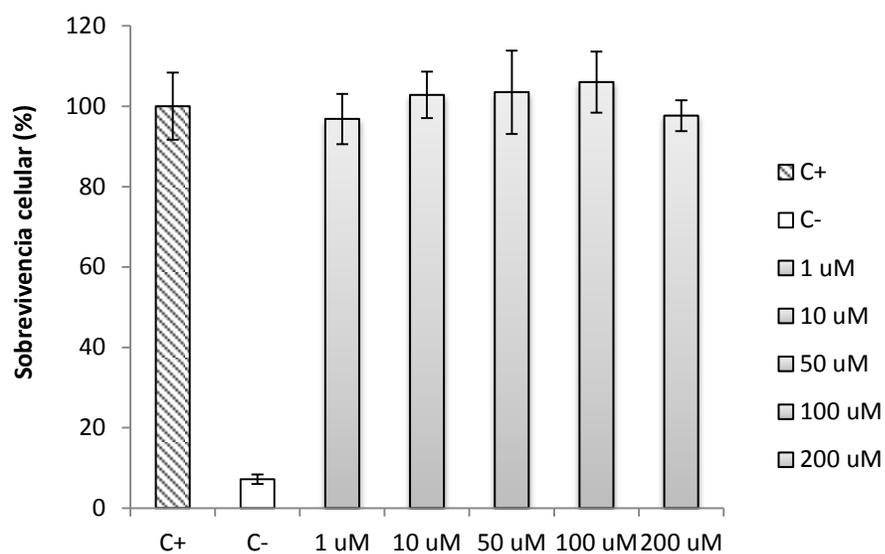


Figura 29. Porcentajes de viabilidad celular para distintas concentraciones de nano-transportador PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1 sobre células HEK. (C+) control positivo; (C-) control negativo, y distintas concentraciones de nano-transportador (1 μ M – 200 μ M).

Capítulo 5. Conclusiones y Proyecciones



5.1 Conclusiones

La presente tesis doctoral, tuvo por objetivo complementar metodologías computacionales y experimentales para diseñar y sintetizar un nuevo sistema nano-transportador dirigido de fármacos basado estructuralmente en el dendrímero PAMAM-G4 conjugado superficialmente con un 48% de PEG. La proteína con relevancia terapéutica E-selectina, fue seleccionada como blanco molecular debido a que participa activamente en el proceso de metástasis celular y no se encuentra expresada constitutivamente en todas las células endoteliales, sino que su expresión es inducida mediante agentes inflamatorios. Para lograr que el nano-transportador PAMAM-PEG fuese dirigido hacia la proteína, en su superficie se unieron nueve moléculas del compuesto que presentó la mayor afinidad por la E-selectina, llamado “compuesto_1”. Este compuesto fue obtenido a partir de una exhaustiva búsqueda, empleando una base de datos con más de quince millones de compuestos, mediante Screening Virtual; método que actualmente ha cobrado gran relevancia en el diseño de fármacos por computadora.

El diseño y la síntesis del nuevo nano-transportador dirigido de fármacos “PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1, se llevó a cabo gracias a la combinación de metodologías computacionales y experimentales. A continuación se describen las conclusiones que arrojaron los resultados obtenidos para cada una de las metodologías empleadas en esta investigación.

En relación al Screening virtual fue posible determinar diez compuestos antagonistas para la proteína E-selectina, los cuales presentaron valores de energías libres de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) E-selectina-ligando en el rango desde -6.6 kcal/mol a -7.4 kcal/mol. Los compuestos seleccionados, muestran un leve aumento en su afinidad en comparación al sLe^x (-6.5 kcal/mol), sin embargo debido a que la asociación de los complejos E-selectina-ligando se caracteriza por presentar una baja afinidad, estos ligandos pueden ser considerados como potenciales inhibidores de E-selectina.

Por otra parte, estudios de DM fueron realizados para estudiar en detalle las interacciones intermoleculares responsables de la asociación de cada ligando sobre el sitio activo de la proteína E-selectina. Dichos estudios muestran que los residuos del sitio activo; Arg97, Lys111, Lys113, Asn82, Tyr94 y Asn105 desempeñan un papel esencial en la asociación, puesto que establecen la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas, las cuales atraen y orientan a los ligandos hacia el sitio activo de la E-selectina. Entre estas interacciones destaca la establecida entre las lisinas y los grupos carboxilato de tres de los ligandos seleccionados, donde cada lisina establece la formación de un enlace de hidrógeno e interacción electrostática con el grupo carboxilato, lo que constituye mayor estabilidad a la unión del ligando. Estos resultados, dan evidencia de que el sitio activo de la proteína E-selectina, a pesar de ser amplio y estar expuesto al solvente, presenta zonas relevantes para la asociación con ligandos a través de interacciones electrostáticas y la formación de enlaces de hidrógeno.

Respecto a los análisis energéticos realizados, se puede concluir que los métodos alquímicos TI y MBAR son capaces de reproducir diferencias sutiles en la energía libre relativa ($\Delta\Delta G_{\text{unión}}$) para una serie de análogos de sLe^x en comparación a los valores experimentales. No obstante, metodologías más aproximadas como; MM/PBSA y MM/GBSA han mostrado reproducir los resultados de energía libre interacción E-selectina-oligosacárido de manera comparables a los métodos más rigurosos.

Al igual que los resultados computacionales, los estudios de afinidad E-selectina-ligando realizados mediante espectroscopia de fluorescencia para obtener los valores de K_d experimentales, demuestran que los cuatro compuestos seleccionados presentan una moderada afinidad por la proteína E-selectina (333 μM – 1 mM). Tomando en cuenta, que su ligando fisiológico presenta afinidades que fluctúan entre 878 μM – 2 mM, se puede concluir que los compuestos seleccionados pueden ser catalogados como ligandos con gran afinidad por la proteína E-selectina.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante espectroscopia de fluorescencia, se escogió al compuesto **1** para realizar estudios STD-RMN. Dicho estudio demostró que este compuesto efectivamente se asocia a la proteína E-selectina y da evidencia de que el anillo

aromático es el que presenta la mayor interacción con su sitio activo. De esta forma, al igual que los resultados de DM y experimentales, mediante CORCEMA-ST se corroboró que los hidrógenos del anillo aromático son los que presentan un mayor contacto con el sitio activo de la E-selectina y que los hidrógenos metilénicos que se encuentran cerca del grupo carboxilato están más expuestos al solvente, y por ende, no se encuentran en contacto directo con la proteína. Este resultado fue validado mediante la obtención del factor R_{NOE} (0.57), el cual demuestra que existe una buena correlación entre los valores experimentales y los teóricos.

El nano-transportador dirigido PAMAM(G4)-PEG(48%)-Compuesto_1 se sometió a una evaluación *in vitro* para determinar su citotoxicidad celular. Los resultados del estudio, dieron cuenta de que dentro del rango de concentraciones estudiadas (1 μ M – 200 μ M) el nano-transportador no produce citotoxicidad sobre la línea celular estudiada (HEK). Estos resultados, confirman que la conjugación superficial del dendrímero con moléculas de PEG disminuye su citotoxicidad sin disminuir su solubilidad aparente, logrando potenciar la futura utilización de estos sistemas nano-transportadores para el transporte y la liberación de fármacos en sistemas biológicos.

Finalmente, esta tesis doctoral ha aportado en la validación e implementación de nuevas metodologías *in silico*, las cuales permiten la búsqueda e identificación de compuestos de interés farmacológico en forma relativamente rápida y utilizando recursos computacionales limitados. En particular, esta investigación ha entregado gran información para ser utilizada como punto de partida en el diseño y desarrollo de nuevos nano-transportadores dirigidos y la identificación de potenciales inhibidores para de la E-selectina u otros receptores con relevancia terapéutica, para ser empleados a futuro como fármacos.

5.2 Proyecciones

A partir de lo expuesto anteriormente, se sugiere que el compuesto **1**, obtenido desde metodologías *in silico*, puede ser un buen punto de partida para futuras optimizaciones en el desarrollo de nuevos inhibidores de la E-selectina con afinidades en el rango del nanomolar, para ser empleados como potenciales nuevos fármacos para la terapia del cáncer y enfermedades inflamatorias. Por otro lado, el sistema nano-transportador de fármacos sintetizado puede ser un potencialmente empleado en pruebas *in vivo* y así comprobar si logra liberar en forma dirigida fármacos contra el cáncer.



Capítulo 6. Referencias



1. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. *Cancer Statistics* , 2016. **00**, 1–20 (2012).
2. I. básicos de salud C. *Departamento de Estadísticas e Información de Salud M d S, Chile.* (2012).
3. Mitrus & I, Bryndza E, Sochanik A, S. S. Evolving models of tumor origin and progression. *Tumour Biol* **33**, 911–917 (2012).
4. Cella, D. F. & Tulsky, D. S. Quality of life in cancer: definition, purpose, and method of measurement. *Cancer Invest.* **11**, 327–336 (1993).
5. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 751–760 (2007).
6. Baetke, S. C., Lammers, T. & Kiessling, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br. J. Radiol.* **88**, 1-24 (2015).
7. Kesharwani, P. & Iyer, A. K. Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery. *Drug Discov. Today* **20**, 536–547 (2015).
8. Tripathi, P. K. *et al.* Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil. *Pharmazie* **57**, 261–4 (2002).
9. Barra, P. A., Barraza, L., Jiménez, V. A., Gavín, J. A. & Alderete, J. B. Complexation of Mefenamic Acid by Low-Generation PAMAM Dendrimers: Insight from NMR Spectroscopy Studies and Molecular Dynamics Simulations. *Macromol. Chem. Phys.* **4**, 372-383 (2014).
10. Barra, P. A., Barraza, L. F., Jiménez, V. a., Gavin, J. a. & Alderete, J. B. Drug-dendrimer supramolecular complexation studied from molecular dynamics simulations and NMR spectroscopy. *Struct. Chem.* **25**, 1443–1455 (2014).
11. Namazi, H. & Adeli, M. Dendrimers of citric acid and poly (ethylene glycol) as the new drug-delivery agents. *Biomaterials* **26**, 1175–1183 (2005).
12. Ooya, T., Lee, J. & Park, K. Effects of ethylene glycol-based graft, star-shaped, and

- dendritic polymers on solubilization and controlled release of paclitaxel. *J. Control. Release* **93**, 121–7 (2003).
13. Benito, J. M. *et al.* Optimizing Saccharide-Directed Molecular Delivery to Biological Receptors: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Glycodendrimer–Cyclodextrin Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10355–10363 (2004).
 14. Kukowska-Latallo, J. F. J. *et al.* Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.* **65**, 5317–5324 (2005).
 15. Barraza, L. F., Jiménez, V. A. & Alderete, J. B. Effect of PEGylation on the Structure and Drug Loading Capacity of PAMAM-G4 Dendrimers: A Molecular Modeling Approach on the Complexation of 5-Fluorouracil with Native and PEGylated PAMAM-G4. *Macromol. Chem. Physic.* 1689–1701 (2015).
 16. Fant, K. *et al.* Effects of PEGylation and Acetylation of PAMAM Dendrimers on DNA Binding, Cytotoxicity and in Vitro Transfection Efficiency. *Mol. Pharm.* **7**, 1734–1746 (2010).
 17. Kolhatkar, R. B., Kitchens, K. M., Swaan, P. W. & Ghandehari, H. Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. *Bioconjug. Chem.* **18**, 2054–2060 (2007).
 18. Menjoge, A. R., Kannan, R. M. & Tomalia, D. A. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. *Drug Discov. Today* **15**, 171–185 (2010).
 19. Kim, Y., Klutz, A. M. & Jacobson, K. A. Systematic investigation of polyamidoamine dendrimers surface-modified with poly(ethylene glycol) for drug delivery applications: synthesis, characterization, and evaluation of cytotoxicity. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1660–1672 (2008).
 20. Pyreddy, S., Kumar, P. & Kumar, P. Polyethylene glycolated PAMAM dendrimers-

- Efavirenz conjugates. *Int. J. Pharm. Investig.* **4**, 15 (2014).
21. Jubeli, E., Moine, L., Vergnaud-Gauduchon, J. & Barratt, G. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J. Control. Release* **158**, 194–206 (2012).
 22. Kneuer, C., Ehrhardt, C., Radomski, M. W. & Bakowsky, U. Selectins--potential pharmacological targets? *Drug Discov. Today* **11**, 1034–40 (2006).
 23. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D. & Camphausen, R. T. Insights into the Molecular Basis of Leukocyte Tethering and Rolling Revealed by Structures of P- and E-Selectin Bound to SLeX and PSGL-1. *Cell* **103**, 467–479 (2000).
 24. Binder, F. P. C., Lemme, K., Preston, R. C. & Ernst, B. Sialyl Lewis(x): a ‘pre-organized water oligomer’? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 7327–31 (2012).
 25. Slee, D. H. *et al.* Development of potent non-carbohydrate imidazole-based small molecule selectin inhibitors with antiinflammatory activity. *J. Med. Chem.* **44**, 2094–107 (2001).
 26. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 935–49 (2004).
 27. Lyne, P. D. Structure-based virtual screening: An overview. *Drug Discov. Today* **7**, 1047–1055 (2002).
 28. Cheng, T., Li, Q., Zhou, Z., Wang, Y. & Bryant, S. H. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. *AAPS J.* **14**, 133–141 (2012).
 29. Ewing, T. J. a, Makino, S., Skillman, a. G. & Kuntz, I. D. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **15**, 411–428 (2001).
 30. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput.*

Chem. **31**, NA–NA (2009).

31. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
32. Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **28**, 1145–1152 (2007).
33. Jones, G., Willett, P. & Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **245**, 43–53 (1995).
34. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T. & Klebe, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol.* **261**, 470–89 (1996).
35. Halgren, T. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **47**, 1750–1759 (2004).
36. Abagyan, R., Totrov, M. & Kuznetsov, D. ICM - A New Method for Protein Modeling and Design: Applications to Docking and Structure Prediction from the Distorted Native Conformation. *J. Comput. Chem.* **15**, 488–506 (1993).
37. McGann, M. R., Almond, H. R., Nicholls, A., Grant, J. A. & Brown, F. K. Gaussian docking functions. *Biopolymers* **68**, 76–90 (2003).
38. Montes, M., Miteva, M. A. & Villoutreix, B. O. Structure-based virtual ligand screening with LigandFit: Pose prediction and enrichment of compound collections. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **68**, 712–725 (2007).
39. Ekins, S., Mestres, J. & Testa, B. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 9–20 (2007).
40. Case, D. a *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–88 (2005).
41. Woods, R. J., Dwek, R. A., Edge, C. J. & Fraser-reid, B. Molecular Mechanical and Molecular Dynamical Simulations of Glycoproteins and Oligosaccharides. *J. Phys.*

- Chem.* 3832–3846 (1995).
42. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, A. A. & Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665–667 (2004).
 43. Gordon, J. C. *et al.* H⁺⁺: a server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **33**, W368–W371 (2005).
 44. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).
 45. Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 31–34 (1995).
 46. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, a. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).
 47. van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. Algorithms for macromolecular dynamics and constraint dynamics. *Mol. Phys.* **34**, 1311–1327 (1977).
 48. Pedretti, A., Villa, L. & Vistoli, G. VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **18**, 167–173 (2004).
 49. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* (2009).
 50. Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S. & Coleman, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 1757–68 (2012).
 51. Durrant, J. D. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* **9**, 71 (2011).

52. AR, L. *Molecular modelling: principles and applications*. (2001).
53. Kal, L. *et al.* NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. *J. Comput. Phys.* **312**, 283–312 (1999).
54. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Pet, W. C. Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian, Inc., Wallingford CT (2003).
55. Comell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I. & Kollman, P. A. Application of RESP Charges To Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. *J. Am. Chem. Soc.* 9620–9631 (1993).
56. Hahn, A. M. & Then, H. Characteristic of Bennett's acceptance ratio method. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **80**, 1–10 (2009).
57. Shirts, M. R. & Chodera, J. D. Statistically optimal analysis of samples from multiple equilibrium states. *J. Chem. Phys.* **129**, 124105 (2008).
58. Singh, N. & Warshel, A. Absolute binding free energy calculations: On the accuracy of computational scoring of protein-ligand interactions. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **18**, (2010).
59. Steinbrecher, T., Joung, I. & Case, D. A. Soft-core potentials in thermodynamic integration: Comparing one- and two-step transformations. *J. Comput. Chem.* **32**, 3253–3263 (2011).
60. Miller, B. R. *et al.* MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3314–3321 (2012).
61. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. *Princ. Fluoresc. Spectrosc.* (2006).
62. Viegas, A., Nobrega, F. L. & Cabrita, E. J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein

- Binding. *J. Chem. Educ* **88**, 990 (2011).
63. Jayalakshmi, V. & Krishna, N. R. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J. Magn. Reson.* **155**, 106–118 (2002).
64. *Bioactive Conformation II*. **273**, (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
65. Neal, S., Nip, A. M., Zhang, H. & Wishart, D. S. Rapid and accurate calculation of protein ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shifts. *J. Biomol. NMR* **26**, 215–240 (2003).
66. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5421–5426 (2000).
67. Rampersad, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)* **12**, 12347–12360 (2012).
68. Binder, F. P. C., Lemme, K., Preston, R. C. & Ernst, B. Sialyl Lewisx: A 'Pre-Organized Water Oligomer'? *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 7327–7331 (2012).
69. Schwizer, D. *et al.* Pre-organization of the core structure of E-selectin antagonists. *Chemistry* **18**, 1342–51 (2012).
70. Ernst, B. Nanomolar E - Selectin Antagonists with Prolonged Half-Lives by a Fragment-Based Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **26**, 9820-9828 (2013).
71. Jayalakshmi, V. & Rama Krishna, N. CORCEMA refinement of the bound ligand conformation within the protein binding pocket in reversibly forming weak complexes using STD-NMR intensities. *J. Magn. Reson.* **168**, 36–45 (2004).
72. Somers, W. S., Tang, J., Shaw, G. D. & Camphausen, R. T. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* **103**, 467–79 (2000).

Capítulo 7. Anexos



7.1 Perfiles de Energía en Cálculos de Energía Libre (TI) E-selectina-oligosacárido

A continuación se muestran los perfiles de energía energía formados por $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de lambda (λ) para los sistemas E-selectina-oligosacárido estudiados mediante TI. Los perfiles de energía formados por $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de lambda (λ) para nueve transmutaciones consideran el oligosacárido libre en solución acuosa (A) y asociado a la proteína (B) para el camino directo e inverso. Cada proceso de transmutación ha sido dividido en tres etapas (ver sección 3.3); en ΔG^I las cargas parciales atómicas de los átomos que desaparecen son removidas, en ΔG^{II} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que desaparecen son reemplazados a cero y los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que aparecen son creados, y finalmente en ΔG^{III} las cargas parciales atómicas de los átomos que aparecen son considerados en el cálculo.

Figura 30. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 1 \rightarrow 2 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína.

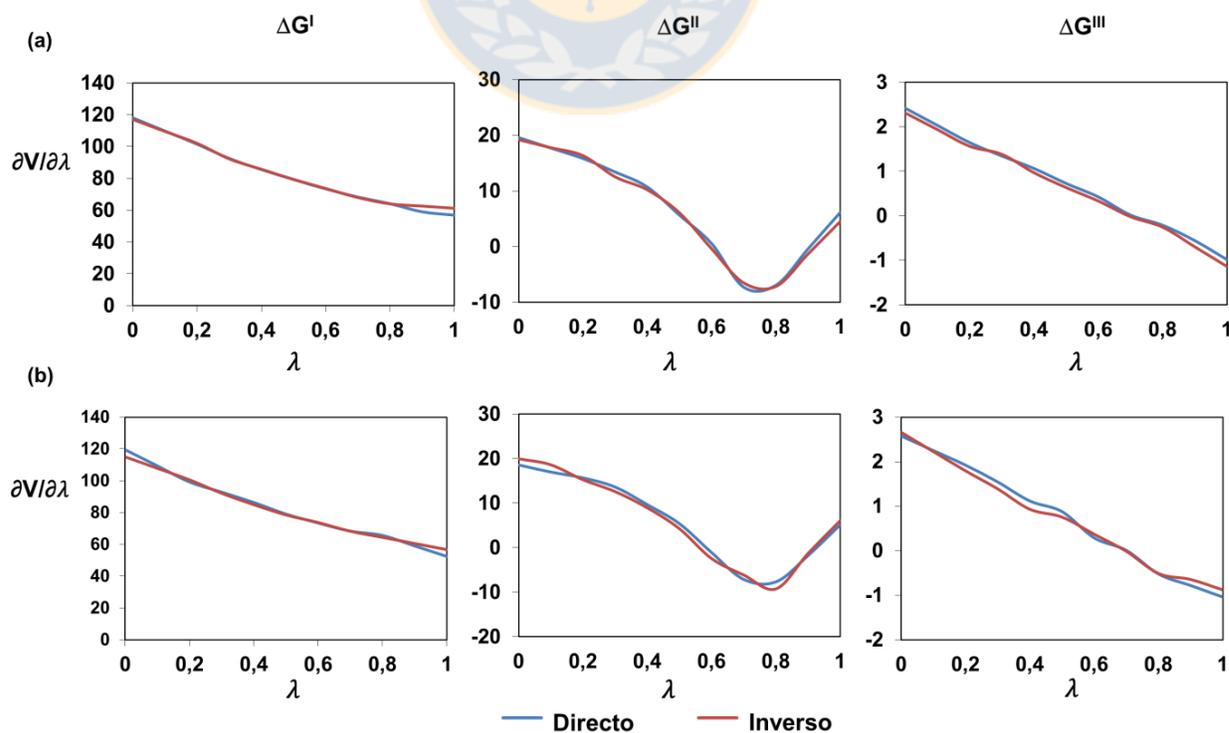


Figura 31. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 1 \rightarrow 3 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína.

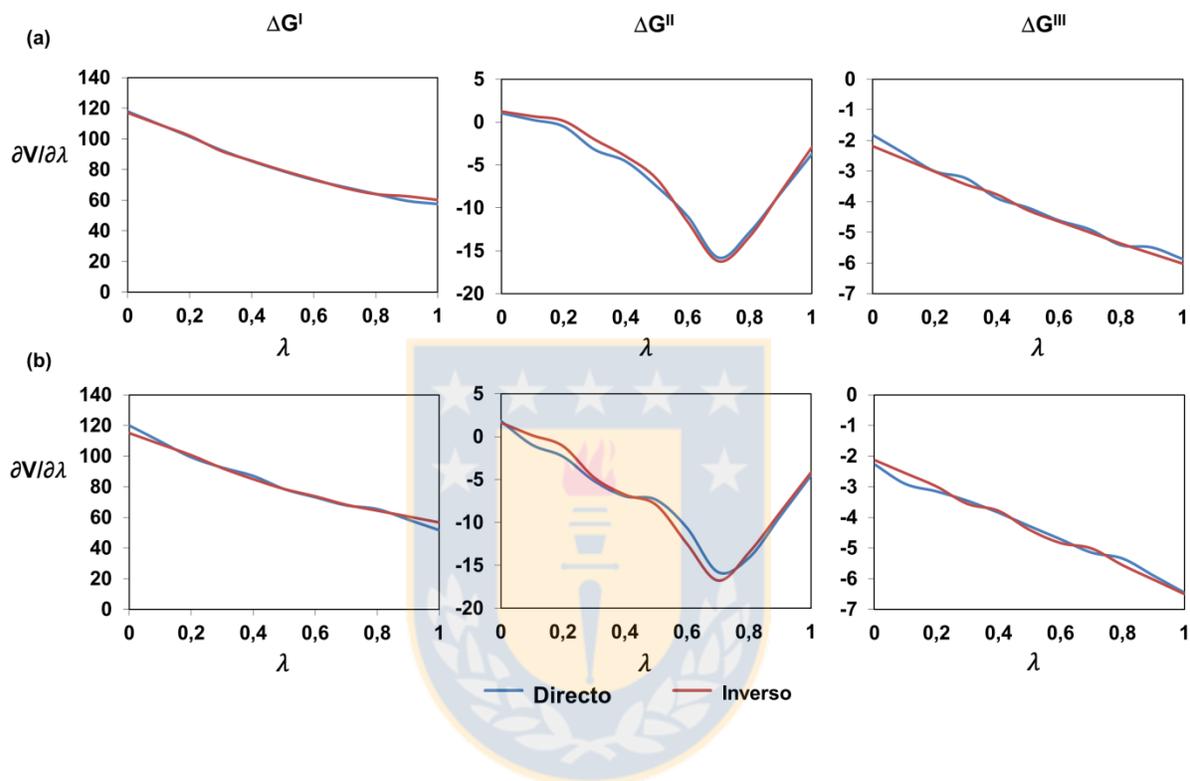


Figura 32. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 2 \rightarrow 3 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína.

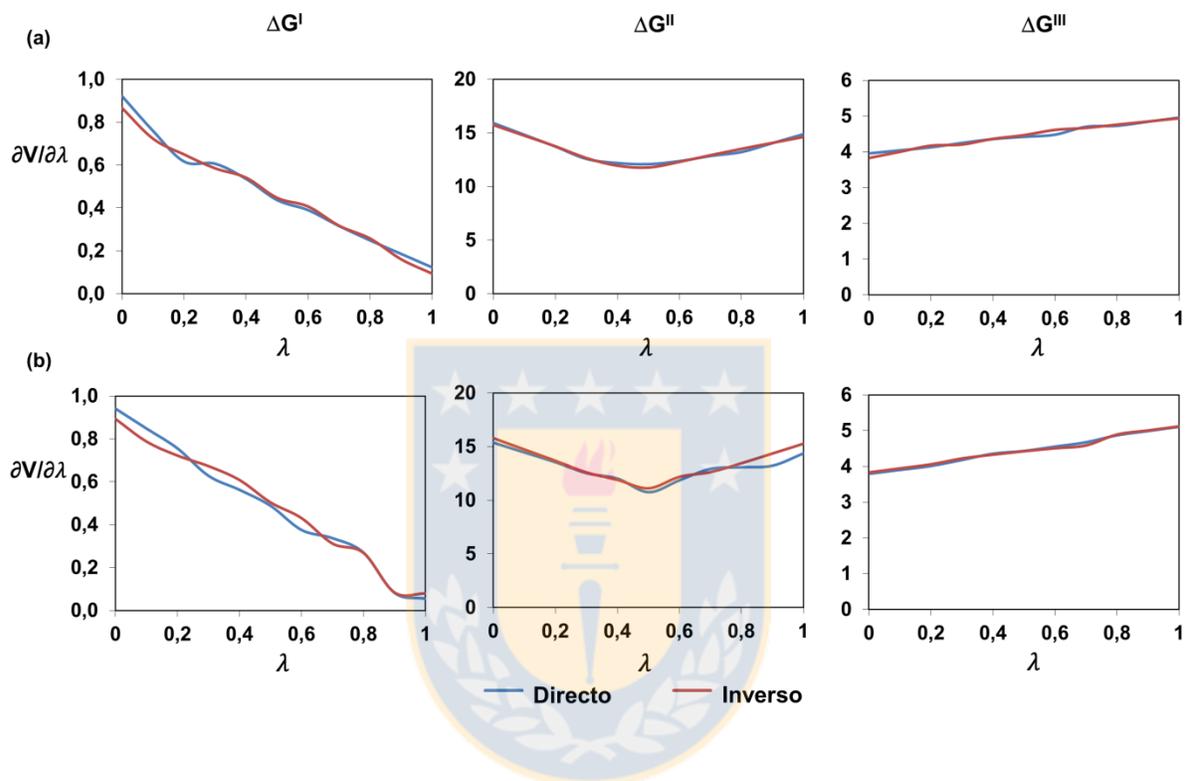


Figura 33. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 4 \rightarrow 5 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína.

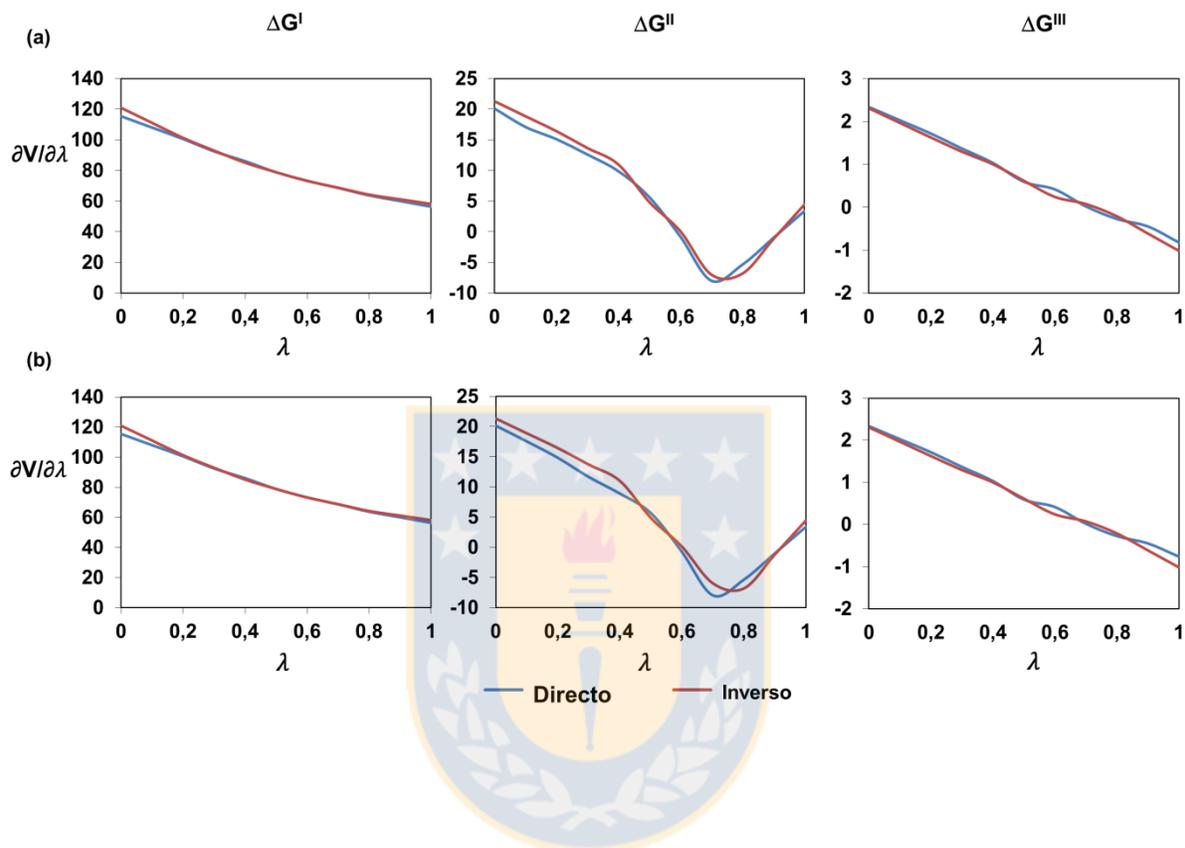


Figura 34. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 4 \rightarrow 6 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína.

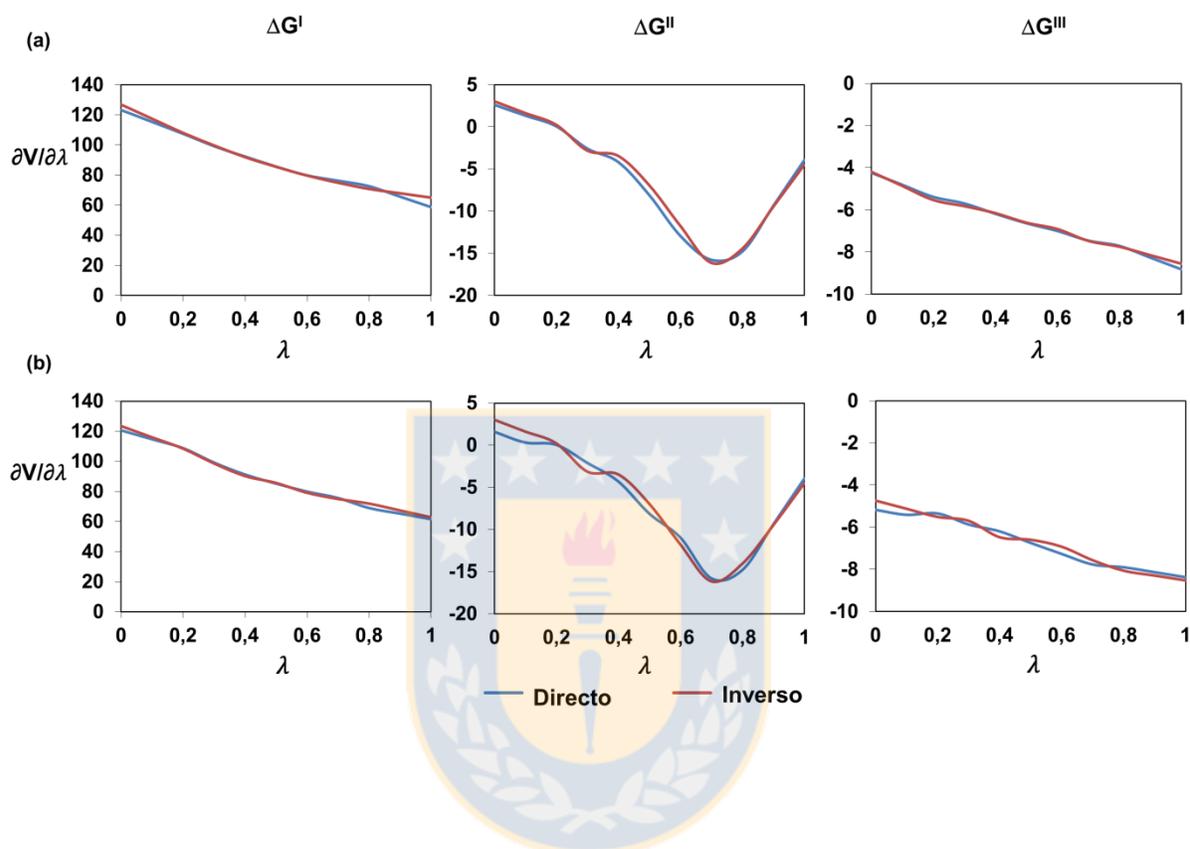


Figura 35. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 5 \rightarrow 6 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína.

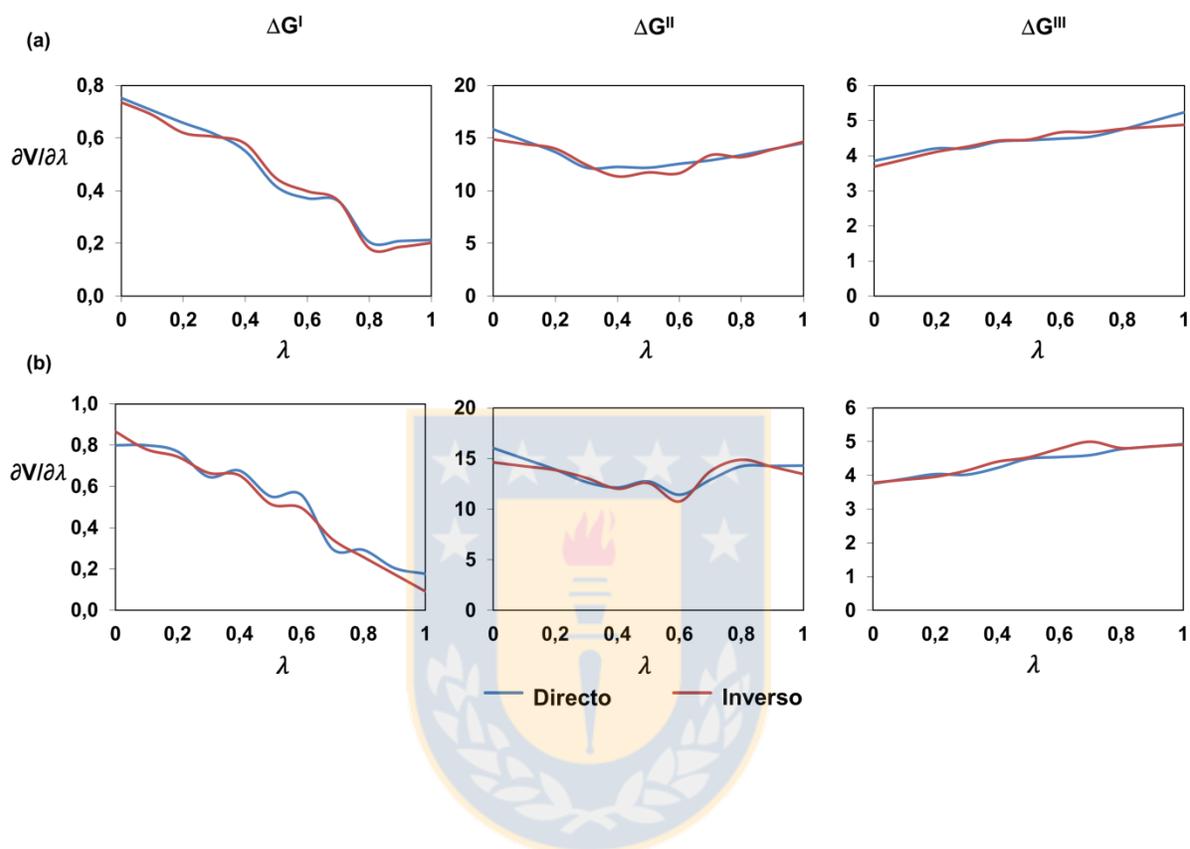


Figura 36. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 1 \rightarrow 4 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína. En este caso se utilizaron átomos “dummy” debido a que no había directa relación en el número de átomos para el par de oligosacáridos estudiados en la transmutación. El proceso de transmutación fue dividido en cuatro sub-etapas; en ΔG^I las cargas parciales atómicas de los átomos que desaparecen son removidas, en ΔG^{II} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que desaparecen son reemplazados a cero, ΔG^{III} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que aparecen son creados, y finalmente, ΔG^{IV} las cargas parciales atómicas de los átomos que aparecen son considerados en el cálculo.

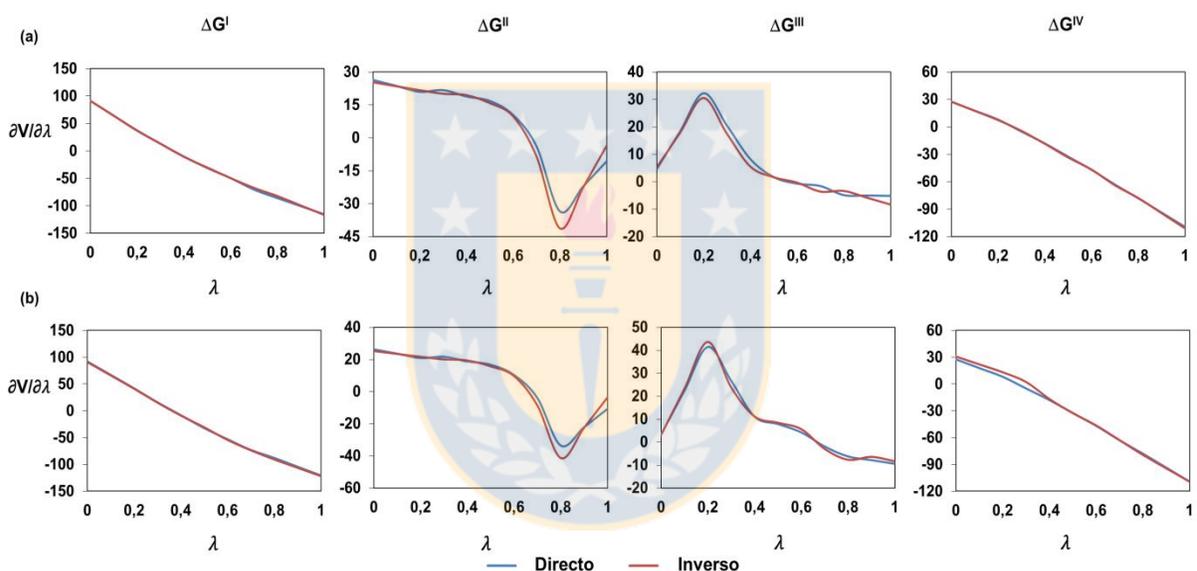


Figura 37. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 1 \rightarrow 5 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína. En este caso se utilizaron átomos “dummy” debido a que no había directa relación en el número de átomos para el par de oligosacáridos estudiados en la transmutación. El proceso de transmutación fue dividido en cuatro sub-etapas; en ΔG^I las cargas parciales atómicas de los átomos que desaparecen son removidas, en ΔG^{II} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que desaparecen son reemplazados a cero, ΔG^{III} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que aparecen son creados, y finalmente, ΔG^{IV} las cargas parciales atómicas de los átomos que aparecen son considerados en el cálculo.

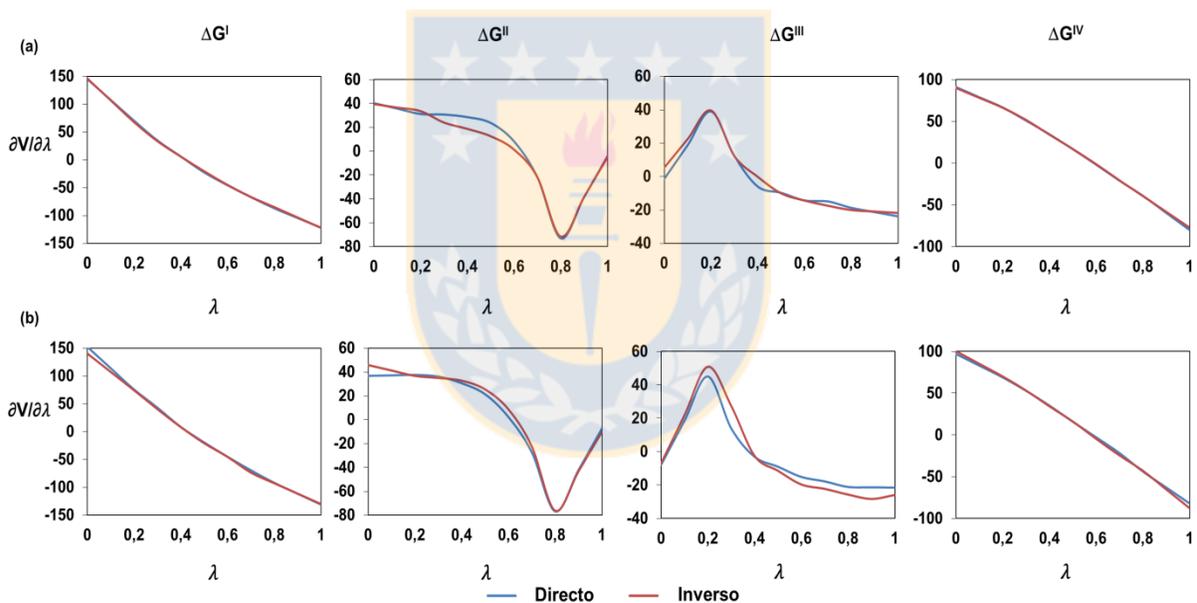
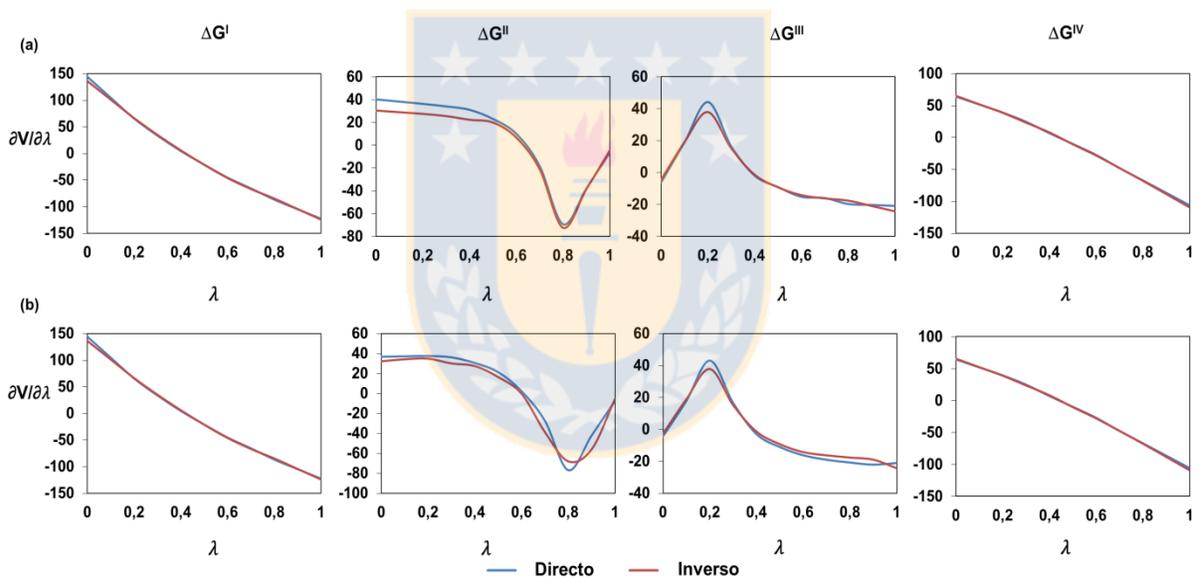


Figura 38. $\partial V/\partial\lambda$ (kcal/mol) en función de λ calculado para la transmutación en dirección directa e inversa entre los oligosacáridos 1 \rightarrow 6 en (a) solución acuosa y (b) enlazado a la proteína. En este caso se utilizaron átomos “dummy” debido a que no había directa relación en el número de átomos para el par de oligosacáridos estudiados en la transmutación. El proceso de transmutación fue dividido en cuatro sub-etapas; en ΔG^I las cargas parciales atómicas de los átomos que desaparecen son removidas, en ΔG^{II} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que desaparecen son reemplazados a cero, ΔG^{III} los potenciales de van der Waals y radios atómicos de los átomos que aparecen son creados, y finalmente, ΔG^{IV} las cargas parciales atómicas de los átomos que aparecen son considerados en el cálculo.



7.2 RMSDs para los sistemas E-selectina-ligando respecto a la estructura promedio para un tiempo total de 20 ns de simulación.

