



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Identificación y evaluación *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de pequeñas
moléculas que estabilizan el complejo molecular KRas4B-PDE δ**

T E S I S

Que presenta

DIANA CASIQUE AGUIRRE

Para obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

en la Especialidad de

Biomedicina Molecular

Director de Tesis:

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Ciudad de México, México.

Agosto, 2016

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Departamento de Biomedicina Molecular
CINVESTAV-IPN

Dr. Ponciano García Gutiérrez

Departamento de Biofísicoquímica
UAM Iztapalapa

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa

Departamento de Ciencias Naturales
UAM Cuajimalpa

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del **Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía**.

Durante los estudios de doctorado recibí una beca otorgada por CONACYT (232376) para la realización del presente trabajo, así también recibí un apoyo por parte del CINVESTAV para la asistencia a un congreso internacional en la Habana, Cuba.

Este proyecto contó con el apoyo del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado 002.2015.

*A mi tía Ana†
a mi abuelito Pancho †
a mi primo Lalo †
a Osiris †
a la Sra. Ana María Gorgonio†
al Sr. Dagoberto de León†*

*Y a todas las personas que lamentablemente han tenido que pasar por la terrible
enfermedad que es el cáncer.*

RECONOCIMIENTOS

Se extiende mi más grato agradecimiento a quienes asesoraron el desarrollo de esta tesis.

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía del departamento de Biomedicina Molecular.

Dr. Ponciano García Gutiérrez del área de Química de UAM-Iztapalapa

Se reconoce la colaboración de:

Dra. María del Rocío Thompson Bonilla del Hospital 1° de octubre del ISSSTE.

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa del Departamento de Ciencias Naturales de UAM-Cuajimalpa

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez y la **Dra. Irene Vergara Bahena** del Departamento de Física Nuclear del Instituto Nacional de Cancerología.

Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo de la Facultad de medicina de la UNAM.

Asimismo se agradece a:

Dra. Leticia Cedillo Barrón del Departamento de Biomedicina Molecular

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, del Departamento de Biomedicina Molecular.

Dra. Eva María Luna Rivera, del área de Biología Molecular del Hospital Central Sur de Alta Especialidad, PEMEX-Picacho.

Dra. Erika González Domínguez del Departamento de Inmunología de la UASLP.

Se reconoce la asesoría técnica de la **Auxiliar Ma de Jesús Almaraz Barrera** del Departamento de Biomedicina Molecular.

Se reconoce el apoyo técnico en trámites y documentación:

Secretaria Ma. de Jesús Maqueda Villegas del departamento de Biomedicina Molecular.

Secretaria Sandra Medina del Oso del Departamento de Biomedicina Molecular.

Se reconoce el apoyo técnico de **Lourdes Mónica Marrufo Olivo** del Departamento de Biomedicina Molecular.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis Padres y hermanos, esto no lo hubiera podido haber logrado sin el apoyo incondicional y el cariño de cada uno de ustedes, son lo mejor de mi vida. Los amo. Gracias.

A toda mi familia, abuelitos, tíos y primos, gracias por todo su cariño y apoyo, y a mis sobrinos que han hecho que mi vida sea más divertida. Los quiero mucho.

A mis amigos Lince, no importa que tan lejos nos encontremos, pareciera que siempre estamos juntos. Gracias por la amistad brindada durante estos 12 años, son muy especiales en mi vida.

Un agradecimiento muy especial a Eva, Daniel y Dante, por todo el apoyo y cariño brindado, son como una familia para mí. Los quiero mucho.

A excelentes personas que formaron parte del equipo del laboratorio, Mari, Eva, Araceli, Sonia, Mercedes, Dora, Lore, Pedro, Mónica, Pao, Lu, Norma y Sra. Innes. Gracias por su amistad y cariño.

A todos mis amigos de Biomedicina Molecular, se les tiene un aprecio muy especial, gracias por que hacen que el trabajo se disfrute.

Durante este tiempo tuve la fortuna de conocer a personas maravillosas con las que pasé muy bonitos momentos y aventuras, a Juan Carlos, Danny, Lalo, Ana, Leo, Ixchel, Heber, Isis, Luis, Nadia, Salma, Mercedes, Lore, Ericka, Mari, Mari Carmen, Rosita, Gabo, Mario, Miguel, Rodolfo, Eddiel, Ale, Carito, Sofi, Gaurav, Adri y Edgar. Los considero grandes amigos. Gracias.

A Maru, gracias por todo tu apoyo y ayuda brindada.

Al Dr. Miguel, gracias por permitirme ser parte del equipo de trabajo, fue muy satisfactorio el haber desarrollado este proyecto.

Al Dr. Ponciano, por la enorme paciencia que siempre mostró, por la ayuda y apoyo para que el proyecto saliera lo mejor posible. Gracias.

A la Dra. Rocío, no solo fue parte importante del proyecto, si no que me recordó que la bondad y la amabilidad siempre hay que tenerlas presente. Gracias.

A la Dra. Haydée, por las excelentes críticas, colaboración y revisión de tesis, es una investigadora admirable.

Al Dr. Luis Medina y todos los miembros de su laboratorio en especial a la Dra. Irene, gracias por el enorme apoyo en los experimentos *in vivo* desarrollados en este proyecto.

A la Dra. Leti y al Dr. Vianney por la revisión del proyecto. Gracias

Al departamento de Biomedicina Molecular.

Al CINVESTAV. Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	11
¿Cómo son reguladas las proteínas Ras?	13
Ras-GTPasas	13
Localización de Ras y su procesamiento.....	15
PDEδ regulando a KRas4B	17
¿Los cánceres que presentan mutación en KRas4B son dependientes de ésta molécula?.....	19
¿Qué tan específicos deben ser los fármacos a KRas4B?	22
ANTECEDENTES	23
“Y cuando despertó, el inhibidor aún no estaba ahí.”.....	23
Prevención de la formación Ras-GTP.....	23
Inhibidores de modificaciones postraduccionales.....	23
Inhibición de la interacción Ras-GEF.....	25
Inhibidores de mutante específica	26
Inhibidores de vías de señalización río abajo de Ras	28
Inhibidores de PDEδ.....	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO.....	36
OBJETIVOS PARTICULARES	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Modelado molecular y <i>virtual screening</i>	37
Modelado molecular por homología.....	37
<i>Virtual screening</i>	38
Construcción de confórmers estructurales de los compuestos de la base de datos <i>3D Diversity Set</i>	38
Interacción proteína-ligando o <i>Docking</i>	39
Reactivos.....	39
Cultivo Celular	40
Viabilidad celular.....	40
Muerte celular	40
Activación de Ras	41
Activación de las vías de señalización río abajo de Ras	41
Efecto de los compuestos de estudio en un modelo tumoral ortotópico utilizando ratones un/nu.....	41
RESULTADOS	43

1. Obtener la estructura tridimensional del complejo KRas4B-PDEδ mediante modelado molecular por homología.....	43
2. Identificación de compuestos específicos contra el complejo KRas4B-PDEδ a través de la técnica de <i>docking</i>	50
3. Grado de toxicidad <i>in vitro</i> de los compuestos seleccionados como ligandos potenciales, así como su efecto en viabilidad y muerte celular en líneas celulares de cáncer pancreático.....	70
4. Determinar la activación de Ras así como su señalización río abajo.....	75
5. Evaluación del impacto de los compuestos D14 y C22 en la formación tumoral en un modelo de ratón.....	78
DISCUSIÓN.....	80
PERSPECTIVAS.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	88
APENDICE A.....	96
APENDICE B.....	103
APENDICE C.....	104
APENDICE D.....	105

RESUMEN

La GTPasa KRas4B se ha utilizado como un blanco principal en el desarrollo de fármacos contra el cáncer, la cual es transportada por la proteína PDE δ hacia la membrana plasmática, dando lugar a la activación de distintas vías de señalización, necesarias para el inicio y mantenimiento tumoral; por lo tanto, la identificación de nuevas moléculas orgánicas para evitar la activación de esta GTPasa mediante la estabilización del complejo KRas4B-PDE δ es de gran interés. En este trabajo identificamos y evaluamos nuevas moléculas estabilizadoras del complejo molecular. Para lograrlo, se construyó un modelo molecular por homología del complejo KRas4B-PDE δ , lo cual nos permitió localizar posibles sitios de unión específicos en la región interfacial del complejo. Posteriormente, se realizó la simulación mediante *virtual screening* utilizando los sitios de unión del modelo molecular KRas4B-PDE δ y los compuestos de la base de datos de Enamine. La evaluación de estos compuestos *in vitro* demostró que dos de ellos, D14 y C22, tuvieron un efecto específico sobre la viabilidad en la línea celular de cáncer pancreático MIAPaCa-2, mas no en la línea celular normal pancreática hTERT-HPNE. Además, ambos compuestos disminuyeron la concentración de Ras-GTP en las células MIAPaCa-2 en más del 50%, inhibiendo la señalización de RAS y disminuyendo la formación tumoral en un modelo murino ortotópico de adenocarcinoma pancreático ductal humano. En conclusión, nuestros resultados abren la posibilidad para desarrollar fármacos contra el cáncer dependiente de KRas4B.

ABSTRACT

The GTPase KRas4B protein has been utilized like a principal target in the development of drugs against cancer, which is transported by PDE δ toward plasma membrane, where it activates different signaling pathways necessary to the beginning and maintenance of cancer. Therefore it is of great interest to identify new organic molecules to prevent activation of GTPase by stabilizing the KRas4B-PDE δ complex. We identified and evaluated new stabilizing molecules of molecular complex. To achieve this, a molecular model was constructed by homology of KRas4B-PDE δ complex, which allowed us to locate possible specific binding sites in the inter-facial region of the complex. Subsequently virtual screening using the binding sites of molecular model KRas4B-PDE δ and the compounds of the Enanime database performed the simulation. The *in vitro* evaluation of these compounds demonstrated that two of them, D14 and C22 had a specific effect about viability in cancer pancreatic cell line MIAPaCa-2, but not in normal pancreatic cell line hTERT-HPNE. Also both compounds decreased Ras-GTP concentration in MIAPaCa-2 cells in more than 50%, inhibiting Ras pathway and decreasing tumoral formation in a mouse xenograft model of human pancreatic ductal adenocarcinoma. In conclusion our results open the possibility to develop drugs against KRas4B dependent cancer.

INTRODUCCIÓN

El éxito de terapias cancerígenas basadas en la inhibición específica de las vías asociadas al desarrollo de tumores, han abierto las puertas para el descubrimiento de fármacos anticancerígenos. Las terapias convencionales también son dirigidas a procesos celulares, pero no logran distinguir las células tumorales de sus homólogos normales. A menudo esta falta de discriminación conduce a efectos secundarios que pueden ser tan devastadores para el paciente como la enfermedad misma, en contraste con las terapias dirigidas a la inactivación de vías de señalización específicas que son absolutamente necesarias para el mantenimiento del cáncer, como consecuencia en las células normales se genera menor daño conduciendo a una menor toxicidad del fármaco (Danovi *et al.*, 2008).

Los genes mutados de RAS (*rat sarcoma*) fueron detectados en 1982, siendo el primer descubrimiento en cánceres humanos. Estos codifican para los miembros de una gran superfamilia de proteínas de unión a GTP (guanosina-5'-trifosfato). Las isoformas mutadas de RAS (HRAS, NRAS y KRAS) son los genes más comunes encontrados en la mayoría de los tipos de cáncer. Estas mutaciones resultan en la ganancia de función de RAS por la imposibilidad de hidrolizar el GTP y son frecuentemente asociados con una pobre respuesta a terapias estándares, e interesantemente se encuentran presentes en los cánceres más letales (páncreas, pulmón y colon). Estas mutaciones han sido detectadas en 11-13% de todas las muestras de tumor secuenciadas de acuerdo a diferentes bases de datos y con la isoforma de RAS específica generalmente difiere de acuerdo al tipo de cáncer (Cox *et al.*, 2015).

La presencia de las proteínas RAS mutadas en cáncer, han intensificado el interés y el esfuerzo en la búsqueda y desarrollo de inhibidores de RAS, sin embargo, a pesar del esfuerzo de más de tres décadas por la academia y la industria en la búsqueda de un inhibidor eficaz, hasta la fecha no se han logrado identificar componentes clínicamente

relevantes, lo que ha generado que algunos investigadores se refieran a ella como: El Santo Grial en la terapia del cáncer (*Holy Grail of cancer therapy*) (Spiegel et al., 2014), debido a que el Santo Grial nunca ha sido encontrado, en el 2015 Cox y colaboradores mencionaron a la molécula de Ras como un posible blanco cancerígeno *undruggable* (esto quiere decir que todos los esfuerzos anteriores de desarrollar un fármaco contra ella han fallado). A pesar de ello, los hallazgos más recientes han permitido no perder la esperanza de que Ras pueda ser modulada por una molécula pequeña.

Nuestro grupo de investigación, recientemente se ha enfocado en entender los diferentes mecanismos que regulan a KRas4B y así explorar diferentes estrategias que permiten entender cómo abatir su función. Por lo que, en este proyecto de tesis se describe la identificación de compuestos que estabilizan el complejo molecular KRas4B-PDE δ *in silico*, los cuales presentaron actividad apoptótica, condujeron a la inactivación de Ras e inhibieron su vía de señalización río abajo en líneas celulares de cáncer pancreático, mientras que los ensayos *in vivo* realizados en un modelo murino ortotópico de cáncer de páncreas disminuyeron el tamaño tumoral.

¿Cómo son reguladas las proteínas Ras?

Ras-GTPasas

Las proteínas Ras son GTPasas que se unen e hidrolizan a GTP, regulando importantes procesos celulares como transducción de señales, regulación de la expresión génica, proliferación, diferenciación y muerte celular.

Las GTPasas Ras presentan un ciclo de activación e inactivación, cuando se encuentran unido a GTP se presentan en un estado activo y cuando se unen a GDP, se encuentran en un estado inactivo. En respuesta a estímulos extracelulares, las proteínas denominadas Factores de cambio de nucleótido de guanina o GEFs (del inglés Guanin Exchange Factors) regulan el crecimiento celular estimulando la forma activa Ras-GTP, las moléculas denominadas Proteínas de activación o GAPs (del inglés GTPase-activating protein) estimulan la actividad intrínseca de la GTPasa para hidrolizar el GTP y obtener la forma inactiva Ras-GDP (**Fig. 1**) (Repasky *et al.*, 2004). De esta manera controlan la internalización de una variedad de señales extracelulares que a su vez desencadenan diferentes respuestas celulares incluyendo proliferación, diferenciación y muerte celular.

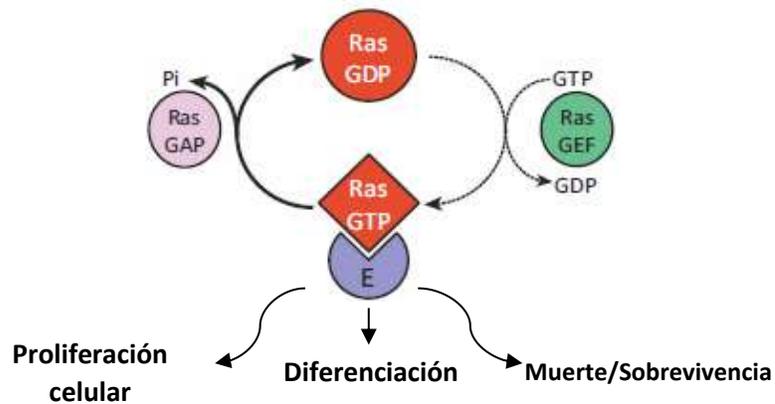


Figura 1| Ciclo de activación de Ras. Las proteínas Ras presentan un estado “inactivo” (Ras-GDP) y un estado “activo” (Ras-GTP). Los factores de cambio de nucleótidos de guanina (GEFs) y proteínas de activación de GTPasas (GAPs), actúan como reguladores positivos y negativos respectivamente, lo que conduce a distintos eventos celulares. Modificada de Bryant *et al.*, 2014.

Las proteínas de Ras^{WT} (Ras Wild Type) se unen a GDP y GTP con afinidades en el orden de concentraciones picomolares, con niveles celulares de GDP y GTP en concentraciones milimolares, normalmente en las moléculas de Ras predomina la unión a GDP. Después de la estimulación del factor de crecimiento y la activación por la proteína GEF, la unión a nucleótido se desestabiliza y el nucleótido es liberado, debido a que la concentración de GTP es ocho veces más alta que la de GDP (Koutmou *et al.*, 2014), la proteína GEF promueve la formación transitoria de Ras-GTP, regresando a su forma inactiva (Ras-GDP) por la unión a la proteína GAP. En cáncer, se presenta la pérdida de la actividad de la proteína GAP evitando la hidrólisis del GTP, favoreciendo la persistente formación de RAS-GTP. Esto se debe a la presencia de mutaciones en las proteínas de Ras que impiden el reconocimiento con las proteínas GAPs. Las mutaciones más frecuentes en Ras se encuentran en los residuos G12, G13 y Q61 (Bos *et al.*, 2007).

Las proteínas Ras están constituidas por un dominio de ~20 kDa (correspondiente a los residuos Ras 4-166) denominado dominio G, este es conservado en todas las proteínas de la superfamilia Ras y se encuentra involucrado en la unión e hidrólisis del GTP (**Fig. 2**). Este dominio comprende cinco unidades de secuencias conservadas que se encuentran involucrados en la unión con el PO₄³⁻, Mg⁺² o guanina (G). El dominio *switch* I (SI: residuos de Ras 30-38) y el dominio *switch* II (SII residuos de Ras 60-76) son regiones de cambio de conformación durante el ciclo GDP-GTP, contribuyen a la unión preferencial con el efector en estado unido a GTP y el sitio del dominio efector (E; residuos de Ras 32-40). Las GTPasas de la familia Ras en su región carboxilo terminal (C-terminal) poseen una región hipervariable o RHV (del inglés *hypervariable region*), secuencias que comúnmente terminan con un motivo CAAX, en donde sufren modificaciones post-traduccionales necesarias para su asociación a membrana plasmática, las cuales son vitales para sus funciones normales y oncogénicas (Court *et al.*, 2013).

KRAS4B se diferencia de otras GTPasas, dado que presenta una serie de residuos básicos en la RHV, estos incrementan la fuerza electrofílica entre la proteína y la membrana plasmática y son críticos para su asociación (Tsai *et al.*, 2015).

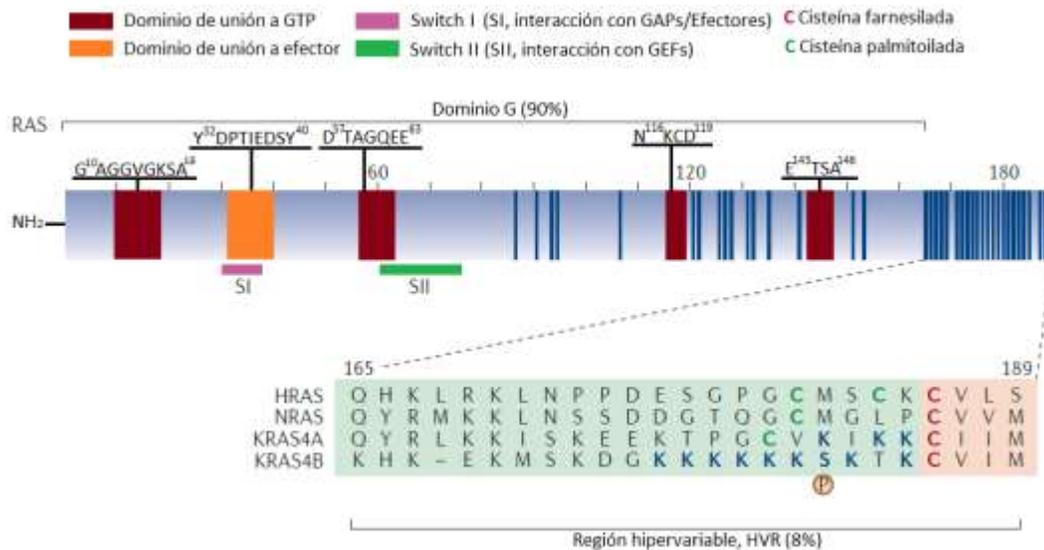


Figura 2| Estructura de las proteínas de la familia Ras. Los tres genes que codifican para las proteínas de RAS presentan entre 188-199 aminoácidos y comparten 82-90% en identidad (las líneas verticales en azul indican los aminoácidos que no presentan identidad). KRas codifica para dos variantes de *splicing*, KRas4A y KRas4B. Únicamente KRas4B puede ser fosforilada por PKC α en S181 y es la isoforma más predominante expresada en células humanas. KRas4B presenta una región rica en lisinas que mejora su asociación con membrana plasmática. Modificada de Cox *et al.*, 2014.

Localización de Ras y su procesamiento.

La función biológica de las proteínas Ras está estrictamente relacionada a su dinámica y localización subcelular, para ello son necesarias diferentes modificaciones postraduccionales. La primera modificación postraduccional que sufre la proteína, es una farnesilación (la adición de un lípido isoprenoide de 15 carbonos). La enzima farnesiltransferasa (FTasa) ataca covalentemente a la cisteína localizada en el motivo CAAX (C = cisteína, A = aminoácido alifático, X = cualquier aminoácido) que se encuentra en el C-terminal, esta modificación le permite a la proteína la unión al retículo endoplásmico (ER). El motivo CAAX se encuentra en todas las proteínas Ras, en otros miembros de la superfamilia Ras y muchas otras proteínas. Posterior a la farnesilación, la siguiente modificación que ocurre es un corte

proteolítico en el motivo CAAX, los tres aminoácidos siguientes al residuo de cisteína farnesilado son eliminados por la enzima de conversión de Ras (RCE1), finalmente el grupo α -isoprenil cisteína es carboximetilado por la enzima carboximetil transferasa isoprenil-cisteína (ICMT) (**Fig.3**). Esta esterificación de cationes metilo neutraliza la carga negativa del grupo carboxilo por lo tanto se cree que aumenta la afinidad de la farnesilcisteína a la membrana plasmática mediante la reducción de la repulsión del grupo carboxilo por los grupos cargados negativamente. Estas modificaciones son necesarias para regular la localización dinámica de Ras y puedan unirse a la membrana para llevar a cabo su actividad. (Court *et al.*, 2013).

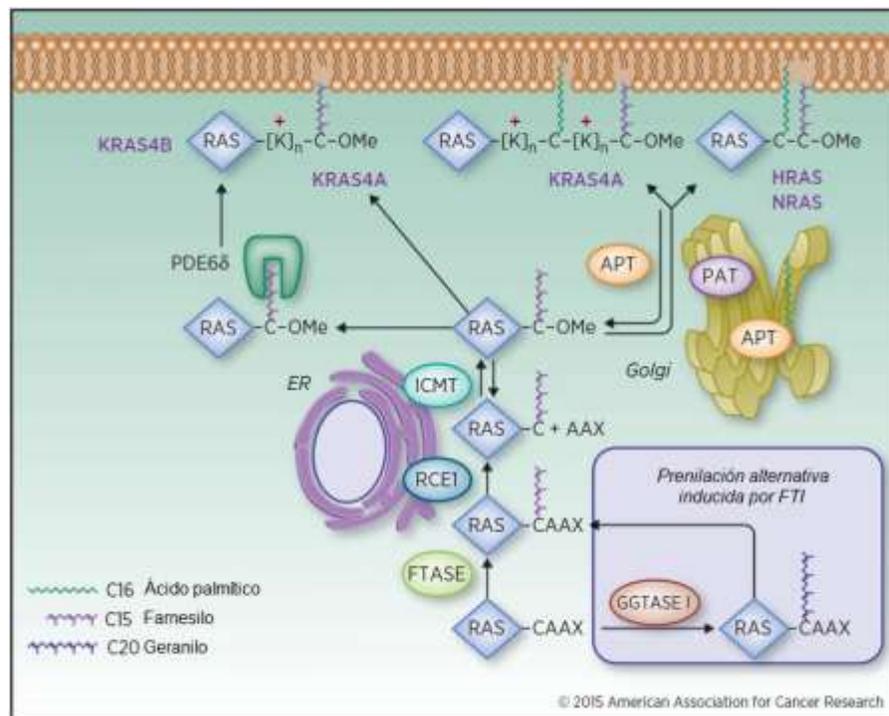


Figura 3| Dinámica de Ras. Ras es sintetizado en el citosol en donde es reconocida por la FTasa, la cual ataca con un lípido isoprenoide farnesilo (C15) a la cisteína del motivo CAAX. Esto les proporciona la suficiente afinidad por el ER, donde son modificados por un corte proteolítico de los residuos AAX catalizados por la enzima RCE1 y por una carboximetilación en la cisteína farnesilada, catalizada por la ICMT. El tráfico de Ras requiere de un segundo elemento para llegar a la membrana plasmática (MP). NRas y HRas tienen uno y dos residuos de cisteína respectivamente, son palmitoiladas bajo la acción reversible de la proteína aciltransferasa (PAT) en el aparato de Golgi, para promover su tráfico a la MP. Una desacilación rápida por una proteína tiosterasa de acilo (APT1/2) los libera de MP para ser re-acilados y regresar a MP. KRas4B se desvía de la trayectoria de las isoformas de Ras palmitoiladas y procede directamente a la MP, a través del transporte por PDEδ, esta proteína reconoce el grupo farnesilo y solubiliza a las proteínas Ras no palmitoiladas de cualquier compartimento. Tras la fosforilación de Ser181, KRas4B puede ser desprendida

de la MP y regresar al sistema de endomembranas. KRas4A, presenta dos cisteínas una es farnesilada y la otra palmitoilada, también presenta una región polibásica bifurcada, se somete a una forma intermedia del transporte. KRas y NRas son alternativamente preniladas por la geranylgeraniltransferasa I (GGTasa I), la cual ataca con un geranylgeranil isoprenoide (C20) que siguen los mismos pasos subsecuentes de procesamiento. Modificada de Cox, 2015.

PDEδ regulando a KRas4B

La proteína denominada Fosfodiesterasa 6 subunidad delta (PDEδ o PDE6D) es una molécula con una masa molecular de ~17 KDa, su participación fue inicialmente descrita en el ciclo visual en los fotorreceptores. La proteína PDEδ es viable para unir y solubilizar varias proteínas de la superfamilia Ras, siendo una de las interacciones más notables con KRas4B (Nancy *et al.*, 2002). Esta proteína funciona como un factor de unión prenil citoplasmático, (Weise *et al.*, 2012), participa en el tráfico intracelular y la señalización de Ras (Chandra *et al.*, 2012) **Fig.3**. La unión de proteínas G preniladas a PDEδ se produce principalmente a través de una inserción del extremo C-terminal farnesilado en el bolsillo hidrofóbico de la PDEδ (**Fig. 4**).

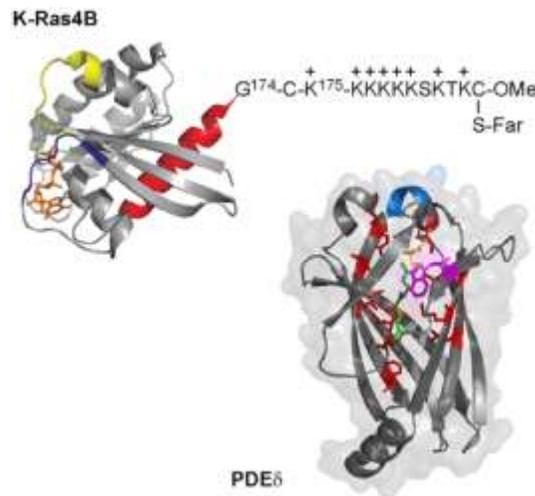


Figura 4| Representación esquemática de las estructuras KRas4B y PDEδ. Para KRas4B (PDB: 3GFT) la región de switch I del dominio G (32–38 aa) se muestra en azul, la región de switch II (59-67 aa) en amarillo. Para la estructura de PDEδ (PDB: 3T5G) los residuos que forman el bolsillo de unión hidrofóbico (M20, L22, L38, I53, L63, I129, F133, L147, Y149; rojo) Loop flexible (111-117; azul), y el residuo de triptófano W32 (magenta). La cisteína farnesilada de la GTPasa es incorporada en el bolsillo hidrofóbico de PDEδ en el complejo, en color verde (Far) y amarillo (Cys). Tomada de Weise *et al.*, 2012.

La localización y señalización de Ras es controlada por PDEδ y el

factor de liberación Arl2 (**Fig. 5**). Las interacciones electrostáticas por si solas no pueden generar el enriquecimiento de KRas4B sobre la membrana plasmática, debido a la gran superficie de endomembranas en la célula. La proteína KRas4B es secuestrada continuamente de endomembranas por la proteína PDE δ y es liberada por Arl2 a membranas perinucleares. Las interacciones electrostáticas transfieren a la proteína KRas4B a la superficie del endosoma de reciclaje que está cargado negativamente. El transporte vesicular también es responsable para el enriquecimiento de la proteína KRas4B en membrana plasmática (Schmick *et al.*, 2014).

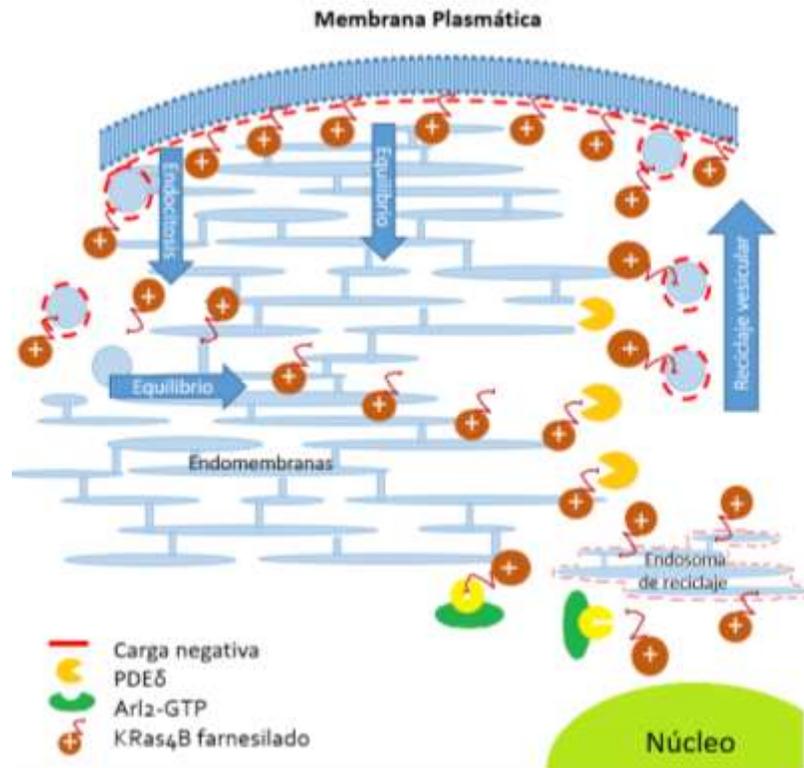


Figura 5|Localización de KRas4B a la membrana plasmática. KRas4B es secuestrado continuamente de endomembranas por PDE δ y liberado a membranas perinucleares donde es disociado por Arl2. Las interacciones electrostáticas transfieren a KRas4B a la superficie cargada negativamente del endosoma de reciclaje. El transporte vesicular conduce al enriquecimiento de KRas4B en la membrana plasmática. Modificada de Schmick *et al.*, 2014

A continuación introduciré la participación de la proteína KRas4B en cáncer y sus posibles blancos farmacológicos.

¿Los cánceres que presentan mutación en KRas4B son dependientes de ésta molécula?

Tal vez es una de las preguntas más importantes desde la perspectiva del desarrollo de fármacos.

Las mutaciones de Ras son eventos genéticos que ocurren al inicio de la progresión tumoral. Numerosos modelos de ratón genéticamente modificados en Ras muestran una potente actividad para inducir cáncer generado de mutaciones de Ras. La pérdida de la función de una molécula supresora de tumores (por ejemplo la delección de la proteína p53) junto con la activación de Ras, resulta en potenciar la formación y progresión tumoral (Collins *et al.*, 2012), que es coherente con la necesidad de moléculas adicionales para cooperar en conjunto con la mutación de la proteína Ras y así transformar completamente las células (Cox, 2015).

A pesar de la aparición temprana de las mutaciones de Ras, existen evidencias experimentales considerables para sugerir que la expresión de Ras mutado es necesaria para el mantenimiento del tumor. Así la supresión de Ras por RNA de interferencia (RNAi) afecta el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de humano que presentan a mutaciones en la proteína Ras (Scholl *et al.*, 2009). Del mismo modo, en un modelo de ratón transgénico de expresión reversible de KRas4B^{G12D}, cuando esta expresión es revertida conduce a regresión tumoral y disminución de puntos metastásicos (Collins *et al.*, 2012, a y b). Por lo tanto, no hay duda de que la proteína de Ras mutada es un blanco farmacológico.

No todos los tipos de cáncer con mutaciones de Ras son iguales, la frecuencia con la que cada isoforma de Ras mutado está presente (**Fig. 6**) y las mutaciones específicas de los mismos varían notablemente en diferentes tipos de cáncer (**Fig. 7**), aumentando la dificultad para el desarrollo de una estrategia terapéutica, debido a que los enfoques terapéuticos deben ser

adaptados tanto a la isoforma y a la mutación específica de Ras. Por lo tanto, no se limita la posibilidad de desarrollar una única terapia dirigida a Ras que se adecue a todas las mutantes de Ras en cáncer.

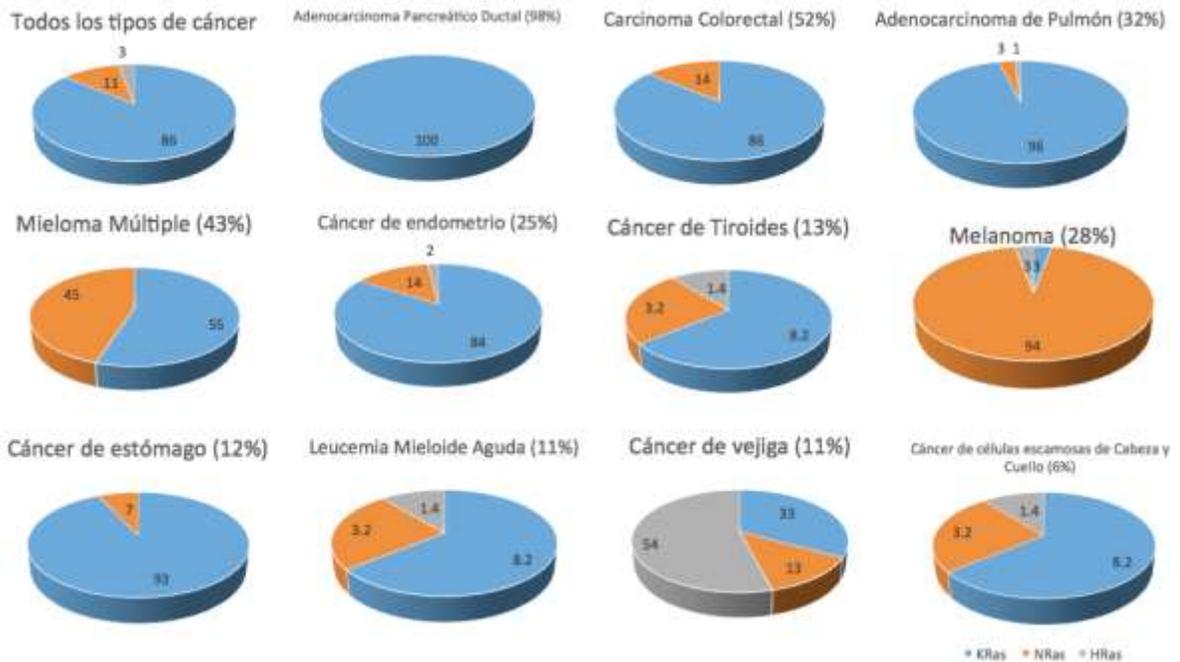


Figura 6| Mutaciones de Ras en cáncer. La frecuencia y distribución de las mutaciones de Ras no son uniformes, KRas4B es la isoforma mutada con mayor frecuencia (86%), seguida por NRas (11%), y menos frecuente HRas (3%). En el adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC; >95% de todos los cánceres pancreáticos) y el adenocarcinoma de pulmón (LAC; 30-35%) existe una frecuencia cerca del 100% de mutaciones en KRas4B. En carcinomas colorrectal (CRC) y cáncer de estómago, la mutación de KRas4B es también la isoforma más predominante, donde las mutaciones de NRas son menos frecuentes (14% y 7%) y no se han detectado mutaciones en HRas. Por el contrario, se observan frecuencias similares en KRas4B y NRas en Mieloma Múltiple (MM), NRas es la isoforma mutada predominante en melanomas cutáneos (94%) y la Leucemia Mieloide Aguda (AML; 59%). Aunque es poco frecuente, las mutaciones de HRas son predominantes en cáncer de vejiga (54%) y en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC; 86%). (Datos de COSMIC). Modificada de Cox *et al.*, 2014.

Las mutaciones de las proteínas Ras en los residuos de aminoácidos 12, 13 o 61 del dominio G, limita el acceso de Ras a la proteína GAP, manteniendo así a Ras mutado en una conformación activa (Ras-GTP) para desencadenar vías de señalización río abajo. Teniendo en cuenta que Ras

mutado es un motor clave de al menos un tercio de todos los cánceres, desde 1980 la atención ha sido enfocada sobre la identificación de compuestos que se puedan unir específicamente a la proteína mutada de Ras para alterar su actividad. (Zhang y Cheong, 2016).

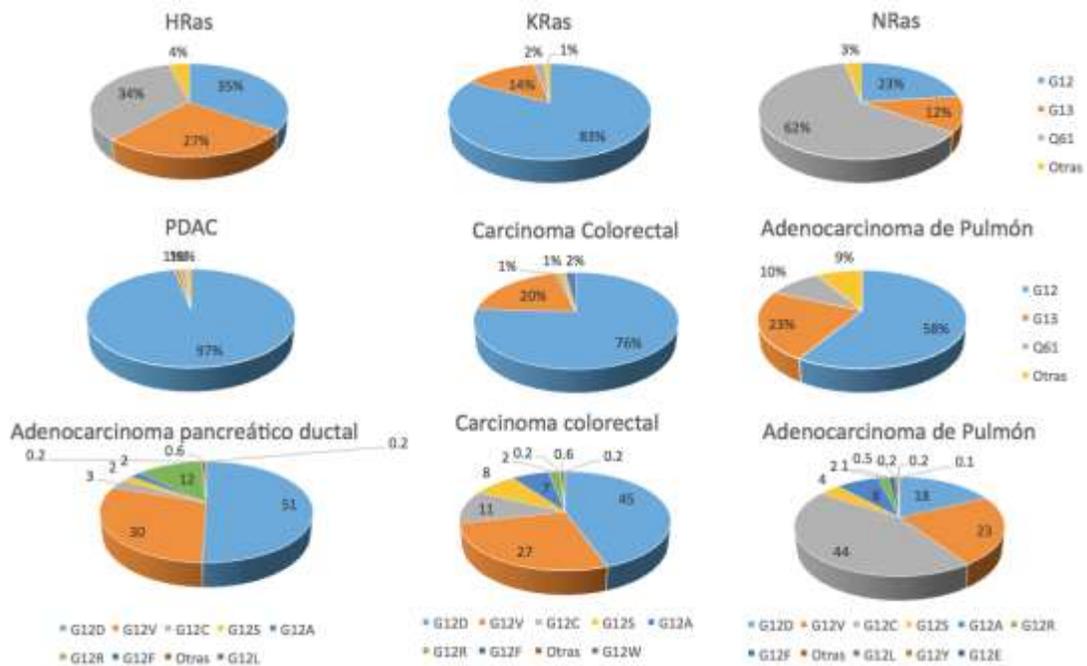


Figura 7| Frecuencia y distribución de las mutaciones de KRas4B en cánceres humanos. Los cánceres asociados a los genes de Ras son caracterizados por presentar mutaciones en la molécula. El 98% de estas mutaciones son encontrados en los residuos G12, G13 o Q61. La mutación más frecuente es en el residuo G12 de KRas4B. También presentan diferencias de acuerdo al tipo de cáncer en la frecuencia relativa de mutaciones a estas posiciones. En adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) y en el adenocarcinoma de pulmón (LAC), las mutaciones de KRas4B son predominantemente encontradas en el residuo G12. En carcinoma colorectal (CRC), G12 es también la posición predominante (en 76% de los casos), pero adicionalmente es considerable una frecuencia de la mutación en G13 en el 20% de los casos. A146 la cual es una posición raramente mutada en otros cánceres. También se observan diferencias en el tipo de cáncer y las sustituciones de un determinado residuo, por ejemplo, en PDAC y CRC el residuo G12 la sustitución predominante es G12D, seguida por G12V. Por contraste, en LAC la sustitución predominante es G12C, el cual es raro en PDAC (3%). Modificada de Cox *et al.* 2014.

¿Qué tan específicos deben ser los fármacos a KRas4B?

Los compuestos que bloquean las cuatro isoformas de Ras (HRas, NRas, KRas4A y KRas4B) podrían ser altamente tóxicos, por ejemplo, el abatimiento en la expresión de HRas, NRas y KRas en fibroblastos en cultivo causa disminución en el crecimiento y bloqueo del movimiento celular (Drosten *et al.*, 2010). La disminución en la expresión de KRas4B genera letalidad embrionaria (Jhonson *et al.*, 1997). La pérdida de NRas y HRas es tolerable al menos en ratones, pero son dispensables para el desarrollo y crecimiento en ratón (Esteban *et al.*, 2001). Ante estos datos, surgió una pregunta de suma importancia *¿Es suficiente la eficacia obtenida por un blanco de KRas4B, sin discriminar entre la forma silvestre y mutante?*

El resultado óptimo, es tener compuestos que sean específicos para las proteínas mutantes con el objetivo de generar menor toxicidad. En células normales, es probable que HRas, NRas y KRas realicen funciones similares y redundantes. Sin embargo, la disminución en la expresión de KRas4B en ratones adultos induce letalidad pero solo después de una larga latencia (McCormick, 2016), por lo que un compuesto específico para KRas4B que no distinga entre la forma mutada o silvestre podría ser eficaz. Por otro lado, la búsqueda de un inhibidor de KRas4B sin afectar a HRas o NRas podría ser tan desafiante como el encontrar un blanco específico para una mutante de KRas4B.

La posibilidad para identificar compuestos que se unen directamente a KRas4B y bloquear su función ha sido el objetivo por más de 30 años, sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados para encontrar compuestos que reconozcan a Ras, han sido en gran medida fallidos, principalmente por la falta de sitios de unión de moléculas pequeñas sobre Ras.

A continuación, describiré algunos de los esfuerzos realizados por la academia científica e industria farmacológica para tratar de inhibir a esta importante proteína, lo que me permitirá exponer una nueva estrategia de inhibición de KRas4B, que es motivo de estudio en este proyecto de tesis.

ANTECEDENTES

“Y cuando despertó, el inhibidor aún no estaba ahí.”

Prevención de la formación Ras-GTP

En 1996 el equipo de Schering-Plough, exploró la unión directa de compuestos con el sitio de unión al nucleótido en Ras, con el objetivo de prevenir la unión de Ras con GTP. En la búsqueda de análogos de GTP, el pirazolo[3,4-*b*]quinolina ribofuranosidos y derivados presenta una afinidad ligeramente mayor a la unión con GDP pero una potencia inhibitoria débil, (Taveras *et al.*, 1997). Sin embargo, el sitio de unión de GDP/GTP de Ras, fue descartado como un objetivo farmacológico debido a su afinidad picomolar de nucleótidos de guanina y la presencia de concentraciones milimolares de GTP. En consecuencia, los compuestos no serían capaces de competir con el GTP endógeno por la unión a Ras.

Inhibidores de modificaciones postraduccionales.

La señalización dependiente de Ras requiere de la correcta localización de las proteínas Ras en la membrana plasmática, mediada por los residuos lipídicos de anclaje a la membrana que se encuentran en el extremo carboxilo terminal de Ras. Por lo que, la deslocalización de Ras ha sido explorada para inhibir la señalización oncogénica de Ras. Las proteínas Ras sufren una serie de modificaciones postraduccionales que incluyen una farnesilación, proteólisis y metilación en el extremo carboxilo terminal, HRas y NRas sufren una palmitoilación adicional (Cox, 2015) (**Fig.3**).

Los inhibidores de farnesil transferasa (FTIs) conducen a Ras citosólico no prenilado. Varios FTIs llegaron a ensayos clínicos avanzados, pero fracasaron en última instancia (Goldstein, 1995), ya que KRas4B y NRas pueden sufrir prenilación alternativa, cuando se bloquea la actividad de la Ftasa por FTIs, las proteínas KRas4B y NRas ya no son farnesiladas pero se convierten en sustratos para geranilgeraniltransferasa (GGTAsa) que cataliza la adición de un grupo geranilo isoprenoide (Whyte *et al.*, 1997). Esta

prenilación alternativa le confiere las mismas funciones a las proteínas como si fueran farnesiladas (Rowell *et al.*, 1997). El fracaso de este gran esfuerzo para desarrollar FTIs originó nuevas ideas para el bloqueo de asociación de las proteínas Ras con la membrana. La combinación de inhibidores de FTasa y GGTasa reduce el desarrollo tumoral en un modelo murino de cáncer de pulmón con KRas4B^{G12D} (Liu *et al.*, 2010). No mostraron eficacia clínica.

También han sido desarrollados miméticos de la farnesil cisteína para competir con el grupo farnesilo de las proteínas Ras por el sitio de unión a membrana plasmática. El ácido farnesiltiosalicílico (Salirasib; **Fig. 8**) que reconoce a galectina presenta eficacia variable en ensayos clínicos en fase 1 y fase 2 (Riely *et al.*, 2011 y Laheru *et al.*, 2012). La diazepiona farnesilada, TLN-4601(**Fig. 8**) fue ineficaz en ensayos clínicos (Campbell *et al.*, 2010).

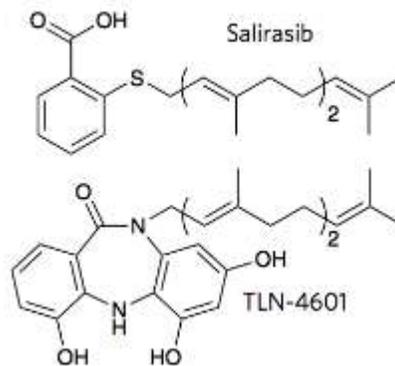


Figura 8| Miméticos de FTasa. Estructuras de moduladores de la localización de Ras. Tomada de Spiegel *et al.* 2014.

Los inhibidores de RCE1 e ICMT también son un posible blanco para tratar de inhibir a KRas4B, sin embargo, el uso de éstos en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) presentan deterioro en la actividad de transformación mediada por HRas. En estudios posteriores hubo más consecuencias, por ejemplo, la deficiencia de RCE1 en células hematopoyéticas de ratón potenciaron el daño mieloproliferativo (Wahistrom *et al.*, 2008). En la deficiencia de ICMT con KRas4B^{G12D} en páncreas, causa incremento de lesiones intraepiteliales pancreáticas y acelera el desarrollo y progresión neoplásica (Court *et al.*, 2013).

La desventaja de los inhibidores de FTasa, ICMT y RCE1 es que pueden tener más de 300 sustratos que contengan el motivo CAAX además de las proteínas de Ras y que estos puedan ser diferencialmente sensibles a la inhibición enzimática (Cox *et al.*, 2014).

Inhibición de la interacción Ras-GEF.

El cambio de nucleótido de Ras-GDP requiere de las proteínas GEF como SOS o RasGRF1 que facilitan la carga de GTP. Éstas GEFs contienen un motivo cambiador de Ras (Rem) y un dominio central de homología-CDC25, que en conjunto forman la subunidad catalítica durante la reacción de cambio. Un motivo de horquilla helicoidal del dominio CDC25 se inserta entre las regiones del *switch* I y II de Ras para abrir el sitio de la unión al nucleótido y liberar el GDP (Cherfils y Zeghouf, 2013).

Experimentos de Resonancia magnética nuclear (NMR) y estudios computacionales muestran que la superficie de las proteínas de Ras es altamente dinámica y revelan sitios transitorios que pueden ser adecuados para la unión de pequeñas moléculas. (Gorfe *et al.* 2008; Grant y *et al.* 2009).

El componente DCAI (**Fig. 9a**) interacciona sobre un sitio localizado entre la hélice $\alpha 2$ y la β -plegada de la proteína KRas4B (**Fig. 9b**). Este compuesto inhibe débilmente al intercambiador de nucleótido SOS1 ($IC_{50}=342 \mu M$) por el bloqueo de la interacción entre Ras y SOS1 y disminuye la activación de Ras en células embrionarias de riñón de humano HEK-293T (Maurer *et al.*, 2012).

El compuesto 13 se une a la proteína KRas4B^{G12D}-GDP, presentando una constante de afinidad ($K_D = 1.3-2.0 \text{ mM}$) (**Fig. 9c**). Este compuesto muestra afinidad similar para la proteína KRas4B mutada y silvestre y la proteína HRas, indicando un sitio de unión conservado en las proteínas Ras (Sun *et al.*, 2012). La estructura cristalográfica de KRas4B-GDP muestra la interacción con el compuesto 13 al mismo sitio de interacción identificado para el DCAI (**Fig. 9d**) (Spiegel *et al.* 2014).

La desventaja que presentan estos compuestos es que tienen una baja afinidad para unirse a la proteína KRas4B. El descubrimiento de análogos podría mejorar la afinidad de unión de la proteína. Si esto se lograra, sería un compuesto muy controvertido, en el contexto de la actividad de las proteínas mutadas independientemente que no fuera mutante específica.

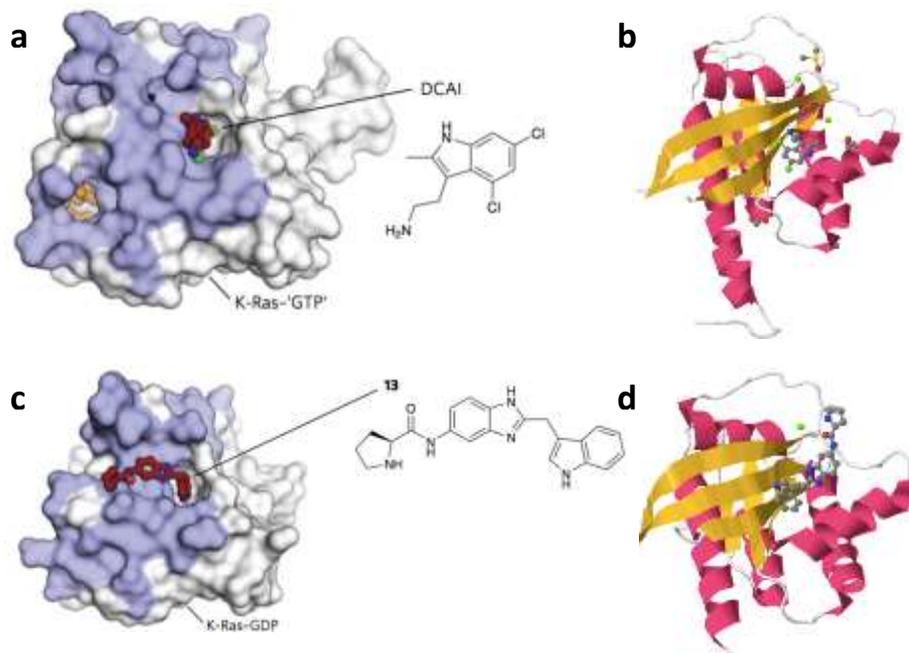


Figura 9| Inhibición de la interacción Ras-GEF. a. Estructura del ligando DCAI en complejo con KRas4B-GTP. b. Estructura tridimensional del complejo KRas4B-DCAI (PDB: 4DST). Método: Difracción de Rayos-X, Resolución de 2.3 Å. c. Estructura del ligando 13 en complejo con KRas4B-GDP. d. Estructura tridimensional del complejo KRas4B-13 (PDB: 4EPY). Método: Difracción de Rayos-X, Resolución de 1.8 Å. DCAI y 13 se unen a una cavidad hidrofóbica similar. Los residuos que están implicados en la unión SOS están resaltados en azul. En rosa podemos observar las estructuras α -hélice, y en cobrizo las estructuras β -plegada. Tomada de Spiegel *et al.* 2014., y *Protein Data Bank*.

Inhibidores de mutante específica

Un enfoque particularmente novedoso detalla la unión selectiva de pequeñas moléculas a la mutación G12C de la proteína KRas4B (KRas4B^{G12C}), esta mutación es la más frecuente en cáncer de pulmón (Fig. 7). La función del grupo tiol de la cisteína 12 fue utilizada para atrapar covalentemente inhibidores (Fig. 10a) (Ostrem *et al.*, 2013 y Lim *et al.*, 2013).

El componente SML-8-73-1 (**Fig. 10b**) se une covalentemente a KRas^{G12C} incluso en la presencia de concentraciones milimolares de GDP y GTP, este induce una conformación que simula el estado inactivo (KRas4B^{G12C}-GDP). SML-10-70-1 (**Fig. 10b**) muestra actividad antiproliferativa en células dependientes de Ras que expresan KRas4B^{G12C} (Concentración efectiva media, EC₅₀ = 27-47 μM). Sin embargo, se observa una eficacia similar en células que expresan KRas4B^{G12S} (EC₅₀ = 44 μM) indicando una posible alternativa y un modo de acción no selectivo (Lim *et al.*, 2013).

Las vinil sulfonamidas (VSAs) y acrilamidas (AAs) presentan la característica de formar puentes disulfuro con la Cys de la proteína KRas^{G12C}-GDP, la cual unida a VSA9 muestra un sitio de unión desconocido, resultante de un rearrreglo conformacional de las regiones *switch* I y II (**Fig. 10c**). AA12 (**Fig. 10d**), es una potente acrilamida que no modifica la conformación de la proteína KRas4B^{WT} y es selectiva para KRas4B^{G12C}, induce acumulación de Ras-GDP disminuyendo los niveles de Ras-GTP, reduce la asociación de las proteínas Ras con Raf, afecta la viabilidad celular, induce apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón transformadas con KRas4B^{G12C} (EC₅₀ ≥ 0.32 μM). Notablemente, las líneas celulares que presentan la mutación G12C muestran respuestas variadas, mientras que las líneas celulares que carecen de la mutación son insensibles al tratamiento con el compuesto (Ostrem *et al.*, 2013).

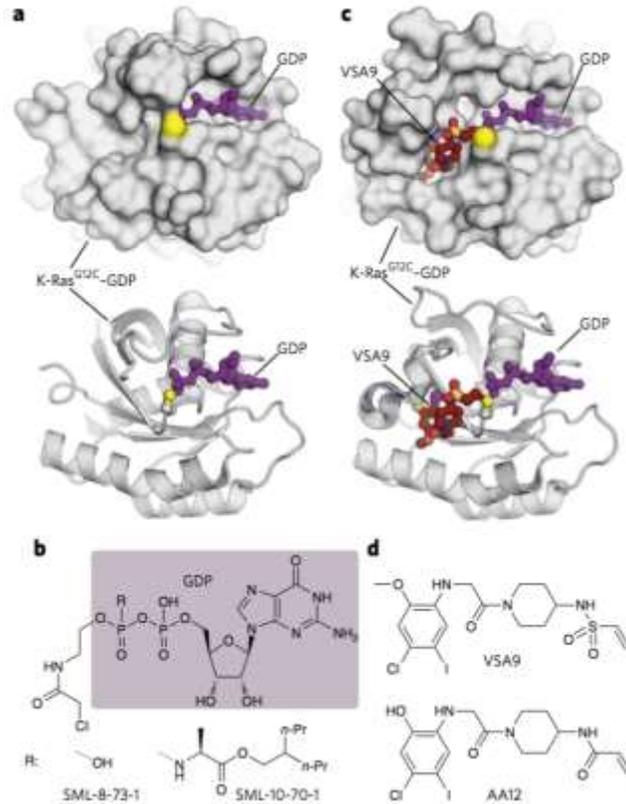


Figura 10| Inhibidores covalentes específicos para KRas4B^{G12C}. **a.** Estructura cristalográfica de KRas4B^{G12C}-GDP (PDB ID: 4L8G) representada en isosuperficie y listones. La mutación G12C está representada en amarillo. **b.** Inhibidor derivado de GDP SML-8-73-1 y el análogo SML-10-70-1. **c.** Estructura cristalográfica de KRas4B^{G12C}-GDP en unión al inhibidor VSA9 (PDB ID: 4LYJ). **d.** Inhibidor VSA9 y AA12. Tomada de Spiegel *et al.* 2014.

Inhibidores de vías de señalización río abajo de Ras

Cuando se hizo evidente que la búsqueda de un compuesto orientado directamente a las proteínas mutadas de Ras era técnicamente imposible con las herramientas disponibles en ese momento, varios grupos de investigación se enfocaron a bloquear a las proteínas de la señalización de Ras.

Las mutantes de Ras promueven la iniciación y progresión tumoral, a través de la activación de tres principales vías de señalización río abajo RAF, RalGEF y PI3K. La mutante de Ras recluta a RAF (una cinasa treonina/serina citosólica) en la membrana plasmática, para activar la

cascada de señalización MEK/ERK. Esta rama efectora RAF/MEK/ERK de Ras induce proliferación, angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima (EMT). Ras mutante también activa a RalGEFs, ésta activa a RalA y a RalB para conducir tumorigénesis. Finalmente la mutante de Ras recluta y activa a PI3K a través de la subunidad regulatoria p85, resultando en la fosforilación de fosfoinosítidos e inducción de las vías de señalización que permiten angiogénesis, morfología transformada y supervivencia de células de cáncer (Cox *et al.*, 2014)

La cascada RAF-MEK-ERK es el centro de una red de señalización compleja que tiene múltiples entradas y salidas, mecanismos de alimentación y retroalimentación, y varias proteínas que regulan la señalización dinámica y actividad de ERK. Más de 200 sustratos han sido definidos para ERK1 y ERK2 y estos añaden futura complejidad a su vía efectora. No es sorprendente que la inhibición farmacológica de la activación de ERK ya sea a nivel de RAF o MEK podría ser equivalente a bloquear la activación de ERK, las cuales han sido probadas como no funcionales (Roskoki, 2012).

Al menos 11 inhibidores farmacológicos de RAF han sido rechazados en la evaluación clínica, cuatro han sido aprobados por la Administración de medicamentos y alimentos o FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) (**Fig. 11**). El sorafenib fue originalmente desarrollado como inhibidor de RAF (Lyons, 2001), la eficacia antitumoral es probablemente por la habilidad de bloquear a la tirosina cinasa que está involucrada en la angiogénesis tumoral, así como miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) (Wilhelm, 2004). El vemurafenib y dabrafenib, han sido aprobados para el uso de BRAF mutado en melanoma metastásico (Lito *et al.*, 2013). Paradójicamente cuando estos inhibidores fueron evaluados en células de cáncer con Ras mutado, se observó activación de ERK en lugar de inactivación (Hatzivassiliou *et al.*, 2010). La dimerización de la proteína RAF, la cual es mediada por la activación de Ras, causa activación de RAF y la primera generación de inhibidores de RAF

promueven su dimerización (Su *et al.*, 2012). Esto explica por qué el inhibidor de RAF induce el desarrollo de tumores benignos en piel, incluyendo queratoacantomas y carcinomas de células escamosas de la piel en individuos con KRas4B mutante (Oberholzer *et al.*, 2011). Inhibidores de segunda generación de RAF muestran actividades alentadoras y no promueven la dimerización de esta proteína, éstos compuestos están bajo consideración y podrían ser más eficaces a largo plazo (Freeman *et al.*, 2013).

Al menos 15 inhibidores de MEK han sido rechazados en la evaluación clínica (**fig. 11**). Trametinib (GSK112021) es un fármaco aprobado por la FDA para tratamiento de melanoma metastásico con BRAF mutado, inhibe a MEK1 y MEK2 y presentan alta selectividad y estos han sido efectivos en contra de la enfermedad. Sin embargo, estos han sido parcialmente efectivos en cánceres que presentan a la proteína Ras mutada en líneas celulares tumorales humanas (Gilmartin *et al.*, 2011) y en modelos murinos de cáncer (Engelman *et al.*, 2008). Los mecanismos de activación de MEK mediados por las proteínas Ras son distintos a los de BRAF, lo que sugiere que la activación influye en la respuesta a inhibidores específicos de MEK. Por ejemplo, los inhibidores que funcionan similar a GDC-0623 y G-573 son más efectivos en cánceres con Ras mutado debido a que forman un puente de hidrógeno con S212 de MEK y bloquean la fosforilación de retroalimentación dependiente de RAF. Mientras los que funcionan de manera similar a cobimetinib (CDC-0973) presentan una mejor inhibición de MEK (Hatzivassiliou *et al.*, 2013). El inhibidor dual de RAF-MEK RO5126766 puede funcionar de una manera similar (Ishii *et al.*, 2013).

La resistencia a inhibidores de MEK en las células de cáncer con mutaciones en la proteína Ras pueden ocurrir por la sobreexpresión de la actividad del receptor tirosina cinasa o por la amplificación de activadores río arriba que potencian un flujo a través de las vías de señalización para incrementar la actividad de ERK (Duncan *et al.*, 2012). En pacientes con

melanoma que presentan la proteína BRAF mutada, la inhibición de la fosforilación de ERK mayor al 80% es necesario para lograr una respuesta terapéutica (Bollag *et al.*, 2010).

Los mecanismos de resistencia a los inhibidores de RAF o MEK son a menudo por la reactivación de ERK, por lo que un enfoque obvio sería el uso de un inhibidor de ERK. Tres inhibidores de ERK han entrado en la evaluación clínica (**Fig. 11**) y un análogo de uno de ellos (MK-8353; también conocido como SCH9000353) ha sido caracterizado en modelos preclínicos (Morris *et al.*, 2013). Sin embargo, los inhibidores de ERK al igual que los de MEK bloquean la fosforilación de retroalimentación e inactivación de RAF, el cual conduce a potenciar la activación de MEK. La inhibición combinada de la cascada RAF-MEK-ERK podría proporcionar una inhibición más eficaz (Cox *et al.*, 2014).

La segunda clase de efectores de Ras mejor validada son la de PI3Ks, se compone de las subunidades catalíticas de p110 (subunidades α , γ y δ). Al menos 53 inhibidores de la señalización PI3K-AKT-mTOR se encuentran bajo evaluación clínica (**Fig.11**). Como monoterapia, estos no han sido clínicamente relevantes contra el cáncer en presencia de la proteína Ras mutada. Sin embargo, en modelos murinos, se ha observado que existe una actividad sinérgica potente con inhibidores de la señalización de ERK-MAPK (Engelman *et al.*, 2008).

Si bien, la inhibición de efectores podría ser una estrategia prometedora dirigida hacia Ras, los retos siguen siendo considerables. La inhibición de cualquier vía de un efector se complica por los mecanismos de compensación, lo que requiere inhibición en múltiples puntos y la inhibición simultánea de múltiples vías también sería requerida. Esto ha provocado que tanto en la evaluación preclínica y clínica realicen combinación de inhibidores para RAF y PI3K con el objetivo de bloquear más eficazmente las vías de señalización (Britten, 2013). Estas combinaciones podrían conllevar a un aumento en la toxicidad celular.

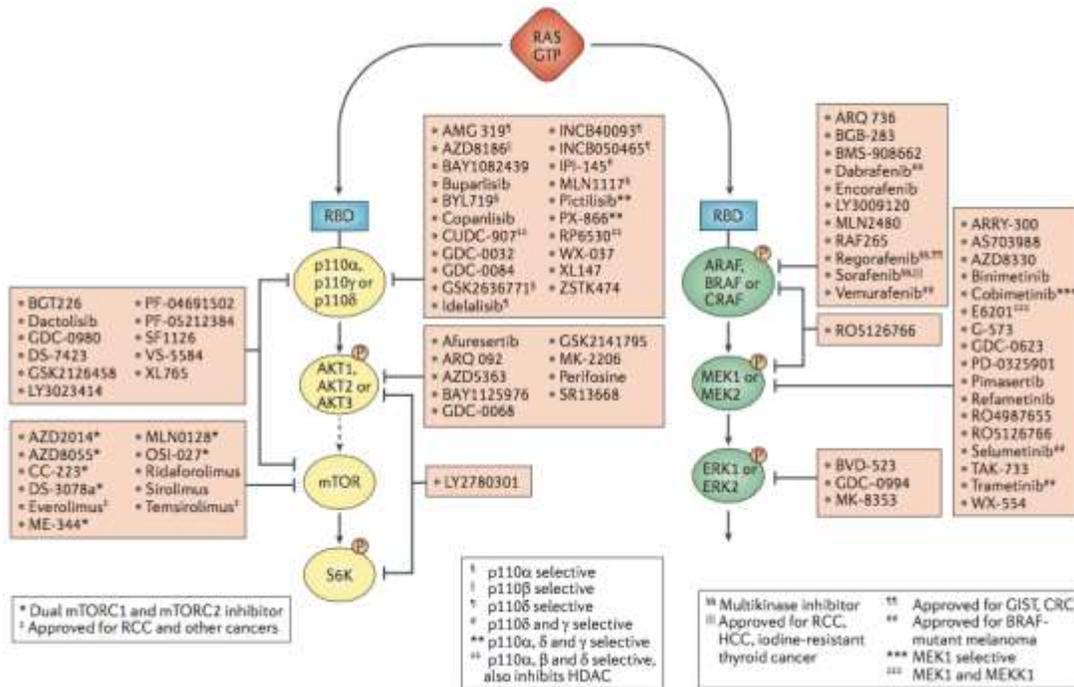


Figura 11| Inhibidores de efectores de la señalización de Ras bajo evaluación clínica. Las proteínas Ras se unen al dominio de unión de Ras (RBD) a las subunidades catalíticas α -, γ - y δ - de p110 de la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) de clase I. mTOR (*Mammalian target of rapamycin*). CRC, cáncer colorectal; ERK, cinasa que regula las señales extracelulares. GIST, tumor estromal gastrointestinal; HCC, carcinoma hepatocelular; MEK, cinasa MAPK-ERK; MEKK, MEK cinasa, RCC, carcinoma de células renales. Tomada de Cox *et al.* 2014.

Inhibidores de PDE δ

La inhibición de la activación de Ras mediante el uso de un inhibidor de la proteína PDE δ , Deltarasin (**Fig. 12**), este altera la asociación de Ras a la membrana plasmática, inhibe la interacción KRas4B-PDE δ e induce la relocalización de las proteínas Ras a endomembranas en concentraciones nanomolares, reduce la viabilidad celular y la fosforilación de Erk1 de manera dosis-dependiente en líneas celulares de cáncer pancreático que presentan a la proteína KRas4B mutado y provoca un retardamiento tumoral en un modelo murino ortotópico de células de carcinoma pancreático humano (Zimmermann *et al.*, 2013).

Deltazinona 1, un análogo del Deltarasin, presenta mayor afinidad a la cavidad hidrofóbica de PDEδ, sin embargo, no logra mejorar el efecto del Deltarasin para inducir apoptosis e inhibir la fosforilación de Erk sobre las líneas celulares dependientes de KRas4B, este efecto se atribuye el desplazamiento de Deltazinona 1 de PDEδ es más eficiente por la actividad de Arl2. Este compuesto se metaboliza rápidamente en ratón por lo que no es apto para experimentos *in vivo* (Papke *et al.*, 2016).

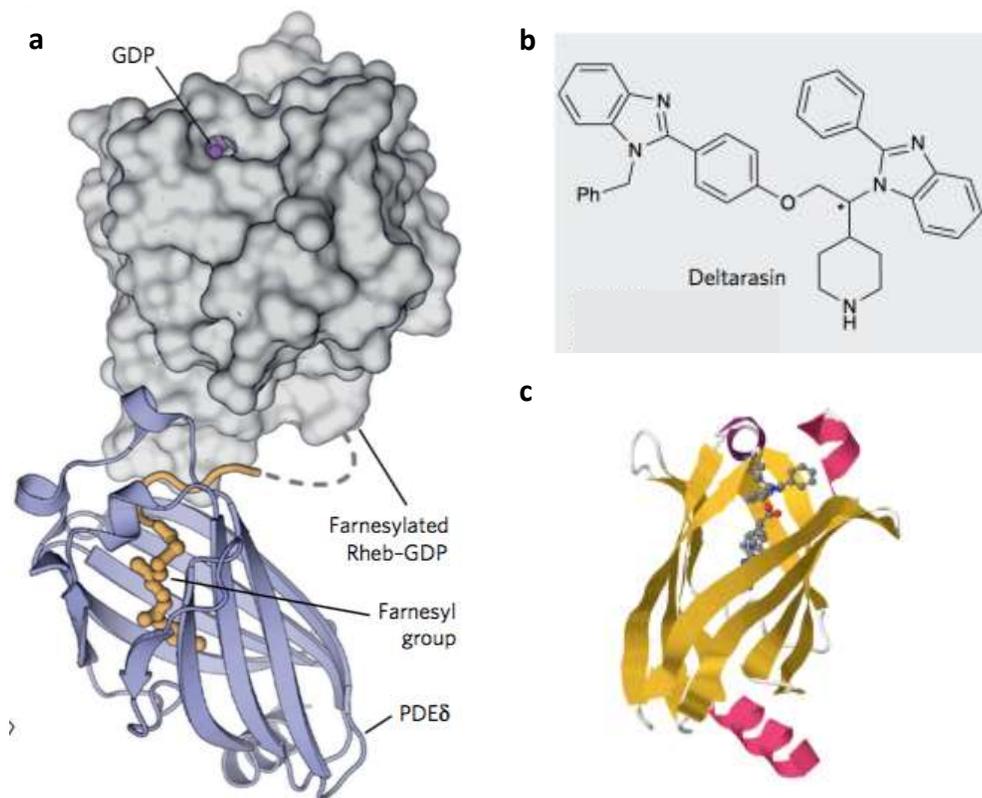


Figura 12| Inhibición de la interacción KRas4B-PDEδ. **a.** Estructura cristalográfica de la GTPasa RhoB en complejo con PDEδ (PDB: 3T5G). El grupo farnesilo que se encuentra en el extremo carboxilo terminal (naranja) de RhoB se une a la cavidad hidrofóbica de la PDEδ. **b.** Estructura del Deltarasin. **c.** Estructura cristalográfica del inhibidor unida a PDEδ (PDB: 4JVF). Tomada de Spiegel *et al.* 2014., y *Protein Data Bank*.

Es necesario mencionar que el Deltarasin y la Deltazinona 1 no son inhibidores de Ras pero si inhibidores de PDEδ, teniendo en cuenta que la

PDE δ no es un transportador exclusivo de KRas4B sino que también reconoce a otras proteínas farnesiladas, por lo que la función de otras proteínas reguladas por PDE δ también se vería afectadas. Esta posibilidad ha causado preocupación sobre los efectos secundarios no deseados y una posible toxicidad. Sin embargo, en este contexto, los ratones *knockout* de PDE δ son viables (Zhang *et al.*, 2007), sugiriendo que otros quimiotipos pueden ser desarrollados por esta vía.

De acuerdo con lo anterior, planteamos estabilizar específicamente el complejo molecular KRas4B-PDE δ , creemos que la estabilización evitará que el complejo molecular se disocie y KRas4B no pueda internalizarse en la membrana plasmática, y de esa manera detener su actividad y señalización de las vías río abajo de la proteína. Adicionalmente creemos que al inducir la estabilización del complejo molecular tendría ventaja ya que el compuesto reconocería exclusivamente a KRas4B-PDE δ , sin afectar a otros complejos proteínicos formados por PDE δ . No es posible estabilizar al complejo con KRas4B mutante específica por la lejanía del residuo de la mutación al sitio de interacción de KRas4B con PDE δ .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Siendo KRas4B una proteína primordial involucrada en el desarrollo de los tipos de cáncer más letales. En los últimos 35 años se ha intensificado el interés en la búsqueda de inhibidores de KRas4B, con el objetivo de obtener agentes quimioterapéuticos, hasta la fecha no se ha encontrado un compuesto que inhiba eficientemente la señalización de esta importante proteína. Por lo tanto, la obtención de nuevas moléculas que estabilicen el complejo molecular Kras4B-PDEδ, hace muy interesante su estudio y evaluación.

HIPÓTESIS

Un compuesto específico que estabilice el complejo proteínico KRas4B-PDEδ, conduce a la inactivación de KRas4B e inhibición de su señalización, repercutiendo en la inhibición tumoral.

OBJETIVO

Identificar moléculas orgánicas que actúen como estabilizadores del complejo molecular KRas4B-PDEδ a través de la técnica de simulación del reconocimiento proteína-ligando (*virtual screening*) y evaluar su impacto en la señalización de KRas4B *in vitro* y el efecto sobre un modelo tumoral *in vivo*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener mediante modelado molecular por homología la estructura tridimensional del complejo proteico KRas4B-PDEδ.
2. Identificar a través de *virtual screening* ligandos específicos contra el complejo KRas4B-PDEδ.
3. Conocer el efecto de los compuestos identificados como ligandos potenciales sobre la viabilidad y muerte celular sobre líneas celulares de cáncer páncreas.
4. Determinar el grado de la activación de Ras así como su señalización río abajo en presencia de los compuestos.
5. Evaluar el impacto de los compuestos, en la formación tumoral en un modelo murino ortotópico de células de carcinoma pancreático humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelado molecular y *virtual screening*

Para realización del modelado molecular por homología molecular, *virtual screening*, se empleó el paquete computacional de **Molecular Operating Environment (MOE versión 2007.09)** Chemical Computing Group (www.chemcomp.com).

Modelado molecular por homología

Se construyó el modelo molecular por homología del complejo molecular KRas4B-PDEδ, basándose en una estructura cristalográfica previamente reportada del complejo Rheb-PDE6D, la cual se encuentra disponible en el *Protein Data Bank* o PDB (www.rcsb.org) con clave de acceso 3T5G.

Primeramente se modelaron los residuos faltantes utilizando *MOE_Mutation* en la estructura cristalográfica 3T5G que no fueron resueltos durante la difracción de rayos X. Seguidamente se realizaron alineamientos entre las secuencias de los complejos KRas4B-PDEδ y Rheb-PDEδ utilizando *Align* de UniProt (www.uniprot.org/align) y *MOE_Align*, con la finalidad de que las mutaciones, inserciones, y las pérdidas de aminoácidos produjeran la menor disrupción a la estructura.

En una primera instancia, se construyeron varios modelos moleculares por homología de complejo KRas4B-PDEδ empleando la función *MOE_HomologyModel* y utilizando tres niveles de refinamiento estructural (minimización de la energía). El modelo **A** se construyó utilizando el siguiente esquema: Para los modelos intermedios se aplicó una minimización de la energía con gradiente *Medium* y para el modelo final (el cual es seleccionado mediante una función de puntaje) una minimización de la energía de gradiente *Medium*; para el modelo **B** en los modelos intermedios se aplicó un gradiente *Medium* y en el modelo final un gradiente *Fine* y para el modelo **C** en los modelos intermedios se aplicó un gradiente *Fine* y en el modelo final un gradiente *Fine*. El modelo que presentó menor valor de RMSD con

respecto estructura molde se le realizó una nueva minimización de la energía a tres diferentes valores de gradiente de energía (RMS): 0.1, 0.05 y 0.0001. En todos los casos, el campo de fuerzas utilizado en la minimización de la energía fue CHARMM27. Finalmente, para el modelo con menor energía potencial se construyó el mapa de Ramachandran con la finalidad de corroborar que los ángulos phi y psi se encontraran en zonas permitidas.

Virtual screening

Previo a la realización del *virtual screening* se identificaron los sitios potenciales de unión a ligandos sobre la superficie del modelo tridimensional de KRas4B-PDE δ obtenido por modelado, haciendo uso de *MOE_SiteFinder*. Las cavidades localizadas en la superficie fueron analizadas y se seleccionaron como blancos aquellos que se localizaran en la región interfacial del complejo con la intención de estabilizarlo. Adicionalmente, fueron privilegiados los sitios de unión que tuvieron mayor número de residuos no conservados entre los miembros que conforman a la familia de las GTPasas de Ras.

Construcción de confórmers estructurales de los compuestos de la base de datos 3D Diversity Set.

Los compuestos con potencial farmacológico utilizados en el *virtual screening* fueron los contenidos en la quimioteca 3D *Diversity Set* proporcionada por la empresa Enamine (www.enamine.net), la cual contiene 50,240 compuestos. Primeramente, los compuestos fueron convertidos a estructuras tridimensionales utilizando *MOE_energyminimize*. Luego se construyeron confórmers estructurales de cada uno de los compuestos utilizando *MOE_importconformations* reteniendo aquéllas con energía igual o menor a 0.3 kcal/mol para evitar que las estructuras de los compuestos presenten tensión interna. Los ligandos que no cumplieron con las reglas de Lipinski (Lipinski *et al.* 2001) fueron excluidos durante esta etapa del proceso. La asignación de cargas sobre cada átomo y minimización de la energía se

realizó empleando el campo de fuerzas MMFF94x, parametrizado para moléculas orgánicas pequeñas.

Interacción proteína-ligando o *Docking*

El *virtual screening* se llevó a cabo utilizando la función *MOE_Dock*. Se evaluaron 100,000 orientaciones diferentes para cada conformero en cada sitio de unión y se construyó una nueva base de datos que contenía solo las 10 mejores orientaciones en términos de la función de puntaje para cada conformero. La función de puntaje evalúa la parte entálpica del proceso de formación del complejo proteína-ligando en términos de la complementariedad del ligando con el sitio de unión, la energía de contacto entre las moléculas y la energía conformacional o de tensión del ligando. La base de datos generada fue ordenada por puntaje y por estructura del ligando y el análisis se centró en los primeros 20,000 ligandos.

Finalmente, aquellos complejos que mostraron los mejores puntajes fueron seleccionados para sus análisis ulteriores. Los criterios utilizados para la selección de los potenciales inhibidores fueron: ligandos que presentaron altas frecuencias de aparición dentro de los mejores puntajes de selección utilizados, posteriormente se realizó una minimización de energía tanto al ligando como al complejo donde fueron evaluadas las interacciones puente de hidrógeno así como puentes salinos verificando que los ligandos estuvieran interactuando tanto con KRas4B como con PDE δ (*MOE_Ligandinteraction*), también se tomó en cuenta la masa molecular del ligando.

Reactivos

Los compuestos D14 y C22 fueron adquiridos de la compañía ENAMINE (Kyiv, Ucrania), estos fueron disueltos con DMSO a una concentración final de 1.5 %, este fue adquirido de SIGMA-ALDRICH con no. de catálogo 276855-1L. El Deltarasin fue adquirido de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

Cultivo Celular

La línea celular de cáncer pancreático humano MIA PaCa-2 y la línea celular epitelial normal pancreática hTERT-HPNE, fueron adquiridas de *American Type Culture Collection* (ATCC; Nanassas, VA). Las líneas celulares fueron cultivadas en monocapa en el medio específico y condiciones sugeridas por ATCC. Las células fueron tratadas con los reactivos como se indica.

Viabilidad celular

Las líneas celulares fueron cultivadas con una densidad de 20 000 células por pozo sobre una placa de 96 pozos fondo blanco y plano en medio de crecimiento, permitiendo su adhesión por un espacio de 24 h. Se les colocó el tratamiento a diferentes concentraciones de D14, C22 (200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 μ M), DMSO y sin tratamiento, la viabilidad celular se evaluó durante 5 días durante cada 24 h utilizando el *Kit CellTiter-Glo Assay* (Promega, Madison, WI). Los datos fueron analizados usando GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA), con estos se calculó la concentración del compuesto que resulta en una inhibición del 50% de la viabilidad celular (IC_{50}). Todos los ensayos fueron repetidos 5 veces.

Muerte celular

Las células fueron cultivadas en monocapa en placas de 6 pozos, una vez alcanzando el 80% de confluencia fueron tratadas con los compuestos D14, C22 y DMSO. La muerte celular fue medida mediante citometría de flujo siguiendo las instrucciones de Apoptosis/Necrosis Detection Kit ab176749 (Abcam, Cambridge, United Kingdom). La intensidad de fluorescencia de las células en apoptosis se determinó a una longitud de (Ex / Em= 490/525 nm) con la Apoxina V, un análogo de Anexina V, la necrosis se detectó usando el indicador 200X 7AAD que se intercala con el DNA (Ex / Em= 550/650 nm) y las células vivas se detectaron con citocalceina violeta (Ex / Em= 405/450 nm), la cual solo se une a células metabólicamente activas.

Activación de Ras

Las células fueron cultivadas en monocapa, una vez alcanzando el 80 % de confluencia fueron privadas de suero durante 16 h., posteriormente fueron pre-incubadas con D14, C22 a una concentración de 200 μ M y DMSO durante 1 h, pasando el tiempo de incubación se le adicionó el factor de crecimiento epidermal EGF (100 ng/mL), se obtuvieron los lisados celulares (1mg/mL) después de 3, 6, 12, 30 y 60 min en presencia del EGF, los lisados fueron añadidos a cada pozo de la placa de 96 pozos donde contiene la proteína de unión a Ras (Raf-RBD), la activación fue determinada siguiendo las instrucciones de G-LISA Ras activation assay kit (Cytoskeleton, Denver, CO).

Activación de las vías de señalización río abajo de Ras

Las células fueron cultivadas en monocapa, una vez alcanzando el 80 % de confluencia fueron privadas de suero durante 16 h., posteriormente fueron pre-incubadas con D14 y C22 durante 1 h y Deltarasin por 2 h, pasando el tiempo de incubación se le adicionó el factor de crecimiento epidermal EGF (100 ng/mL) por 10 min. Se obtuvieron los lisados totales y se realizó un Western Blot. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-phospho-Akt (sc-7985-R; Santa Cruz Biotechnology), anti-Akt (P-2482; Sigma-Aldrich), anti-phospho-ERK1/2 [pTpY185/187], (44-680G; Thermo Fisher Scientific), anti-ERK1/2 (sc-135900; Santa Cruz Biotechnology) y anti-actina (sc-1616; Santa Cruz Biotechnology).

Efecto de los compuestos de estudio en un modelo tumoral ortotópico utilizando ratones un/nu

Ratones inmunodeficientes un/nu machos, de 6 semanas de edad fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos con comida estéril. Los animales fueron inyectados subcutáneamente sobre el torso con 5×10^6 células de MIA PaCa-2, cuando las células alcanzaron tumores palpables ($> 80 \text{ mm}^3$), fueron divididos aleatoriamente dentro de cinco grupos administrando, DMSO, 20 y 10 mg kg^{-1} de D14 y C22 mediante inyección

peritoneal 3 veces por semana durante 2 semanas. El tamaño tumoral fue calculado utilizando la siguiente fórmula: $\frac{\pi}{6}[D \times d^2]$, donde d es diámetro menor y D es diámetro mayor, en milímetros.

RESULTADOS

Para poder encontrar moléculas orgánicas *in silico* que interactúen con el complejo KRas4B-PDE δ fue empleada la técnica de *virtual screening*. Esta herramienta ha sido extremadamente útil para comprender las interacciones proteína-ligando en el desarrollo de fármacos, en el **APENDICE A** se describe acerca de la importancia de esta herramienta. Los ensayos *in silico* fueron realizados bajo la supervisión del **Dr. Ponciano García Gutiérrez** en la UAM Iztapalapa.

1. Obtener la estructura tridimensional del complejo KRas4B-PDE δ mediante modelado molecular por homología.

La estructura cristalográfica del complejo Rheb-PDE δ representa un blanco para realizar el modelado por homología del complejo KRas4B-PDE δ .

Cuando se realiza un análisis tipo *docking* es necesario disponer de la estructura tridimensional de la molécula con la que se trabajará, en este caso, la del complejo molecular KRas4B-PDE δ . Sin embargo, la estructura cristalográfica de este complejo no se encuentra reportada, por lo que fue necesario hacer uso de herramientas computacionales para construir un modelado molecular por homología del complejo KRas4B-PDE δ . En la construcción de un modelo molecular es necesario conocer una molécula con estructura tridimensional ya conocida que presente una identidad en secuencias mayor o igual 30% a la que se quiere modelar, en este caso se encuentra reportada en el *Protein Data Bank* la estructura cristalográfica de la GTPasa Rheb en complejo con PDE δ (PDB: 3T5G) **Fig.12a**. Considerando la similitud en estructura que presentan las GTPasas (en este caso KRas4B y Rheb) y la identidad que en este caso es del 32 % (**Fig. 13**), lo hace un complejo posible para ser utilizado como plantilla y así obtener el modelo molecular por homología.

```

KRas4B_Hs 1 ---MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILD 57
Rheb_Hs   1 MPQSKSRKTAITLGYRSVGKSSLTIQFVEGQFVDSYDPTIENTFTKLITVNGQEYHLQLVD 60
      .. *.:*: * .****.*****: :****.*****: : * :.:*: *.:*:

KRas4B_Hs 58 TAGQEEYSAMRDQYMRGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREIKRVKDSQVPMVLVGNK 117
Rheb_Hs   61 TAGQDEYSIFPQTYSIDINGYILVYSVTSIKSFEVIKVIHGKLLDMVGKVOIPIHLVGNK 120
      ****:* * : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :

KRas4B_Hs 118 CDLPSRT-VDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTROGVDDAFYTLVREIRKHKKEKMSKDGGK 176
Rheb_Hs   121 KDLHMERVISYEEGKALAESWNAAFLESSAKENQTAVDVFRRTILEAEKMDGA----- 173
      ** . : . : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

KRas4B_Hs 177 KKKKSKTKCVIM 188
Rheb_Hs   174 -ASQGKSSCSVM 184
      . : . : * : *

```

Figura 13| Alineamiento de la secuencia de KRas4B con la de Rheb. El alineamiento de las GTPasas se realizó utilizando el servidor *Align* de UniProt (<http://www.uniprot.org>). El símbolo (*) indica que en esa posición los residuos son idénticos, (:) indica sustituciones conservativas, (.) sustituciones menos conservativas. Los residuos conservados se encuentran sombreados. Este alineamiento presenta una identidad del 32 %.

Fue utilizada la estructura cristalográfica de KRas4B^{G12D} (PDB: 4TQ9) obtenida por difracción de Rayos-X para corroborar la similitud en estructura con la proteína Rheb (**Fig. 14**), la superposición de ambas GTPasas presenta una desviación del valor cuadrático medio o RMSD (del inglés *root-mean-square deviation*) de 2.63 Å. El RMSD nos da una medida de la distancia media entre los átomos en posiciones equivalentes, por ejemplo, en la superposición de estructuras homologas, indicando la similitud en la estructura tridimensional. Este valor corrobora que las proteínas KRas4B y Rheb presentan estructuras similares, por lo que fue posible utilizar al complejo Rheb-PDEδ para la construcción del modelo molecular por homología de KRas4B-PDEδ.

En la **Fig. 14** se observa la mutación de la proteína KRas4B (marcada con esferas amarillas), presenta un cambio de G por V en el residuo 12, esta región es la que sufre mayor frecuencia de mutaciones en la proteína, la mutación se encuentra muy alejada de la zona de interacción de las proteínas por lo que difícilmente se podría encontrar un compuesto que estabilice al complejo proteico que reconozca la mutación específica de KRas4B.

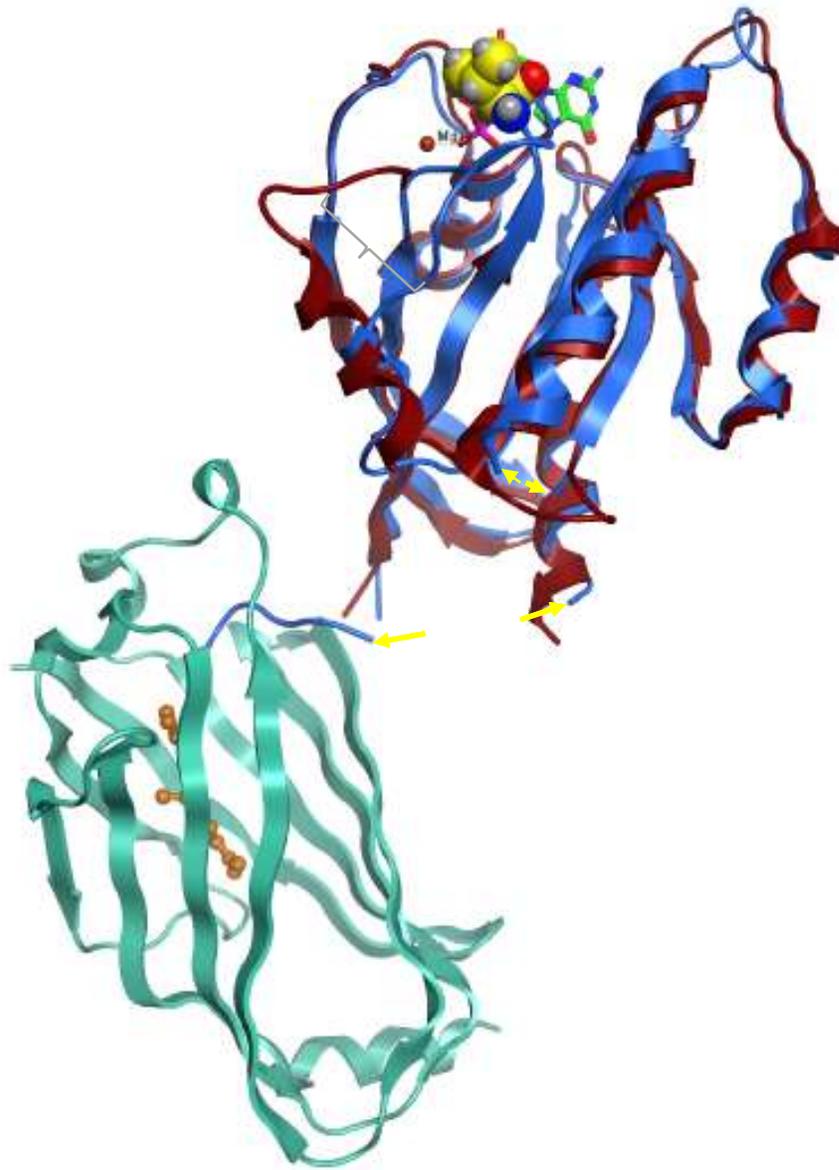


Figura 14| Superposición de la estructura cristalográfica del complejo RHEB-PDE δ con KRas4B^{G12V}. El complejo (PDB: 3T5G) se encuentra formado por la proteína RHEB (color azul) en interacción con PDE δ (color verde) a través del grupo farnesilo (color naranja), los residuos no revelados en la estructura de la GTPasa son señalados con flechas amarillas. La proteína KRas4B^{G12D} (PDB: 4TQ9, color vino) presenta la unión a GDP (carbonos en color verde) y la presencia del Mg⁺² (esfera de color vino), la mutación G12V en la proteína está representada con esferas (carbonos en color amarillo). Oxígeno y Nitrógeno están de color rojo y azul respectivamente y el grupo fosfato en rosa. El corchete en verde indica una separación entre KRas4B y Rheb RMSD de la superposición de las GTPasas es de 2.63 Å.

La estructura cristalográfica del complejo Rheb-PDEδ reportado por Ismail y colaboradores en 2011 se encuentra incompleta en dos regiones, la primera región en los residuos Gly108, Lys109, Val110 y Gln111, en la segunda región los residuos Asp171, Gly172, Ala173, Cys174 y Ser175 de la GTPasa Rheb; y los residuos Gly1, Ser2, Met3, Ser4 y Ala5 de la proteína PDEδ no fueron revelados en la estructura cristalográfica, estas regiones se muestran señalados con flechas amarillas en la **Fig. 14**. Por lo que fue necesario completar las secuencias y modelar los residuos faltantes con *MOE_mutation*.

Optimizando la geometría del modelado molecular.

Una vez completa la secuencia del complejo Rheb-PDEδ, se realizó un alineamiento de las secuencias de cada complejo, posteriormente se utilizó *MOE_homologymodel*. Se generaron tres complejos KRas4B-PDEδ utilizando distintos niveles de refinamiento estructural (minimización de energía) con la finalidad de corregir errores estructurales. En la **Fig. 15** se observa cada modelo del complejo obtenido mediante el uso de distintos refinamientos en superposición con el complejo Rheb-PDEδ.

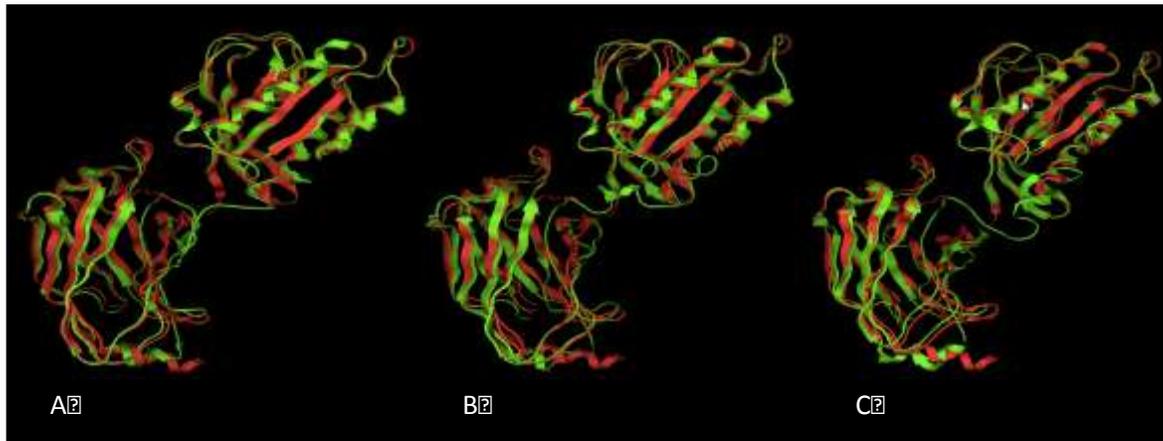


Figura 15| Modelos moleculares del complejo KRas4B-PDEδ superpuestos con Rheb-PDEδ. Los modelos obtenidos fueron generados utilizando tres niveles de refinamiento estructural: **Modelo A.** *Medium-Medium*. **Modelo B.** *Medium-Fine*. **Modelo C.** *Fine-Fine*. Cada uno de estos modelos en color verde está superpuesto con la estructura cristalográfica 3T5G en color rojo.

Se calculó el RMSD para cada uno de los modelos moleculares superpuestos con Rheb. Obteniendo los siguientes resultados:

Modelo A: 1.62698 Å

Modelo B: 2.11019 Å

Modelo C: 2.04732 Å

El **Modelo A** presenta el valor de RMSD más bajo, quiere decir que presenta una estructura más similar con la molécula blanco.

Mejorando la configuración del modelo molecular KRas4B-PDEδ.

Con la finalidad de evitar geometrías distorsionadas en el modelo KRas4B-PDEδ se realizó una minimización de energía al **Modelo A** utilizando el campo de fuerza CHARMM27 empleando diferentes valores de RMS, **AA:** 0.1, **AB:** 0.05 y **AC:** 0.0001. Este campo de fuerza es una función matemática que se compone de la suma de términos que modelan las tensiones de los enlaces, de sus ángulos, sus torsiones, electrostáticas y las interacciones de Van der Waals, con el objetivo de liberar restricciones internas en proteínas. Para cada estructura fue calculada la energía potencial.

Energía Potencial AA: -2201.8887 kcal/mol

Energía Potencial AB: -2255.5841 kcal/mol

Energía Potencial AC: -2403.7269 kcal/mol

Entre menor sea la energía potencial, la conformación de la molécula es más estable debido a que presenta menor energía de tensión entre los átomos. En nuestro caso, el modelo final **AC** presentó la menor energía potencial, -2403.7269 kcal/mol.

La estructura secundaria del modelo obtenido es aceptable.

Finalmente se determinó la calidad de la estructura del modelo molecular por homología KRas4B-PDE δ mediante su estructura basado en los ángulos ϕ (Phi) y ψ (Psi) empleando el mapa de Ramachandran, el resultado se muestra en la **Fig. 16**. Se puede observar que los residuos Gly15, Thr74, Asp108, Ile163, Lys167, Arg197, Ser229, Gln268, Lys 273, Leu328 y Val330 se encuentran en zonas no permitidas. Se les hizo una segunda minimización de energía a estos residuos y se observó nuevamente la geometría de la proteína, los residuos seguían estando en zonas no permitidas, esto se puede deber a que estos residuos se encuentran en zonas expuestas al solvente y poseen gran movilidad estructural.

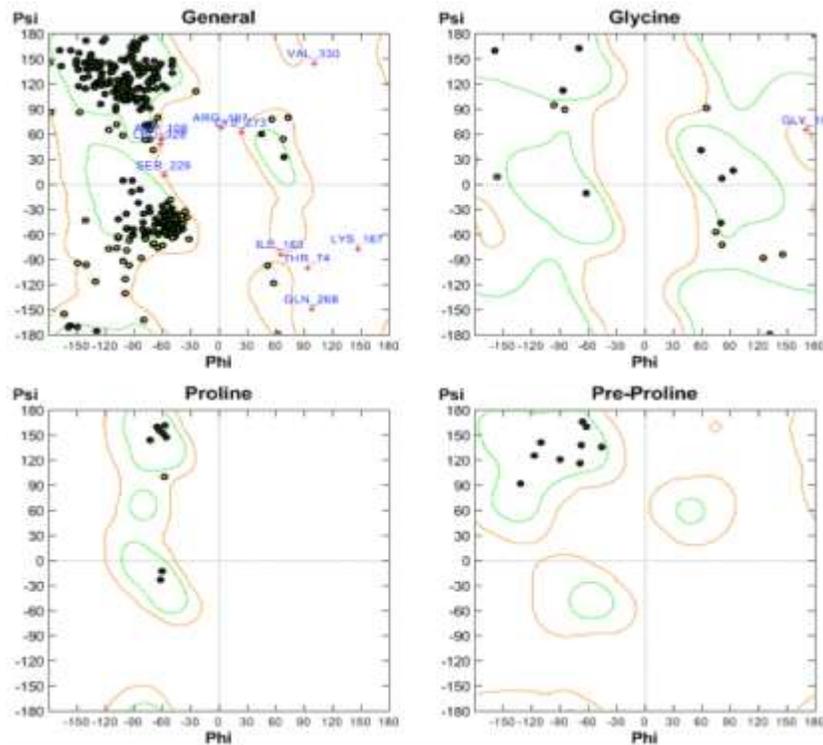


Figura 16| Análisis de la geometría del modelo molecular KRas4B-PDE δ . Mapa de Ramachandran generado por MOE 2007.09. Se generaron gráficos para evaluar los ángulos Phi y Psi en la Glicina, aminoácidos en general, para la prolina y pre-prolina. Regiones delimitadas por la línea naranja son zonas permitidas, esto quiere decir que los ángulos en los enlaces son correctos.

Este análisis corroboró que la estructura tridimensional obtenida mediante modelado molecular por homología es aceptable para ser utilizado en el *virtual screening*.

En la **Fig.17** se muestra el modelo final del complejo KRas4B-PDE δ obtenido mediante modelado molecular por homología.

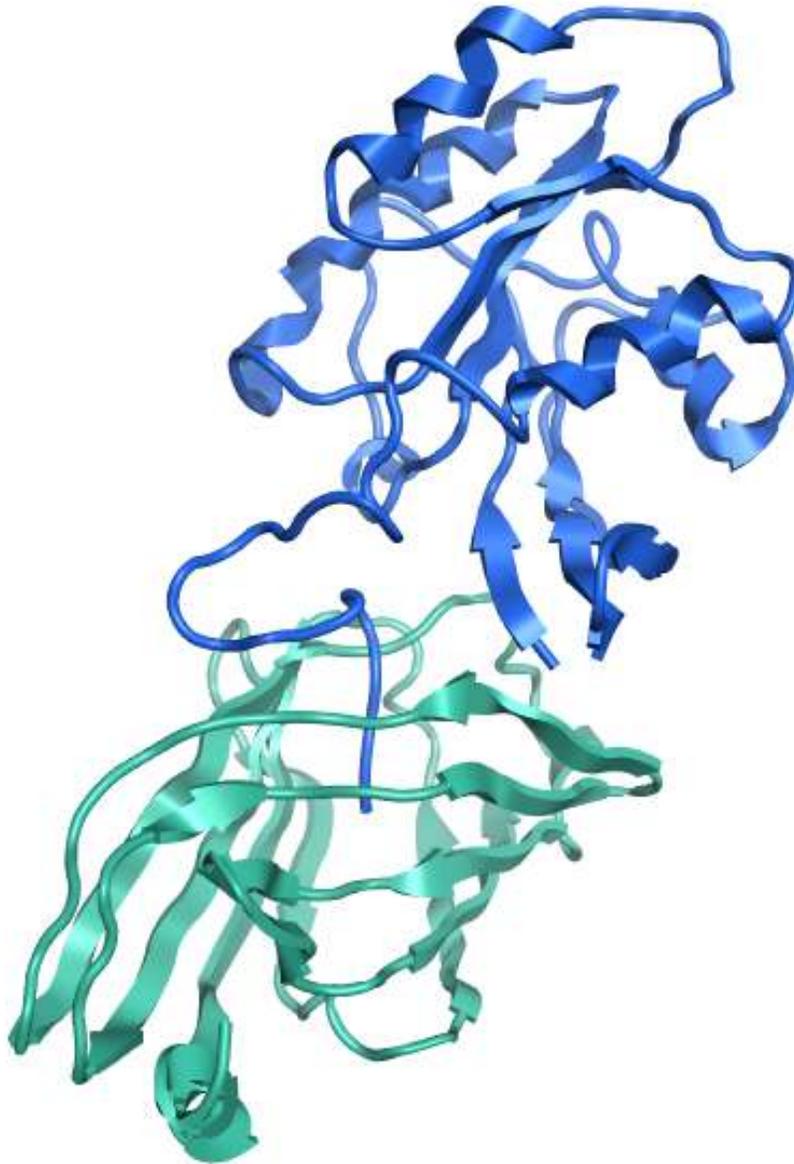


Figura 17| Modelo molecular del complejo KRas4B-PDE δ . Estructura 3D del complejo KRas4B-PDE δ obtenido por modelado molecular por homología con MOE_ *HomologyModel*. La proteína KRas4B se muestra en azul y la PDE δ en verde.

2. Identificación de compuestos específicos contra el complejo KRas4B-PDEδ a través de la técnica de *docking*.

El extremo carboxilo terminal de KRas4B es una posible región para crear un sitio de unión específico del complejo molecular KRas4B-PDEδ

De acuerdo a lo anterior, se planteó encontrar una molécula orgánica que reconociera al complejo molecular KRas4B-PDEδ independientemente de la mutación de KRas4B se encuentre o no presente. Se eligió el extremo carboxilo terminal de KRas4B, debido a que es la región más cercana con la proteína PDEδ para formar el complejo, esto presenta una ventaja, ya que los residuos del extremo carboxilo terminal no son conservados, por lo que lo hace una zona de reconocimiento óptimo en la búsqueda de un compuesto orgánico que reconozca específicamente a KRas4B y no a otras GTPasas, sin afectar la función *per se* de PDEδ. En la **Fig. 18** se muestra un alineamiento de seis proteínas que son reguladas por PDEδ, cuatro de ellas son GTPasas y dos fosfodiesterasas. En el alineamiento se observa que la proteína KRas4B no presenta residuos conservados (diferentes a la Cys del motivo CAAX) con respecto a las otras proteínas

KRas4B	170	-----MSKDGK-KKKKSKTK	VIM	188		
HRas	170	-----KLNPPDESGPGCM	SCKCVLS	189		
NRas	170	-----KLNSSDDGTQGC	MGLPCVVM	189		
Rheb	172	-----GAASQ GK	-----SSCSVM	184		
PDE6a	819	KMKVQEEKKQKQQA	SAASAAAGNQPGGNPSPGGATT	SKSCCIQ-	860	
PDE6b	817	KVKALEEKEEEEER	VAAKKVGT	ICNGGPA----	PKSSTCCIL-	854

*

Figura 18| Alineamiento de la región carboxilo terminal de proteínas reguladas por PDEδ. Alineamiento de la región carboxilo terminal de seis proteínas reguladas por PDEδ, cuatro GTPasas y dos Fosfodiesterasas. El símbolo (*) indica que en esa posición los residuos son idénticos. Los residuos conservados se encuentran sombreados. Alineamiento realizado en UniProt.

Existen cuatro posibles sitios de unión para estabilizar el complejo molecular KRas4B-PDEδ.

El localizar un posible sitio de unión obedece a la necesidad de identificar moléculas (ligandos) que pueda crear una fuerte interacción con

ambas cadenas del complejo y así poder estabilizarlo. Esto se realizó haciendo uso de la función *MOE_AlphaSiteFinder*, esta función localiza regiones que deben poseer tres características: a) Zonas cóncavas con alto empaquetamiento molecular, b) Regiones con características hidrofóbicas y polares y c) Regiones con contenido de grupos funcionales interaccionantes. Fueron localizados 15 sitios de unión sobre la superficie del modelo molecular KRas4B-PDE δ y cuatro sitios particularmente en la región interfacial del complejo, estos sitios fueron verificados con CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp>). CASTp es un servidor ampliamente utilizado cuya tarea se enfoca en identificar cavidades en superficies accesibles al solvente y cavidades hacia el interior de una proteína dada la estructura tridimensional. En la **Fig.19** está indicada la localización de estos sitios potenciales de unión y en la **Tabla 1** se mencionan algunas características estructurales y fisicoquímicas de cada uno ellos. Particularmente, la segunda y tercera columna lista los residuos de aminoácidos cuyos átomos, ya sea de la cadena principal y/o lateral de ambas proteínas, participan en la conformación de los sitios potenciales de unión. La columna cuatro y cinco indica en número los átomos hidrofóbicos y polares que constituyen el sitio activo, y la columna seis indica el volumen de la cavidad formada. Los átomos que conforman estos sitios de unión podrían interactuar con la molécula del ligando una vez posicionada en el sitio y habiendo probado varias posiciones y orientaciones.

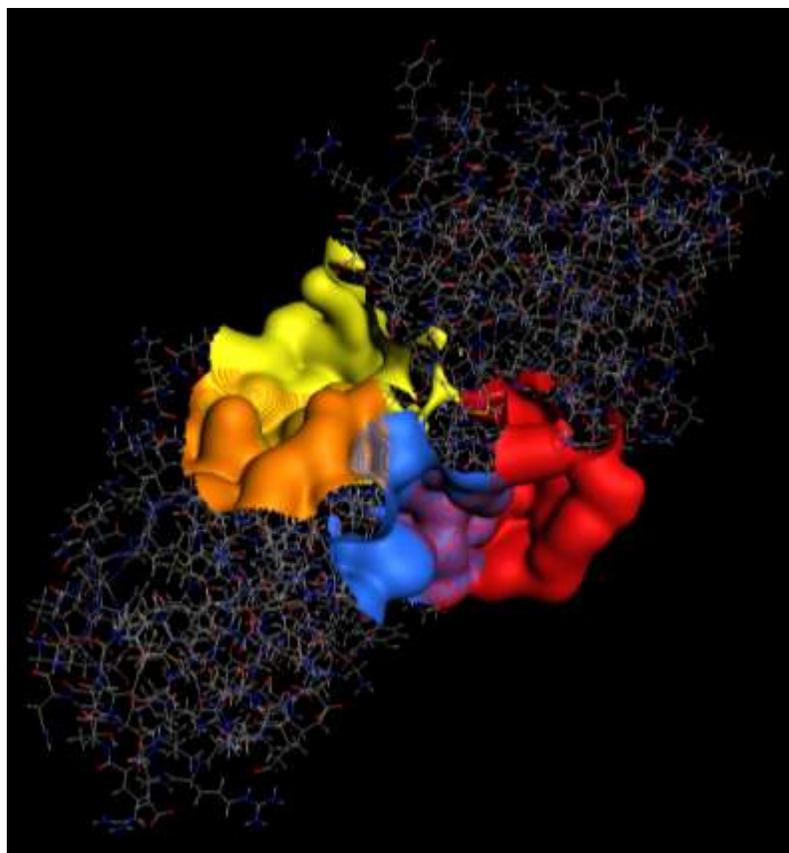


Figura 19| Sitios de unión para realizar la interacción proteína-ligando. Estructura de la proteína en donde se muestran con una isosuperficie los cuatro posibles sitios de unión Amarillo (1), Azul(2), Rojo(3) y Naranja(4). Estos sitios son importantes por su tamaño, ubicación y propiedades fisicoquímicas.

Tabla1| Características de los sitios potenciales de unión.

Sitio	Residuos cuyos átomos conforman la pared del sitio potencial de unión		Átomos hidrofóbicos	Átomos polares	Volumen de la cavidad (Å ³)
	KRas4B	PDEδ			
1	Met72, Arg73, Thr74, Glu76, Lys104, Asp108, Lys172, Lys180, Ser181.	Glu216, Lys247, Ala248, Glu300.	20	11	69
2	Lys167, Glu168, Ser171, Lys177, Lys178, Lys179	Glu279, Phe281.	8	4	34
3	Thr2, Tyr4, Ile46, Asp47, Glu49, Thr50, Cys51, Val160, Arg161, Lys165, Glu168, Lys169, Lys179	Glu279.	10	17	70
4	Asp173, Gly174, Lys176, Lys180.	Leu298, Glu300	10	1	37

Columna uno, sitios de unión en el complejo molecular KRas4B-PDEδ, Columnas dos y tres, residuos cuyos átomos conforman al sitios de unión; Columna cuatro y cinco, átomos hidrofóbicos y polares que conforman el sitio de unión; Columna seis, Volumen de la cavidad formada en el sitio de unión en Å³.

Se obtuvieron aproximadamente cinco millones de conformeros con características farmacológicas

Una vez teniendo los sitios potenciales de unión se prosiguió a trabajar con la base de datos 3D *Diversity Set* de ENAMINE, la cual está conformada por 50,240 compuestos, estos compuestos presentan las siguientes características farmacológicas basadas en las reglas de Lipinski (**APENDICE B**), la base de datos se encuentra disponible en: http://www.enamine.net/index.php?option=com_content&task=view&id=83.

Se preparó la base datos, eliminado contraiones y moléculas de aguas, compuestos con metales, asignando cargas a los átomos utilizando un campo de fuerza MMFF94X (parametrizado para moléculas orgánicas pequeñas). Previamente las estructuras de cada compuesto fueron convertidas a tercera dimensión y se hizo una depuración mediante las reglas de Lipinski.

Se obtuvieron conformeros estructurales para cada uno de los compuestos que consta la base de datos *3D Diversity Set* utilizando la función *MOE_ImportConformation* y empleando el campo de fuerza MMFF94X. Se eliminaron los conformeros que poseían una energía conformacional menor o igual a 3.0 kcal/mol, obteniendo aproximadamente 100 conformeros por compuesto, teniendo un total de aproximadamente cinco millones de conformeros.

Obtención de candidatos potenciales para estabilizar el complejo molecular.

El propósito del *virtual screening* es el de identificar de un número extenso de ligandos potenciales, aquellos con mayor probabilidad de interactuar favorablemente con el blanco farmacológico *in vitro* e *in vivo*, en este caso es encontrar configuraciones de unión favorables de uno o más ligandos sobre un blanco proteico. La base de datos de conformeros obtenida anteriormente y la estructura del complejo KRas4B-PDEδ obtenida por modelado

molecular, fueron los materiales utilizados durante la simulación de acoplamiento proteína-ligando.

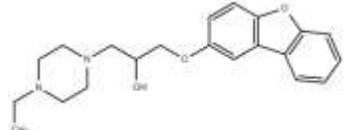
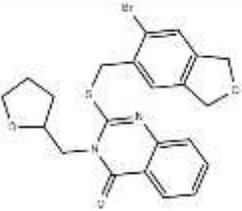
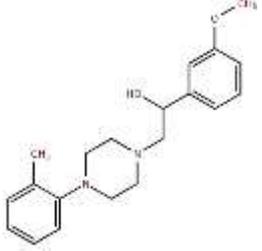
Para cada confórmero, se crea un número de configuraciones proteína-ligando y cada unión genera un puntaje, en un esfuerzo para determinar los modos de unión favorables. Las posiciones con mayor puntuación se escriben en una nueva base de datos para su posterior análisis.

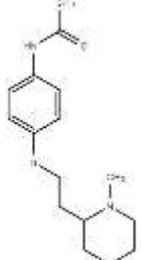
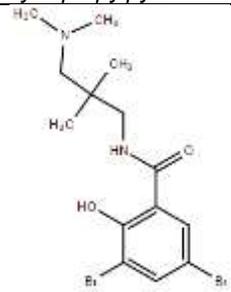
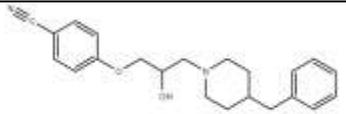
Utilizando la función de *MOE_Dock*, fueron evaluadas 100 mil orientaciones diferentes para cada confórmero sobre cada sitio de unión, quedándonos con los diez mejores complejos determinado por un puntaje *London dG* y generando una nueva base de datos con estos mismos. En todos los casos, la función de búsqueda de orientaciones y acomodo de los confórmeros en los sitios potenciales de unión fue *AlphaSiteTriangle*. Fueron obtenidos en total aproximadamente 50, 000,000 complejos de interacción proteína-ligando. La función de puntaje fue *LondonDG*.

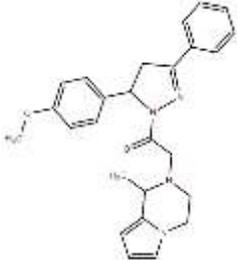
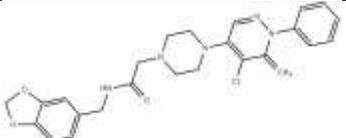
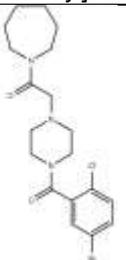
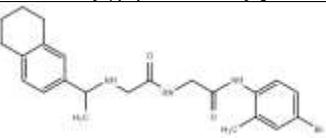
La base de datos generada por fue sorteada por *puntaje* y estructura. Se analizaron los primeros 20,000 compuestos que presentaron alta frecuencia. A cada compuesto se le realizó una minimización de energía tanto al ligando como a los residuos proteicos del complejo molecular KRas4B-PDE δ que interaccionan con el ligando, lo que nos permitió evaluar las interacciones tipo puente de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas Van der Waals y masa molecular del compuesto. Se obtuvieron 36 posibles candidatos y se seleccionaron dos candidatos que presentaron bajo puntaje y baja frecuencia, estos dos compuestos son el D3 y D9 (**Tabla 2**).

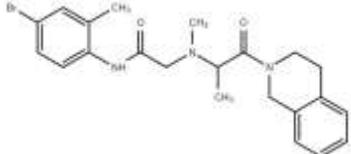
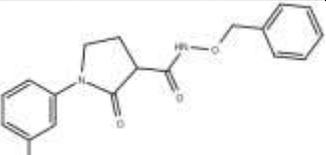
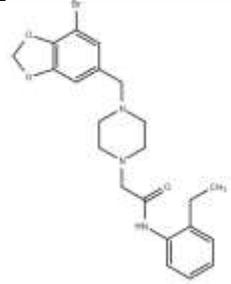
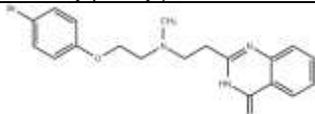
Los compuestos fueron adquiridos en la compañía ENAMINE y fueron evaluados sobre la línea celular de cáncer pancreático MIA PaCa-2 y en la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE. Se utilizó una concentración inicial de 200 μ M y se observó por microscopía de campo claro el daño causado sobre las células durante el transcurso de 16 días. Principalmente, se tomó en cuenta la morfología celular y adhesión, cada tercer día se

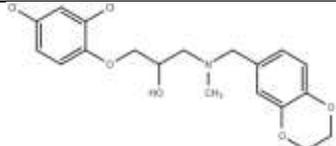
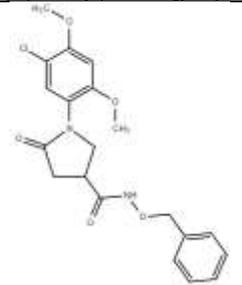
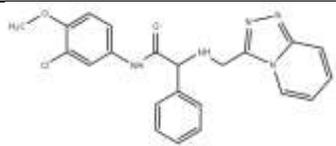
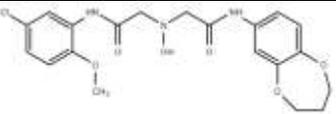
Tabla 2| Posibles candidatos para estabilizar el complejo KRas4B-PDEδ. Resultados obtenido del análisis del *docking*.

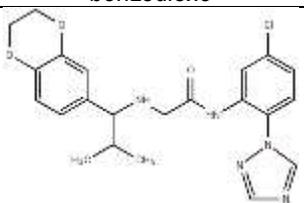
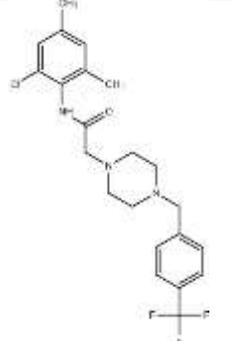
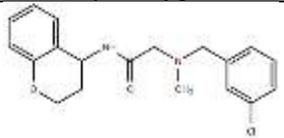
Compuesto	ID ENAMINE	Estructura	Peso Molar (g/mol)	No. de grupos donadores	No. de grupos aceptores	LogP	Puntaje de acoplamiento	Frecuencia
D1	Z52714899	<i>[2-[2-chloro-5-(trifluoromethyl)anilino-2-keto-ethyl]-[(2S)-2-hydroxypropyl]ammonium</i>	310,7				-13,1	17
D2	Z56794607	 <i>(2S)-1-dibenzofuran-2-yloxy-3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-2-ol</i>	354,4	1	5	2.907	-16,6	328
D3	Z51185275	 <i>2-[(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5-yl)methylsulfanyl]-3-(tetrahydrofuran-2-ylmethyl)quinazolin-4-one</i>	475,4	0	5	4.707	-5,0	1
D4	Z104377870	 <i>(1R)-1-(3-methoxyphenyl)-2-[4-(o-tolyl)piperazin-1-yl]ethanol</i>	326,4	1	4	3.581	-15,5	11

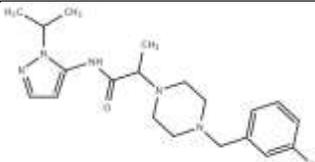
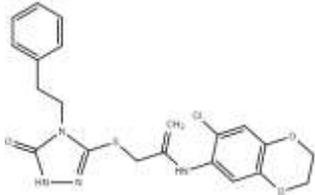
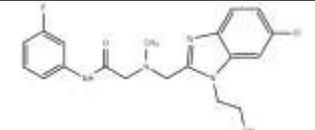
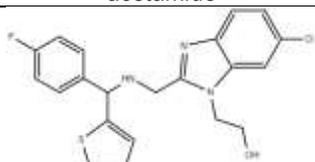
		<i>fluorophenyl)methoxy]propan-2-ol</i>						
D9	Z14925758 0	 <p><i>N</i>-[4-[2-(1-methyl-2-piperidyl)ethylsulfanyl]acetamide] 2-({2-[2,5-dimethyl-1-(prop-2-en-1-yl)pyrrol-3-yl]-2-oxoethyl}sulfanyl)-6-hydroxy-3-propylpyrimidin-4-one</p>	292,4	1	3	3.251	-12,2	1
D10	Z25944554	 <p>[3-[(3, 5-dibromo- 2-hydroxy- benzoyl) amino]-2,2-dimethyl- propyl]- dimethyl-ammonium</p>	408,1	2	4	4.638	-13,8	20
D11	Z27029312	 <p>4-[3-(4-benzyl-1-piperidyl)-2-hydroxy-propoxy]benzonitrile</p>	350,5	1	4	4.233	-13,9	15
D12	Z31373014							

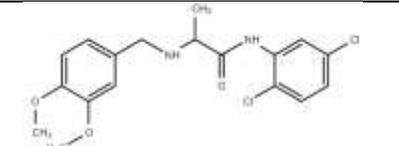
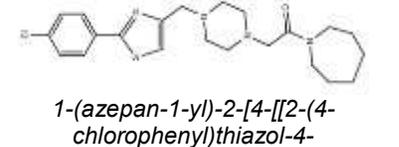
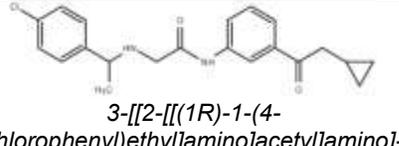
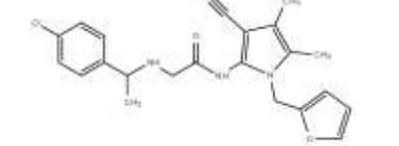
D13	Z10530883 4	 <p>1-[(3S)-3-(4-methoxyphenyl)-5-phenyl-3,4-dihydropyrazol-2-yl]-2-[(1R)-1-methyl-3,4-dihydro-1H-pyrrol</p>	428,5	0	6	4.744	-13,8	8
D14	Z46515334	 <p>N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-2-[4-(5-chloro-6-oxo-1-phenyl-pyridazin-4-yl)piperazin-1-yl]acetamide</p>	481,9	1	9	3.129	-15,2	24
C1	Z14624151 6	 <p>1-(azepan-1-yl)-2-[4-(5-bromo-2-chloro-benzoyl)piperazin-1-yl]ethanone</p>	442,8	0	5	4.119	-13,6	43
C2	Z90250319	 <p>N-(4-bromo-2-methyl-phenyl)-2-[[2-[(1R)-1-tetralin-6-</p>	450,4	3	5	4.756	-14,0	33

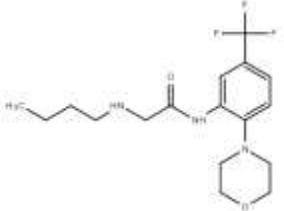
		<i>ylethyl]amino]acetyl]amino]acetamide</i>						
C3	Z10537020 8	 <p><i>N-(4-bromo-2-methyl-phenyl)-2-[[[(1R)-2-(3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)-1-methyl-2-oxo-ethyl]-methyl</i></p>	444,4	1	5	3.805	-13,9	22
C4	Z60717705 4	 <p><i>(3R)-N-benzyloxy-1-(3-bromophenyl)-2-oxo-pyrrolidine-3-carboxamide</i></p>	389,2	1	5	3.948	-14,9	215
C5	Z78630550 6	 <p><i>2-4-[7-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)methyl]piperazin-1-yl]-N-(2-ethylphenyl)acetamide</i></p>	460,4	1	6	4.633	-15,8	422
C6	Z23489359 7	 <p><i>2-[2-[2-(4-bromophenoxy)ethyl-methyl-amino]ethyl]-3H-quinazolin-4-one</i></p>	402,3	1	4	3.423	-13,5	32

C7	Z31349966	 <p><i>(2R)</i>-1-(2,4-dichlorophenoxy)-3-[2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-ylmethyl(methyl)amino]propan-2-ol</p>	398,3	1	5	4.5	-13,4	37
C8	Z28853604	 <p><i>(3S)</i>-N-benzyloxy-1-(5-chloro-2,4-dimethoxy-phenyl)-5-oxo-pyrrolidine-3-carboxamide</p>	404,8	1	7	4.12	-14,2	247
C9	Z65211380	 <p><i>(2R)</i>-N-(3-chloro-4-methoxy-phenyl)-2-phenyl-2-([1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3-ylmethylamino)acetami</p>	421,9	2	7	2.445	-13,8	9
C10	Z27304548	<p><i>N</i>-[5-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-phenyl]-3-(2-fluorophenyl)sulfonylamino-propanamide</p>	454,9				-13,7	27
C11	Z46393258		433,9	2	8	2.949	-13,9	33

		<i>2-[[2-[(5-chloro-2-methoxy-phenyl)amino]-2-oxo-ethyl]-methyl-amino]-N-(3,4-dihydro-2H-1,5-benzodioxole</i>						
C12	Z10633595 2	 <p><i>N-[5-chloro-2-(1,2,4-triazol-1-yl)phenyl]-2-[[[(1R)-1-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2-methyl-pro</i></p>	441,9	2	8	3.791	-14,0	76
C13	Z23593857 8	 <p><i>N-(2-chloro-4,6-dimethyl-phenyl)-2-[4[[4-(trifluoromethyl)phenyl]methyl]-1,4-diazepan-1-yl]acetamid</i></p>	453,9	1	4	4.859	-14,0	413
C14	Z10570058 0	 <p><i>2-[(3-chlorophenyl)methyl-methyl-amino]-N-chroman-4-yl-acetamide</i></p>	344,8	1	4	3.634	-14,7	29

C15	Z52736477	 <p><i>(2R)-2-[4-[(3-chlorophenyl)methyl]piperazin-1-yl]-N-(2-isopropylpyrazol-3-yl)propanamide</i></p>	389,9	1	6	3.957	-15,9	342
C16	Z20237382 6	 <p><i>N-(8-chloro-2,5-dioxabicyclo[4.4.0]deca-6,8,10-trien-9-yl)-2-[(5-oxo-4-phenethyl-1H-1,2,4-triazol</i></p>	446,9	2	8	2.997	-15,9	464
C17	Z46406207	 <p><i>2-[[6-chloro-1-(2-hydroxyethyl)benzimidazol-2-yl]methyl-methyl-amino]-N-(3-fluorophenyl)-acetamide</i></p>	390,8	2	6	2.78	-14,9	32
C18	Z10645969 4	 <p><i>2-[6-chloro-2-[[[(S)-(4-fluorophenyl)-(2-thienyl)methyl]amino]methyl]benzimidazol-1-yl]ethanol</i></p>	415,9	2	4	3.153	-15,2	34

C19	Z44521301	 <p>[(1R)-2-(2,5-dichloroanilino)-2-keto-1-methyl-ethyl]-methyl-veratryl-ammonium</p>	383,3	2	5	6.363	-14,9	50
C20	Z232357168	 <p>2-[2-(4-chlorophenoxy)ethyl-methyl-amino]-N-(3-methylisoxazol-5-yl)-propanamide</p>	337,8	1	6	3.554	-14,3	349
C21	Z126042658	 <p>1-(azepan-1-yl)-2-[4-[[2-(4-chlorophenyl)thiazol-4-yl]methyl]piperzin-1-yl]ethanone</p>	433	0	5	4.72	-15,3	243
C22	Z199813680	 <p>3-[[2-[[[(1R)-1-(4-chlorophenyl)ethyl]amino]acetyl]amino]-N-cyclopropyl-benzamide</p>	371,9	3	5	3.091	-13,8	64
C23	Z89124359	 <p>2-[[[(1S)-1-(4-chlorophenyl)ethyl]amino]-N-[3cyano-1-(2furymethyl)-4,5-dimethyl-pyrrol-2-yl]acetam</p>	410,9	2	6	3.815	-14,3	95

C24	Z52853441	 <p><i>Butyl-[2-keto-2-[2-morpholino-5-(trifluoromethyl)anilino]ethyl]ammonium</i></p>	359,4	2	5	3.058	-13,5	8
-----	-----------	---	-------	---	---	-------	-------	---

Columna uno, nombre del compuesto; Columna dos, ID de Enamine; Columna tres, estructura del compuesto y nombre IUPAC; Columna cuatro, peso molar del compuesto; Columna cinco, número de grupos donadores de enlaces; Columna seis, número de grupos aceptores de enlaces; Columna siete, coeficiente de partición LogP; Columna ocho, puntaje de formación proteína-ligando; Columna nueve, frecuencia del ligando por el sitio de unión.

cambió el medio de cultivo y el compuesto. De acuerdo a los resultados mostrados en la **tabla 3**, en total 18 compuestos presentaron actividad, de los cuales trece compuestos mostraron efecto en daño sobre la línea celular de MIAPaCa-2 causando menor daño en la línea celular hTERT-HPNE a una concentración de 200 μM , cinco presentaron el mismo efecto a una concentración de 50 μM . En total fueron descartados 20 compuestos, de los cuales 18 no causaron daño en ninguna de las dos líneas celulares a 200 μM , y dos compuestos específicamente D3 y C6 presentaron toxicidad en ambas líneas celulares a 10 y 5 μM respectivamente, en este caso si disminuía la concentración 3 unidades, presentaban una confluencia similar ambas líneas celulares.

En este proyecto de tesis se describe la caracterización de dos compuestos, a pesar que hubo compuestos que presentaron efecto de daño sobre la línea celular MIA PaCa-2 a concentraciones de 50 μM , fueron seleccionados para su caracterización los compuestos D14 y C22. Esta selección se debió a que presentaron menor daño en la línea celular hTERT-HPNE, estos compuestos junto con el C12 y C19 al día 16 de tratamiento las células de hTERT-HPNE se seguían manteniendo adheridas y con la morfología que las caracteriza a excepción del compuesto C19, este último condujo a un cambio drástico en la morfología de hTERT-HPNE por lo cual fue descartado. El compuesto C22 presentó mayor confluencia en la línea celular hTERT-HPNE que el C12.

Este no es un análisis concluyente para la actividad que uno de estos compuestos pudiera estar presentando para el objetivo planteado, es necesario que cada uno de ellos sea caracterizado, solo que para efecto de este proyecto de tesis solo se podían caracterizar dos compuestos.

Tabla 3| Efecto en daño de los compuestos sobre la línea celular de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 y la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE.

Compuesto	MIA PaCa-2	hTERT-HPNE	3 días	7 días	16 días
D1	No	No	Descartado		
D2	Si	Moderado	Funciona a 50 µm		
D3	Si	Si	Descartado		
D4	Si	Moderado	Funciona a 50 µm		
D5	Si	Moderado	Funciona		
D6	No	No	Descartado		
D7	Si	Moderado	Funciona		
D8	No	No	Descartado		
D9	No	No	Descartado		
D10	No	No	Descartado		
D11	No	No	Descartado		
D12	Si	Moderado	Funciona		
D13	No	No	Descartado		
D14	Si	Mínimo	Funciona	Funciona	Funciona
C1	No	No	Descartado		
C2	No	No	Descartado		
C3	Si	Moderado	Funciona		
C4	No	No	Descartado		
C5	Si	Moderado	Funciona	Funciona	
C6	Si	Si	Descartado		
C7	No	No	Descartado		
C8	No	No	Descartado		
C9	No	No	Descartado		
C10	No	No	Descartado		
C11	No	No	Descartado		
C12	Si	Moderado	Funciona	Funciona	Funciona
C13	Si	Moderado	Funciona a 50 µm	Funciona	
C14	Si	Moderado	Funciona a 50 µm	Funciona	
C15	No	No	Descartado		
C16	No	No	Descartado		
C17	Si	Moderado	Funciona		
C18	Si	Moderado	Funciona		
C19	Si	Moderado	Funciona a 50 µm	Funciona	Funciona
C20	Si	Moderado	Funciona	Funciona	
C21	No	No	Descartado		
C22	Si	Moderado	Funciona	Funciona	Funciona
C23	Si	Moderado	Funciona		
C24	Si	Moderado	Funciona		

Columna uno, compuesto; Columna dos y tres, efecto en daño en las líneas celulares; Columna cuatro, cinco y seis, efecto de en los días de tratamiento.

Los compuestos D14 y C22 son candidatos potenciales para estabilizar el complejo KRas4B-PDEδ.

Ahora describiré cómo los compuestos D14 y C22 están interaccionando con el complejo molecular KRas4B-PDEδ de acuerdo a los resultados obtenidos del *virtual screening*. Las características que presentan las interacciones entre estos se resumen en la **Tabla 4**.

El compuesto D14, puede llegar a formar cuatro enlaces puente de hidrógeno con el complejo molecular: la piperazina con el Glu279 y el Glu168, el grupo acetamida con la Lys179 y el benzodioxol con el Asp47; y tres enlaces Pi: el benzodioxol con el Glu268 y el grupo bencilo con la Ser171 y Met170.

El compuesto C22 puede llegar a formar tres enlaces puente de hidrógeno con el receptor: la benzamida con el Glu279, la acetamida con la Lys179 y la Val160 con el clorofenol; un puente iónico: el grupo amino con el Glu279; tres enlaces pi: el Glu168 y Asp47 pueden interaccionar con el clorofenol y Glu168 también puede interaccionar con la benzamida.

Tabla 4| Resultados de *virtual screening* de los compuestos D14 y C22.

Ligando	Puntaje <i>London dG</i>	Frecuencia	Puente de hidrógeno R::L(Å)	Puente iónico (Å)	Enlace Pi (Å)
D14	-15.2	24	Glu279: NH::O (2.52), Lys179: O::HN (2.85), Val160: OH::Cl (3.38), Glu279: CH::O (3.35), Lys179: NH::O (2.60),	Glu279: O1::N (3.70),	Glu168 (4.29)
C22	-13.8	64			Asp47 (4.51) Glu168 CA (4.16) Glu168 CG (3.82)

Columna uno, ligando; Columna dos, puntaje que resultó del *docking*; Columna tres, frecuencia que presento cada ligando sobre el sitio de unión; Columna cuatro, interacciones puente de hidrógeno formadas por el receptor (R) y el ligando (L); Columna cinco, interacciones por puentes iónicos; Columna seis, interacciones Pi. Longitud de enlaces en **Ångströms (Å)**

Estas interacciones sugieren un reconocimiento, estabilidad y afinidad al sitio de unión.

En las **Fig. 20** y **21**, se describen a nivel molecular las interacciones de los compuestos D14 y C22 con el complejo molecular KRas4B-PDE δ . Las **Fig. 20a** y **21a** muestran el compuesto D14 y C22 respectivamente en interacción con el complejo, en las **Fig. 19b** y **20b** la representación bidimensional de las interacciones del ligando con los residuos del complejo a 4.5 Å las interacciones se muestran representadas por flechas.

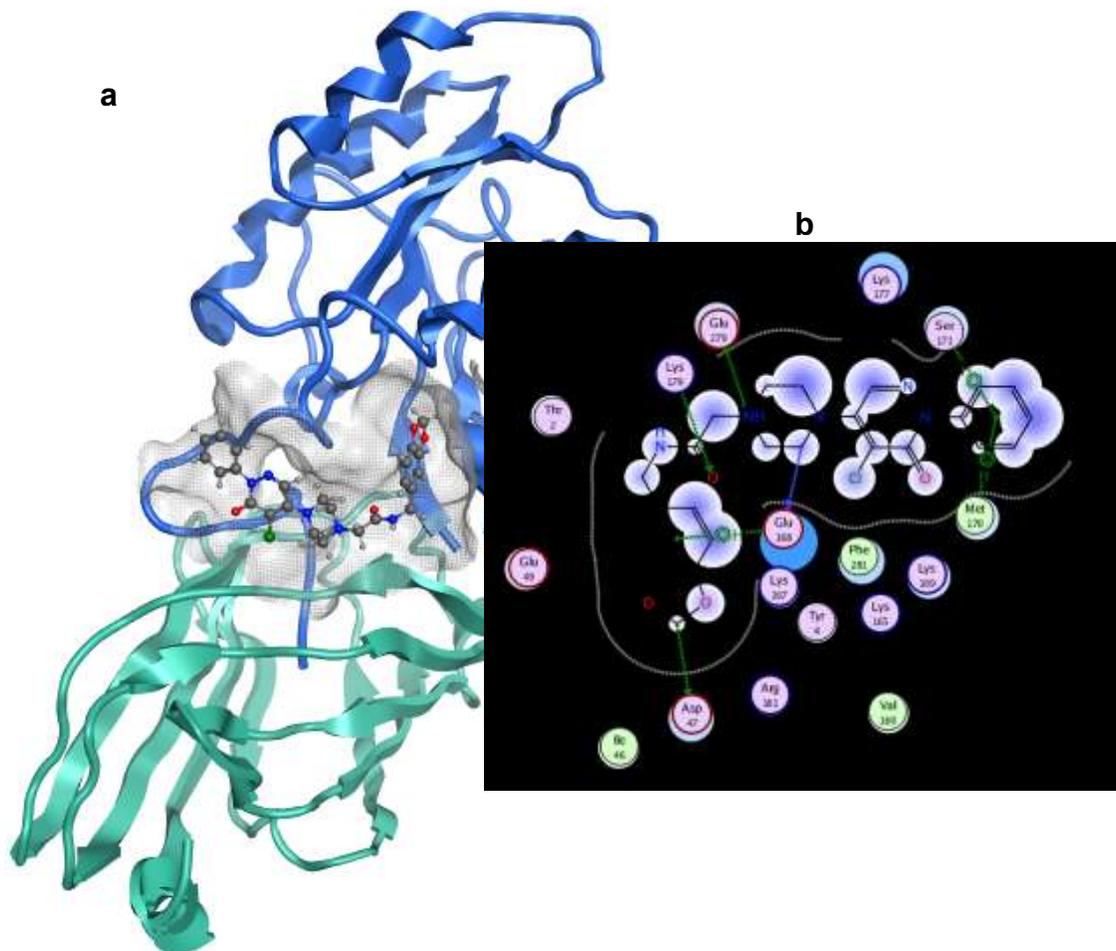


Figura 20| Compuesto D14 en interacción con el complejo molecular KRas4B-PDE δ . a.: Modelo molecular KRas4B-PDE δ en interacción con el compuesto D14, las moléculas receptoras del compuesto se muestra con una isosuperficie. b. Mapa de interacciones. Las flechas verdes y azules indican los enlaces puente de hidrógeno, en verde también se indican los enlaces Pi con el símbolo (H), las esferas lilas indican que esa región se encuentra expuesta al solvente y la línea punteada gris muestra fuerza la generada por los aminoácidos sobre el compuesto.

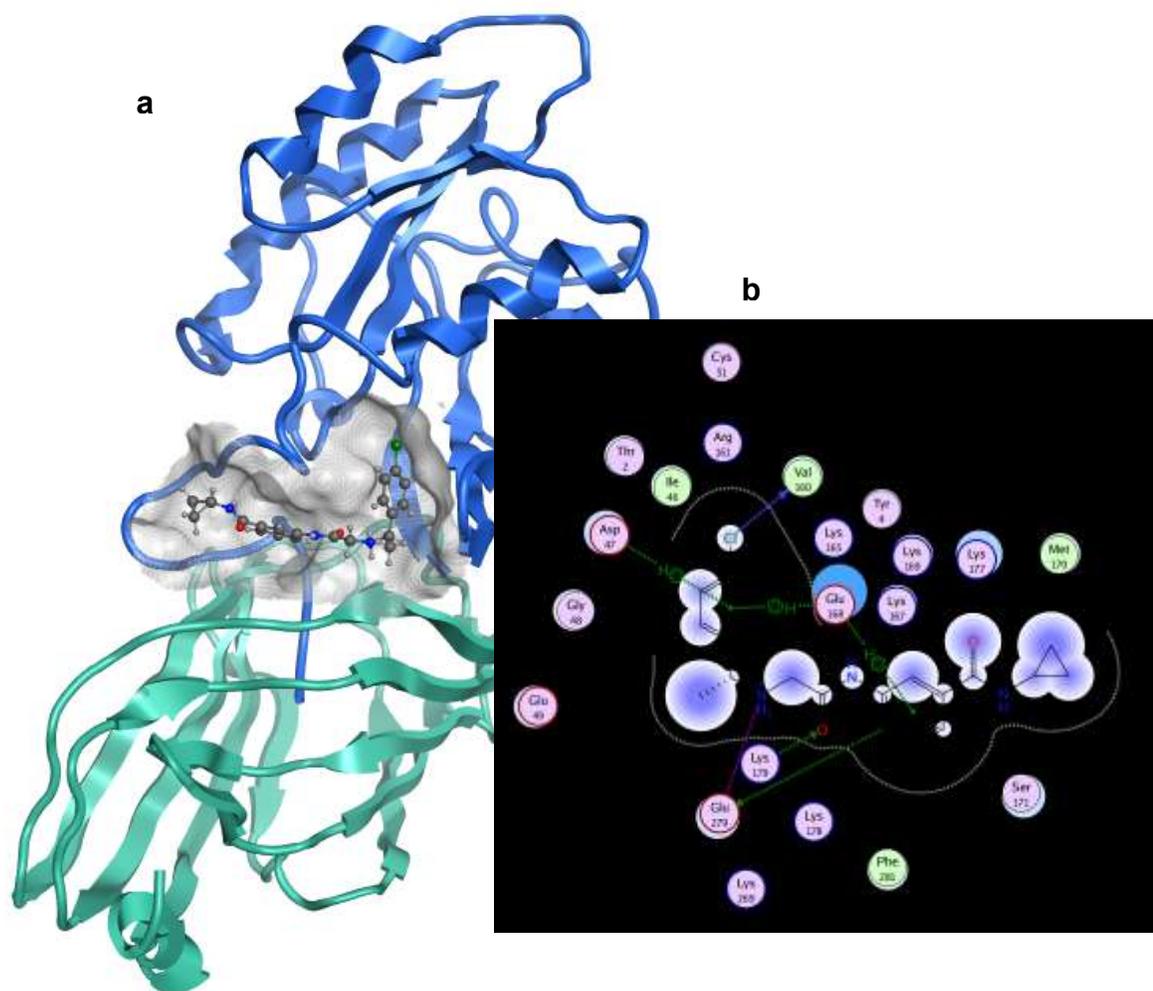


Figura 21| Compuesto C22 en interacción con el complejo molecular KRas4B-PDE δ . Modelo molecular KRas4B-PDE δ en interacción con el compuesto D22, las moléculas receptoras del compuesto se muestra con una isosuperficie. **B.** Mapa de interacciones. Las flechas verdes y azules indican los enlaces puente de hidrógeno, en verde también se indican los enlaces Pi con el símbolo (OH), las esferas lilas indican que esa región se encuentra expuesta al solvente y la línea punteada gris muestra fuerza la generada por los aminoácidos sobre el compuesto.

3. Grado de toxicidad *in vitro* de los compuestos seleccionados como ligandos potenciales, así como su efecto en viabilidad y muerte celular en líneas celulares de cáncer pancreático.

Las líneas celulares de cáncer pancreático expresan las proteínas KRas4B y PDEδ

Se corroboró que las líneas celulares con las que contamos en el laboratorio expresan las proteínas KRas4B y PDEδ, las cuales fueron detectadas mediante *Western blot* usando anticuerpos específicos para cada proteína, se usaron la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE, y las líneas celulares de cáncer pancreático MIA PaCa-2, Panc-1, HPAF II y BxPC-3, y como control las líneas celulares de retinoblastoma Y79 y de cáncer de cérvix HeLa que expresan a ambas proteínas. En la **Fig. 22** se muestra el resultado.

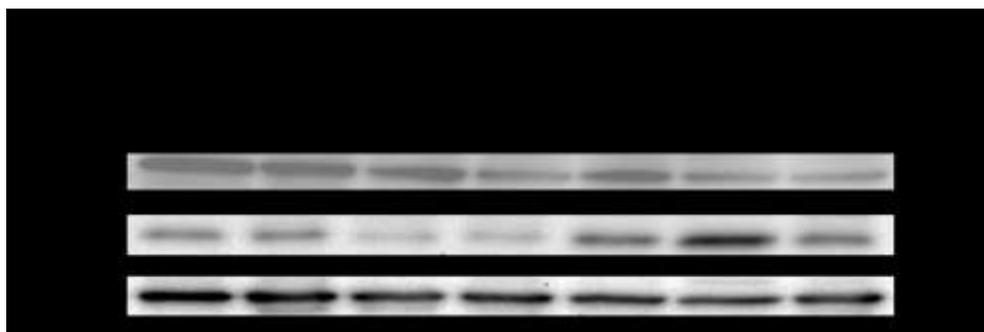


Figura 22| Presencia de las proteínas KRas4B y PDEδ en diferentes líneas celulares. Western Blot que corroboró la expresión de la proteína KRas4B y PDEδ en la línea celular de retinoblastoma Y79, de cáncer de cérvix HeLa, la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE y las líneas celulares de cáncer pancreático MIA PaCa-2, Panc-1, HPAF II y BxPC-3. Se utilizó el anticuerpo K-Ras-2B (C-19) de Santa Cruz Biotechnology y Anti-PDE6D de Abcam.

Todas las líneas celulares expresaron ambas proteínas, pero fueron seleccionadas dos de ellas para caracterizar a los compuestos D14 y C22. hTERT-HPNE es una línea celular derivada de células ductales pancreáticas de humano, transducidas con cDNA de hTERT (el cual codifica para la subunidad catalítica de telomerasa humana) y son libres de cambios asociados a cáncer: son diploides y expresan a p16^{WT}, p53^{WT} y KRas4B^{WT}.

MIA Paca-2 es una línea celular de cáncer de páncreas de tumor primario que presenta las siguientes características: p16^{HD} (deleción homocigota), p53^{248W}, KRas^{G12C} y su crecimiento es dependiente de KRas4B, ésta línea celular junto con Panc-1 han sido de los modelos de estudio más utilizados en cáncer de páncreas, la desventaja de esta última línea celular para este trabajo es que es una línea celular no dependiente de KRas4B al igual que la línea celular BxPC-3. HPAF II es una línea celular de cáncer pancreático proveniente de fluido acético presenta a KRas^{G12D}, sin embargo, esta línea celular no ha sido caracterizada su dependencia a KRas4B. Por lo tanto, se decidió trabajar con la línea celular hTERT-HPNE para utilizarla como control y la línea celular MIA PaCa-2.

Los compuestos D14 y C22 disminuyen la viabilidad celular en la línea celular de cáncer de páncreas.

El ensayo de viabilidad celular se realizó con el objetivo de determinar si los compuestos D14 y C22 presentan efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos que eventualmente conducen a la muerte celular.

Inicialmente, los compuestos C22 y D14 fueron probados en las líneas celulares hTERT-HPNE y MIA Paca-2 utilizando una concentración de 200 μ M, también se probó el Deltarasin (inhibidor de PDE δ) como control a una concentración de 5 μ M (concentración a la que presenta actividad) y el vehículo (DMSO) al 0.64 %, después de 72 h de incubación se observaron en un microscopio de campo claro, los resultados se muestran en la **Fig. 23**.

El compuesto D14 causó que las células de MIA PaCa-2 se despegaran de la superficie de la placa y su morfología cambiara a células más redondas. En la línea celular hTERT-HPNE no se presentó el desprendimiento celular y no se observó cambio drástico en su morfología con respecto al DMSO.

El compuesto C22 originó un daño similar al D14 en las células de MIA PaCa-2, sin embargo, la línea celular hTERT-HPNE presentó ligero desprendimiento celular y cambio en la morfología.

El Deltarasin afectó a la línea celular MIA PaCa-2 en donde se presentaron células redondas de mayor tamaño y hubo menor desprendimiento celular en comparación con las generadas de los compuestos D14 y C22, el inhibidor de PDEδ originó a la línea celular hTERT-HPNE un mayor desprendimiento celular y morfología redondas con respecto a los otros tratamientos.

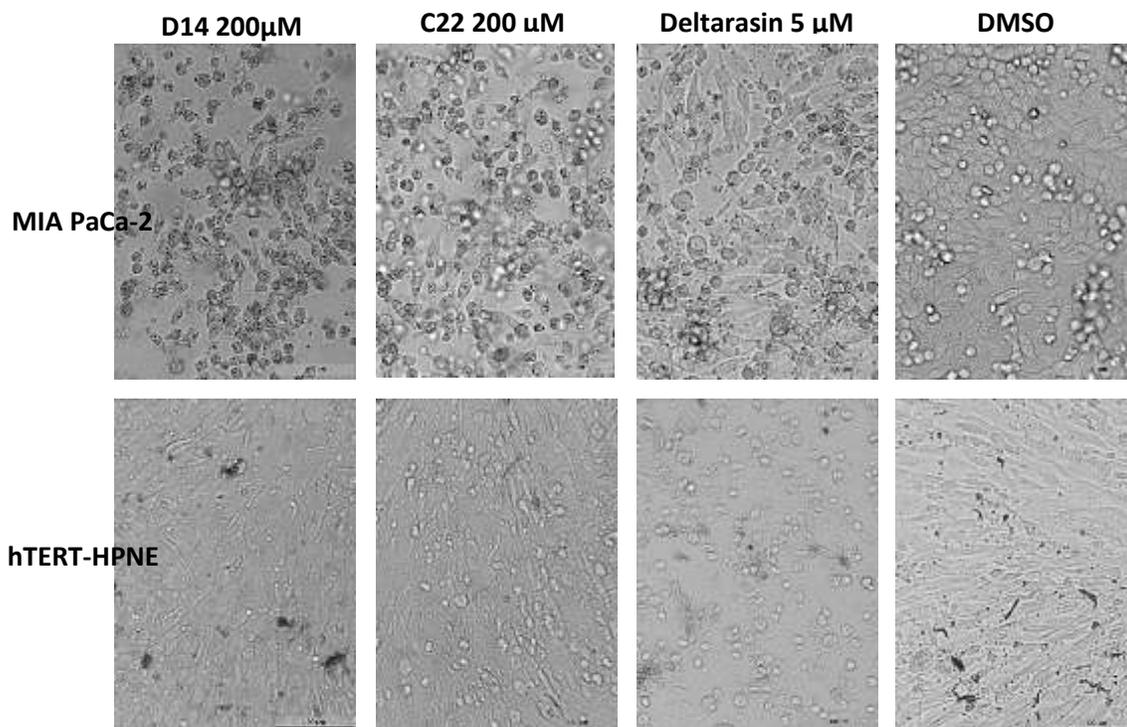


Figura 23| Evaluación de los compuestos sobre líneas celulares. La línea celular de cáncer pancreático MIA PaCa-2 (panel superior) y la línea celular epitelial normal pancreática hTERT-HPNE (panel inferior) se les adicionó los compuestos D14 y C22 a una concentración final de 200 µM, Deltarasin a 5 µM y DMSO al 0.64% durante 72 h

Se corroboró este efecto mediante un ensayo de viabilidad celular en MIA PaCa-2 y hTERT-HPNE en presencia de los compuestos D14 y C22 evaluados a diferentes concentraciones (6.25-200 µM), y DMSO. Los tratamientos se siguieron durante 5 días y se tomó lectura cada 24 h. En la

Fig. 24 se observa un efecto dosis respuesta con cada tratamiento y ambos compuestos afectaron más a la línea celular de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 que a la línea celular la normal de páncreas hTERT-HPNE. La concentración media inhibitoria (IC₅₀) en viabilidad que presentaron los compuestos D14 y C22 fueron de 99.33 μ M 137.5 μ M respectivamente, esta fue obtenida con GraphPad Prism 6.

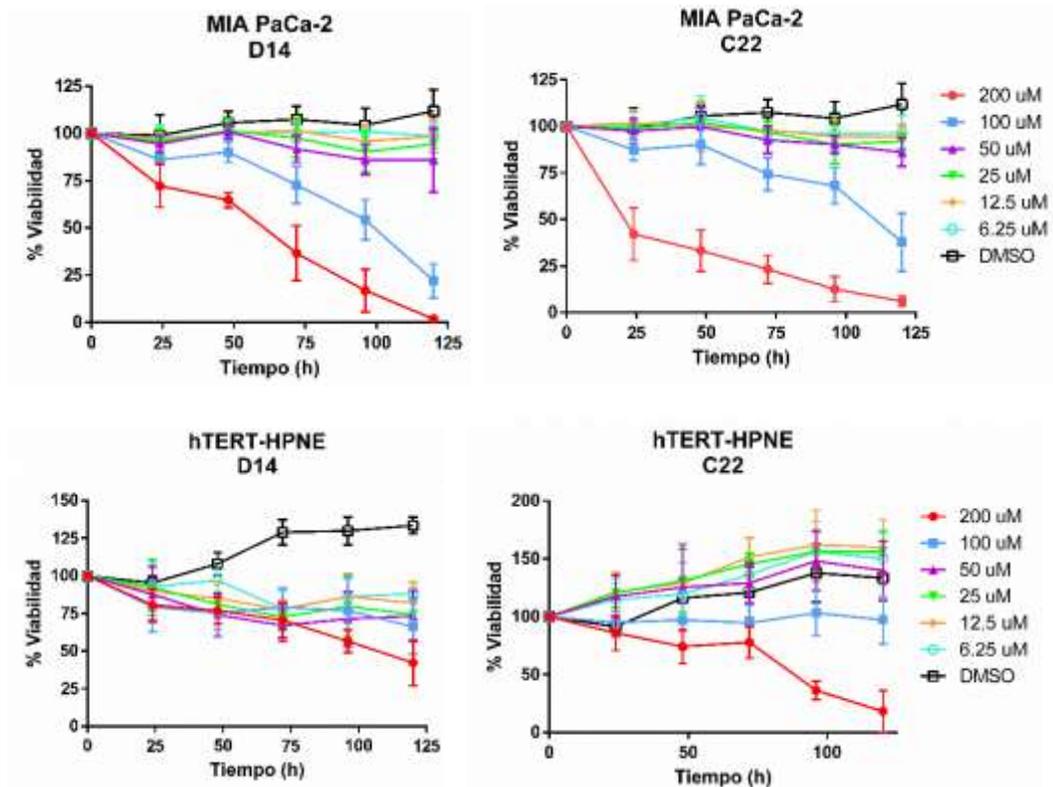


Figura 24| Evaluación de la viabilidad celular. Efecto de los compuestos D14 y C22 a diferentes concentraciones (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ M durante 120 h sobre la línea celular de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 (panel superior) y la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE (panel inferior) muestra la inhibición inducida por los tratamientos. En cada panel se muestran las barras del gráfico que indican el promedio \pm s.d. n= 5.

Los compuestos D14 y C22 inducen apoptosis sobre la línea celular de cáncer MIA PaCa-2.

Con el objetivo de determinar si la muerte celular inducida por los compuestos D14 y C22 era mediante la vía de apoptosis, decidimos llevar a cabo ensayos de muerte celular en ambas líneas celulares determinado por

Apoxina V/7-AAD/Citocalceína Violeta por citometría de flujo. Estos resultados nos muestran que en la línea celular MIA PaCa-2 tratada con DMSO no existe un incremento considerable en apoptosis, mientras que con D14 el incremento de muerte celular es de ~11 veces con respecto al DMSO; con C22 el incremento de muerte celular es de ~19 veces con respecto al DMSO. En la línea celular no cancerosa hTERT-HPNE en presencia de los compuestos D14 y C12 y DMSO, prácticamente no inducen apoptosis. Como se observa en la **Fig. 25**.

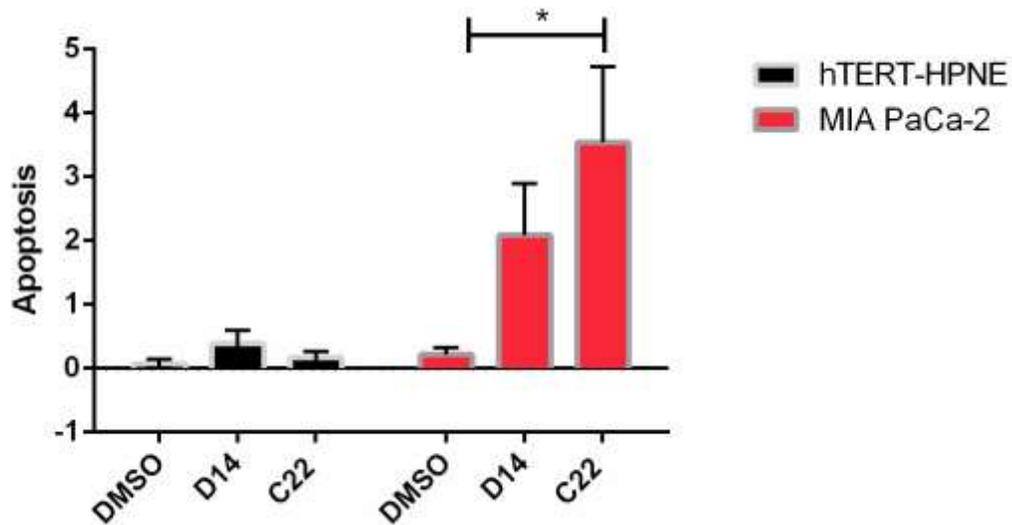


Figura 25| Los compuestos D14 y C22 inducen muerte celular en la línea celular MIA PaCa-2. La muerte celular en la línea celular hTERT-HPNE (Negro) y MIA PaCa-2 (Rojo) fue determinada por Apoxina V/7-AAD/Citocalceína Violeta y se analizaron por citometría de flujo. Las barras del gráfico muestran el promedio \pm s.d. Los valores de P fueron obtenidos mediante t -test. * $P \leq 0.05$. $n = 3$.

Los compuestos D14 y C22 inducen apoptosis de manera preferencial en la línea celular cancerosa MIA PaCa-2, y no sobre la línea celular normal hTERT-HPNE.

4. Determinar la activación de Ras así como su señalización río abajo.

Los compuestos D14 y C22 inhiben la activación de Ras

Hasta este punto, los compuestos presentaron una actividad prometedora, y ya que los compuestos fueron generados para estabilizar el complejo molecular KRas4B-PDEδ *in silico*, que de acuerdo a la hipótesis esto conlleva a inhibir o disminuir la activación de KRas4B, por lo que se planteó la siguiente pregunta ¿Los compuestos D14, y C22 están inactivando a KRas4B? Para responder a esto se realizó un ensayo de activación de Ras como se indica en métodos. Los resultados de este ensayo nos permitieron determinar que los compuestos D14 y C22 disminuyeron considerablemente la activación de Ras-GTP con respecto al DMSO (**Fig.26**). El efecto negativo de los compuestos sobre la activación de Ras con respecto al DMSO (control) se observó a partir del minuto 6 y perduró al minuto 60. Por lo tanto, los compuestos D14 y C22 inactivan a Ras en la línea celular de cáncer pancreático MIA PaCa-2.

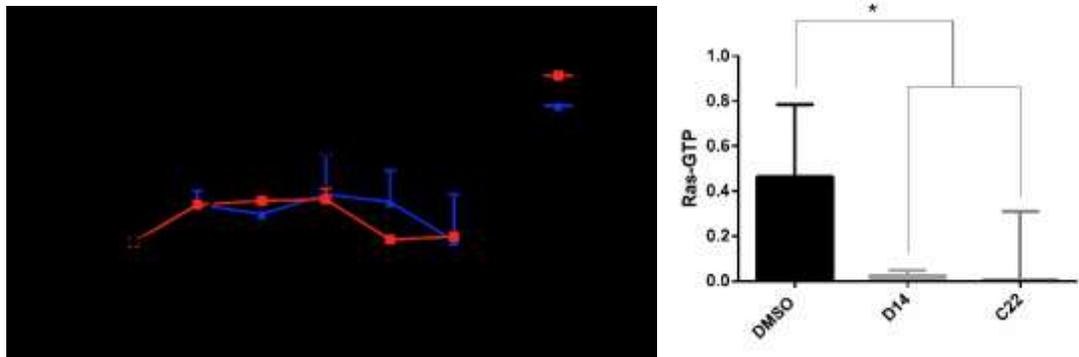


Figura 26| Los compuestos D14 y C22 disminuyen la activación de Ras. La activación de Ras fue determinada sobre la línea celular MIA Paca-2, con diferentes tratamientos D14 y C22 a 200 μ M y DMSO al 0.64 %, posterior a 1h de incubación, la activación de Ras fue estimulada con EGF (100 ng/ml) y fue evaluado a diferentes tiempos (3-60 min) (Izquierda). Gráfico con datos normalizados del tiempo de 60 min. (Derecha). Las barras del gráfico muestran el promedio \pm s.d. Los valores de *P* fueron obtenidos mediante *t-test*. * $P \leq 0.05$. *n* = 3.

Los compuestos D14 y C22 reducen la activación de ERK

Con el objetivo de determinar si los compuestos D14 y C22 estaban afectando las principales vías de señalización río abajo de Ras, en este caso la de RAF y PI3K se detectó a ERK y Akt fosforilado, este objetivo fue

realizado en colaboración con la **Dra. Haydée González de la Rosa** y la **M. en C. Reyna Sara Quintero Barceinas** en UAM-Cuajimalpa.

Las células fueron pre-incubadas durante 2 h con 5 μM de Deltarasin y durante 1 h con los compuestos D14 y C22 a las concentraciones del IC_{50} , 99.3 μM y 137.5 μM respectivamente. Pasando el tiempo de incubación éstas fueron estimuladas con factor de crecimiento epidermal (EGF) por 10 minutos. La forma fosforilada y proteínas totales de ERK y Akt fueron detectadas por *western blot* usando anticuerpos específicos, los resultados se observan en la **Fig. 27**.

El tratamiento con los compuestos D14, C22 y Deltarasin en las células de MIA PaCa-2 causaron una disminución en la fosforilación de ERK con respecto al estímulo (EGF). Sin embargo, presentaron mayor activación de la fosforilación con respecto al no tratado (NT). Este resultado se puede deber a que las proteínas de Ras no son las únicas moléculas que pueden activar a ERK. Adicionalmente, los tratamientos con los compuestos D14 y C22 presentaron una disminución marcada de la fosforilación de ERK con respecto al Deltarasin, lo cual quiere decir que los compuestos D14 y C22 analizados presentaron mayor efecto sobre la vía de señalización de Ras que el Deltarasin.

En el análisis de fosforilación de Akt en la línea celular de MIA PaCa-2 se obtuvieron variaciones, lo primero que se observa es que existe una disminución de la fosforilación en la condición control en presencia del estímulo, de igual manera se presenta con el tratamiento de Deltarasin, mientras que en los tratamientos con los compuestos D14 y C22 existe un incremento en la fosforilación.

En el caso de hTERT-HPNE la fosforilación de ERK, se ve abatida en presencia de los compuestos D14, C22 y Deltarasin con respecto a EGF, sin embargo, existe una disminución el tratamiento con el Deltarasin, observando un resultado similar en la fosforilación de Akt.

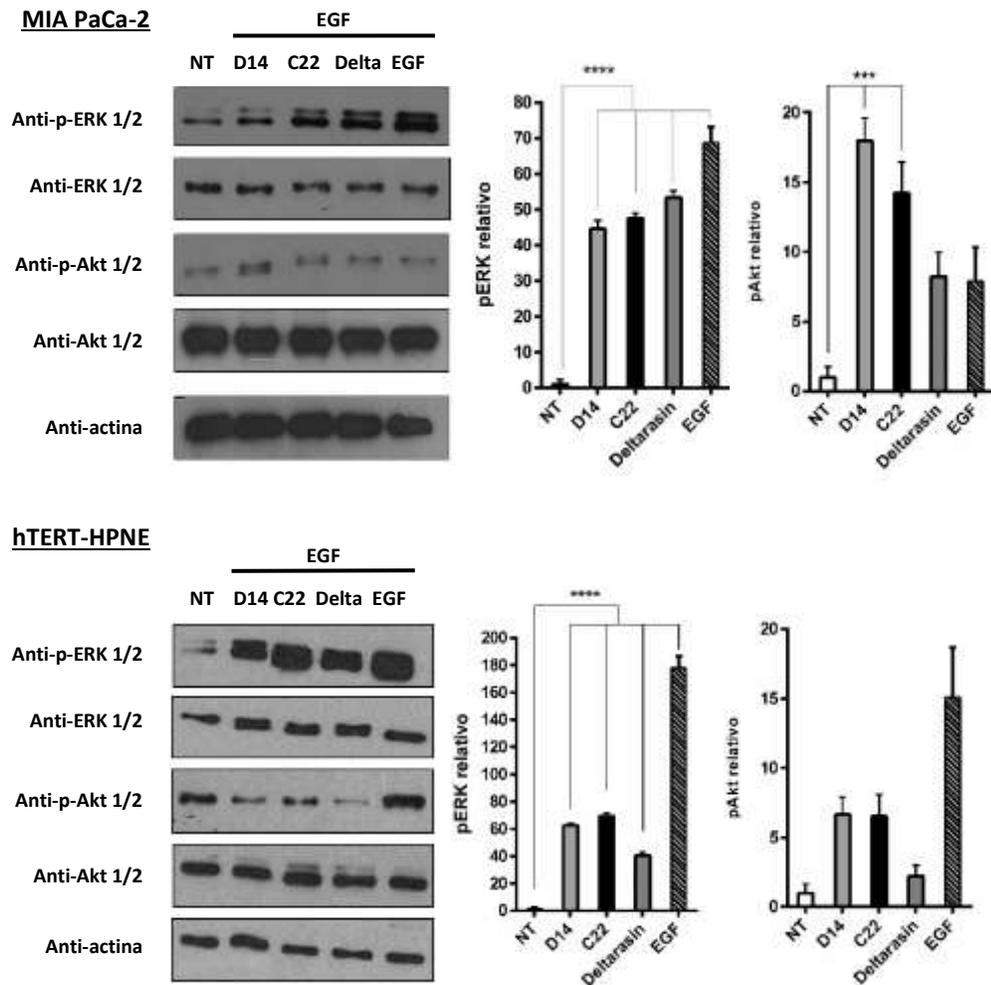


Figura 27| Efecto de los compuestos D14, C22 y Deltarasin en la fosforilación de ERK y Akt estimulada por EGF. Se detectó la expresión de p-ERK ½, ERK ½, p-Akt ½, Akt ½ y Actina. En el panel superior se encuentra resultado del *western blot* de la línea celular MIA PaCa-2 y mediante gráficos se muestran los resultados cuantitativos de la expresión de las proteínas, de 3 estudios independientes. En el panel inferior se muestra lo mismo para la línea celular normal de páncreas hTERT-HPNE. Los valores de *P* fueron obtenidos mediante *t-test*. **** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$. $n = 3$.

Si comparamos a los compuestos D14 y C22 con respecto al Deltarasin, los compuestos reducen más la fosforilación de ERK que el Deltarasin en la línea celular cancerosa, y el Deltarasin disminuye más la fosforilación de ERK que los compuestos en la línea celular no cancerosa lo que indica que los compuestos presentan mayor especificidad en la línea celular cancerosa.

5. Evaluación del impacto de los compuestos D14 y C22 en la formación tumoral en un modelo de ratón.

El compuesto D14 y C22 disminuyen el crecimiento tumoral dosis-dependiente en ratones ortotópicos de carcinoma pancreático.

Este objetivo se realizó en colaboración con el **Dr. Luis Alberto Medina Velázquez** y la **Dra. Irene Vergara Bahena** en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN).

Para evaluar la actividad antitumoral de los compuestos D14 y C22, los ratones nu/nu fueron inoculados vía subcutánea con células de cáncer de páncreas MIA PaCa-2 y el crecimiento tumoral fue monitoreado. Los diferentes tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.) tres veces por semana con un total de 7 inyecciones en cada ratón. Se probaron diferentes dosis (5, 10 y 20 mg kg⁻¹). Los resultados mostraron una reducción tumoral dosis-dependiente en los ratones tratados con los compuestos D14 y C22. El mayor efecto en la disminución del tamaño del tumor se observó con la dosis de 20 mg kg⁻¹ (**Fig. 28; a y c**), este efecto se incrementó respecto al DMSO (control) en la medida del último día (**Fig. 28; b y d**).

Los resultados muestran variación en las medidas tumorales, ya que no todos los tratamientos tuvieron el mismo efecto, por lo que es necesario incrementar el número de repeticiones. Es importante mencionar que la mayoría de los ratones durante el tratamiento no les generó pérdida de peso y aquellos que si lo tuvieron fueron de ~5% del peso total, por lo que no representa problema en los ratones. Se encuentra descrito que el Deltarasin causa una disminución del 15% en el peso de ratones durante los primeros dos días de tratamiento.

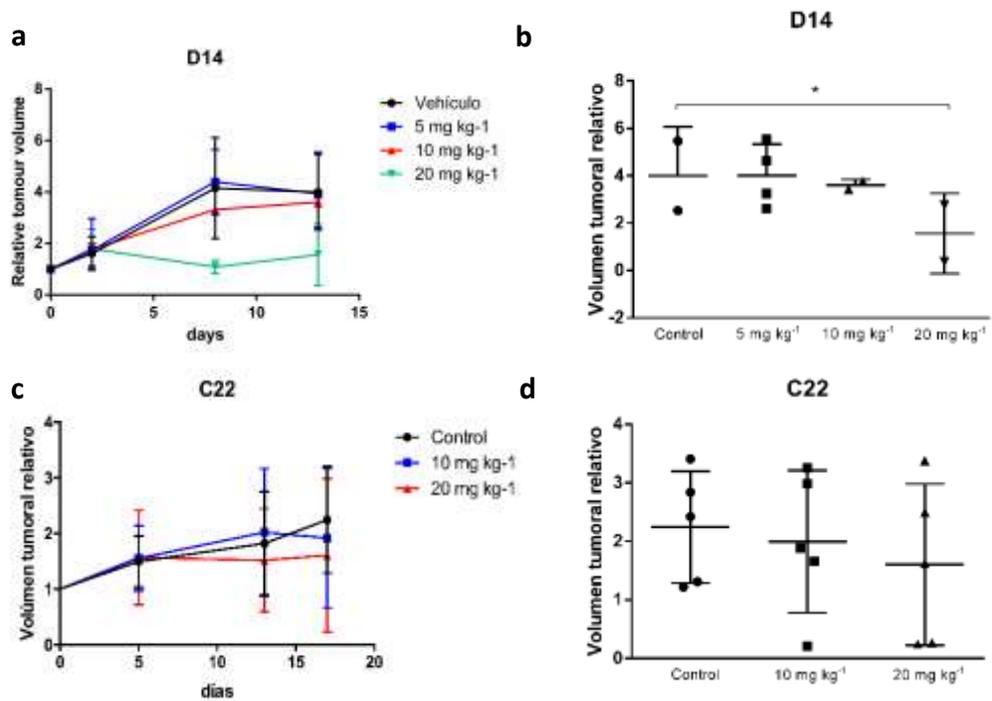


Figura 28| D14 y C22 disminuyen el crecimiento tumoral en ratones ortotópicos de cáncer pancreático. Medidas de volúmenes tumorales en ratones *nu/nu* (a y c) y distribución de volumen el último día de medida (b y d) de los tumores tratados con D14, C22 y DMSO. Los tratamientos fueron inyectados por vía intraperitoneal tres veces por semana a diferentes dosis (5, 10 y 20 mg kg⁻¹), recibieron en total 7 inyecciones. Los cambios en el volumen tumoral se dan en relación con el volumen inicial del tratamiento. Para el tratamiento con D14: n=2 para DMSO, n=4 para 5 mg kg⁻¹, n=2 para 10 mg kg⁻¹ y n=2 para 20 mg kg⁻¹; tratamiento con C22: n=5 para DMSO, n=4 para 10 mg kg⁻¹ y n=4 para 20 mg kg⁻¹. Las barras del gráfico muestran el promedio ± s.d. Los valores de *P* fueron obtenidos mediante *t-test*. * *P* ≤ 0.05.

DISCUSIÓN

La proteína KRas4B ha sido uno de los principales objetivos farmacológicos desde hace más de 30 años, la presencia de la proteína mutada ha tenido fuerte impacto en cáncer. Nuestro grupo de trabajo se planteó el objetivo de estabilizar el complejo molecular KRas4B-PDE δ .

Anteriormente han sido reportados compuestos que estabilizan complejos proteicos uno de los más interesantes es el paclitaxel, este es un quimioterápico e utiliza para el tratamiento del cáncer de mama, de ovario, de pulmón, de vejiga, de próstata, de melanoma, de esófago, entre otros. El paclitaxel se une con alta afinidad a un pocket hidrofóbico de la tubulina estabiliza la interacción α -tubulina con β -tubulina ocasionando la inhibición de la dinámica de moduladores de microtúbulos (Wani *et al.*, 1971). Existen otros fármacos que estabilizan las interacciones proteína-proteína, como por ejemplo, Brefeldina A, Rapamicina, Auxina, Forskolin, entre otros (Thiel *et al.*, 2012).

La ventaja de buscar una molécula que estabilice el complejo molecular KRas4B-PDE δ , es que el C-terminal de la GTPasa KRas4B es la región más cercana a PDE δ y esta región no es conservada con otras GTPasas, lo que incrementa la especificidad del compuesto por el complejo sin afectar la actividad de PDE δ en complejo con otras proteínas.

Por la similitud que presenta la proteína KRas4B con la GTPasa Rheb en identidad y estructura nos permitió utilizar el complejo tridimensional Rheb-PDE δ como plantilla para la construcción del modelo molecular por homología del complejo KRas4B-PDE δ . Esto fue corroborado por la superposición de la estructura cristalográfica de KRas4B (PDB: 4TQ9) superpuesta con la GTPasa Rheb (PDB: 3T5G), esta superposición presenta un valor de RMSD de 2.63 Å lo que nos indicó que la estructura de las proteínas son semejantes. El valor para que una molécula pueda ser aceptable en relación a la similitud en estructura, no debe de ser mayor a 2.9

Å (Carugo, 2003), entre más bajo sea el valor las estructuras presentan mayor similitud, por ejemplo, si la estructura es idéntica el valor de RMSD sería cero, mientras que la superposición entre la proteína KRas4B y PDE δ el valor de RMSD es de 20.36 Å, este último valor nos indica que no existe similitud en estructura (**APENDICE C**).

Adicionalmente en la superposición de la estructura KRas4B con el complejo molecular Rheb-PDE δ (**Fig. 14**) observamos que la mutación de KRas4B en el residuo 12, se encuentra alejada del sitio de interacción entre ambas proteínas del complejo, adicionalmente la mutación no generó un cambio estructural en la GTPasa, esto nos indicó que no sería posible encontrar un sitio específico de unión al ligando que estabilizara al complejo molecular con alguna mutación específica de KRas4B. Esto no quiere decir que no exista alguna región diferente a la proteína no mutada, podrían realizarse estudios de dinámica molecular los cuales simularían el movimiento de cada una de las moléculas que conforman al complejo molecular y en algún tiempo determinado se podría generar alguna cavidad diferente que funja como posible sitio de unión específico para el complejo molecular con KRas4B mutada. Como ocurrió en la búsqueda de un sitio de unión al receptor acoplado a proteína-G, Ivetac y McCammon realizaron ensayos de dinámica molecular de 0.5 micros., con esta simulación revelaron nuevos sitios de unión y fueron corroborados con datos experimentales (Ivetac y McCammon, *et al.*, 2010)

Una vez construido el modelo molecular por homología, se analizó su estructura secundaria, lo que nos permitió corroborar que la mayoría de los ángulos Phi y Psi se encontraban en zonas permitidas, esto nos indicó que los ángulos de los enlaces no se encontraron forzados. La Gly15, Thr74, Asp108, Ile163, Lys167, Arg197, Ser229, Gln268, Lys 273, Leu328 y Val330 se encontraron en zonas no permitidas, esto se puede deber a que la Asp108, Lys167 y Thr74 se encuentran en la región interfacial, y la Ile163 y Arg197 y Gln268 se encuentran expuestas al solvente, estas posiblemente

pueden poseer una gran movilidad estructural. El 97% de los aminoácidos se encontraron en zonas permitidas, lo que nos sugería que la estructura del modelo de tridimensional era aceptable para continuar con el *screening virtual*. El *screening virtual* involucra el acoplamiento proteína ligando o *Docking* y se caracteriza por utilizar una base de datos de los ligandos.

La estructura tridimensional del complejo reveló cuatro sitios críticos de reconocimiento molecular sobre la interface del complejo molecular, todos ellos presentaron cavidades de distintos tamaños y con características hidrofóbicas e hidrofílicas. Los sitios 1 y 3 son los de mayores dimensiones ya que más átomos o residuos los constituyen con características tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, en comparación con los sitios 2 y 4. Es importante destacar que estos sitios potenciales de unión, no están conservados en secuencia entre KRas4B y otras GTPasas y se convierten en blancos atractivos para el diseño de inhibidores específicos.

Las moléculas (incluyendo las proteínas) no son especies rígidas, éstas poseen dinamismo conformacional que en general se incrementa al aumentar la temperatura del sistema en que se encuentran. En los sistemas vivos este dinamismo se da de manera natural y es indispensable para que haya reconocimiento molecular, por ejemplo, proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN.

Modelar las conformaciones estructurales que puede sufrir la proteína y el ligando en tiempo real durante la simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando, aumenta considerablemente el tiempo de obtención de resultados o resulta bastante costoso ya que sería necesario el uso de ordenadores con procesadores más rápidos. No modelarlas puede disminuir el tiempo de obtención de resultados y resultaría menos costoso, pero al ser una aproximación más simple, los modelos resultantes podrían ser imprecisos, sin embargo, el uso de conformeros estructurales y diferentes posicionamientos de los ligandos sobre el sitio de unión conduce a una

aproximación en la simulación en el dinamismo conformacional de estos, previo al proceso al *docking*. (Alvarez y Schoichet, 2005).

Este trabajo fue realizado mediante *docking* rígido ya que el receptor y los ligandos permanecieron fijos durante la simulación del acoplamiento proteína-ligando, previamente se realizó la búsqueda de conformeros estructurales representativos de cada uno de los 50,240 compuestos que conforman la base de datos *3D Diversity Set* de Enamine, *MOE_ConformerImport* nos permitió generar aproximadamente cinco millones de conformeros con energía $E_{\text{conf}} \leq 3.0$ kcal/mol a partir de los compuestos de la base de datos. Se encuentra descrito que los ligandos que contienen de uno a seis enlaces rotables presentan energía conformacional igual o menor a 3.0 kcal/mol (Perola y Charifson, 2004), esto quiere decir que los compuestos que presentan el número de enlaces rotables mencionado y se le aplica la energía conformacional descrita por Perola, presentan altas posibilidades de que los compuestos sean activos, por lo que se decidió utilizar esa energía conformacional. Se obtuvieron aproximadamente 100 conformeros por compuesto. Cabe mencionar que la diversidad o número de conformeros que pueden construirse a partir de la estructura de un compuesto dado, depende del número de enlaces rotables (enlaces sencillos) presentes, ya que los enlaces dobles y triples y anillos no permiten giros.

La simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando entre cada uno de los conformeros y los 4 sitios potenciales de unión de ligandos localizados sobre la interface, generó 36 ligandos que presentaron un puntaje y frecuencia altos, estos ligandos tuvieron preferencia por el sitio de unión 3, el cual presentó un volumen mayor y una cavidad más profunda, formada con átomos hidrofóbicos y polares con respecto a los otros sitios, lo que probablemente le dio características propicias para la unión preferencial. Fueron seleccionados dos candidatos con puntaje y frecuencia bajos con la intención de evaluarlos en las líneas celulares, pero estos no presentaron

efecto significativo, en comparación de otros compuesto que presentaron un puntaje y frecuencia altos, sin embargo es necesario que estos pasen por otros ensayos experimentales para evaluar la eficiencia del *virtual screening*. Anteriormente se han reportado aplicaciones exitosas en el descubrimiento de compuestos usando *virtual screening* o *docking*, como por ejemplo, los inhibidores de CDK4 reportados por Honma y colaboradores, ellos realizaron modelado por homología de CDK4 y posteriormente *docking* molecular y encontraron compuestos que presentaban alta selectividad, fueron corroborados mediante la obtención cristalográfica del complejo proteína-ligando (Honma *et al.*, 2012), otros ejemplos se muestran en la **tabla 6 del APENDICE A.**

Del análisis se obtuvieron como posibles candidatos a los compuestos D14 y C22, en un estudio inicial estos compuestos mostraron mayor efectividad sobre la línea celular MIA PaCa-2 afectando en menor grado a la línea celular de hTER-HPNE. Adicionalmente, se decidió colocar como control el Deltarasin a la concentración efectiva reportada de 5 μ M (**Fig. 2**), éste afectó a la línea celular MIA PaCa-2 y aún más a la línea celular hTERT-HPNE, esto podría deberse a la posible inespecificidad que presenta el Deltarasin (Papke *et al.*, 2016), por lo que muy posiblemente esté afectando a otras proteínas aún desconocidas.

Las interacciones de los compuestos D14 y C22, únicamente la unión con Asp47 se encuentra conservada en las GTPasas Ras, en ambos casos, las otras interacciones son exclusivas de KRas4B, por lo que existe la posibilidad de que reconozcan exclusivamente a ésta GTPasa. Si se quisiera buscar moléculas análogas con el objetivo de mejorar la afinidad, para el compuesto D14 yo recomendaría conservar la acetamida y la piperazina, en el C22 recomendaría no hacer modificaciones a la benzamida y el grupo amino que se encuentra al lado de la benzamida, debido a que en esas regiones se generaron enlaces fuertes, de acuerdo a los resultados obtenidos *in silico*.

Lo primero que se observó en la estructura del compuesto D14, es que presenta una piperzina. La piperazina es un compuesto orgánico que consiste en un anillo de seis carbonos y contiene dos átomos de nitrógeno opuestos, esta se introdujo en 1953 como un antihelmíntico, su modo de acción es en general la paralización de los parásitos, que permite al cuerpo eliminarlos fácilmente (DrugBank, www.drugbank.ca). Anteriormente las piperazinas se han visto involucradas con efectos anticancerígenos (Chopra *et al.*, 2014), antiinflamatorios y antimicrobianos (Hatnapure *et al.*, 2012).

Al evaluar los compuestos D14 y C22 mostraron disminuir la viabilidad celular dosis dependiente, en mayor grado en la línea celular MIA PaCa-2 que en la línea celular hTERT-HPNE, interesantemente estos compuestos conllevaron a apoptosis únicamente a la línea celular MIA PaCa-2, observando un efecto selectivo. Estos resultados corroboran el efecto observado cuando se inhibe la expresión de KRas4B sobre las líneas celulares con KRas4B (mutado y WT) (Scholl *et al.*, 2009), por lo que existía probabilidad de estar afectando la actividad de KRas4B.

De acuerdo al resultado anterior se observó el efecto de los compuestos D14 y C22 sobre la activación de Ras y las vías de señalización río abajo de Ras. Los compuestos D14 y C22 disminuyeron la activación de las moléculas de Ras (Ras-GTP). Adicionalmente, provocaron una disminución en la fosforilación de ERK, no observando el mismo efecto en la fosforilación de Akt en la línea celular de MIA PaCa-2. Ihle y colaboradores reportaron que en líneas celulares de cáncer de pulmón, la activación de la vía de señalización de PI3K variaba de acuerdo al tipo de mutación que se encontrara presente en KRas4B, en donde demostraron, que en presencia de KRas4B^{G12C} la activación de la vía de señalización de PI3K no era dependiente de ésta mutación. Cuando se encuentra a KRas4B^{G12D} o KRas4B^{WT}, si es activada la vía de señalización de PI3K (Ihle *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que la línea celular MIA PaCa-2 presenta a KRas4B^{G12C} y hTERT-HPNE tiene a KRas4B^{WT}, probablemente el resultado obtenido se

debe al tipo de modificación que presenta KRas4B, sin embargo, es necesario corroborar este resultado utilizando más líneas celulares de cáncer pancreático con diferentes mutaciones, ya que esto no ha sido reportado en cáncer pancreático.

En el 2012, Collins y colaboradores, presentaron un ratón transgénico de cáncer de páncreas, el cual presenta un vector de inducción reversible de la expresión de KRas4B^{G12D}. Con este modelo lograron inducir formación tumoral exclusivamente en páncreas y observaron que cuando revertían la expresión de KRas4B^{G12D} hubo una disminución en el tamaño tumoral. Los compuestos D14 y C22 mostraron un efecto negativo sobre el crecimiento tumoral de MIA PaCa-2 en ratones ortotópicos en los que se logró observar una disminución del tamaño tumoral con cada uno de los compuestos con respecto al control, presentando mayor efecto el compuesto D14. Es necesario remarcar, ningún ratón control redujo el tamaño tumoral a diferencia de algunos ratones que se les administro el tratamiento.

Hasta este punto, los compuestos D14 y C12 presentan una actividad prometedora sobre activación de KRas4B, pero es necesario demostrar que los compuestos reconocen al complejo molecular KRas4B-PDE δ o solo a una de las dos proteínas u otra proteína distinta.

En conclusión se identificaron pequeñas moléculas que estabilizan el complejo molecular KRas4B-PDE δ mediante *virtual screening*, afectando la activación de Ras *in vitro*, lo que proporcionó una nueva alternativa para suprimir la señalización de Ras y el crecimiento tumoral en ratones ortotópicos. Los resultados abren la posibilidad de desarrollar fármacos contra el cáncer dependiente de KRas4B como son el de páncreas, pulmón y colorectal, sin embargo, es necesario desarrollar experimentos adicionales con mayor número de variables involucradas que nos permitan establecer el mecanismo de acción específico de los compuestos encontrados en este trabajo.

PERSPECTIVAS

Comprender como están funcionando los compuestos obtenidos en este trabajo por la técnica de *docking*, en este momento es uno de los principales intereses de nuestro laboratorio, debido a que los compuestos han logrado discriminar la inhibición de células cancerosas de sanas y estos resultados se han asociado a los posibles efectos que pudiera causar la inhibición de KRas4B, por lo que se propone lo siguiente:

1. Corroborar la interacción de los compuestos con su sitio blanco, y determinar la constante de afinidad (k_D) de cada uno de los compuestos *in vitro*.
2. Cristalizar el complejo proteínico en interacción con los compuestos, esto nos permitirá conocer las interacciones exactas proteína-ligando, para poder realizar futuras mejoras en el compuesto o plantear nuevas hipótesis.
3. Buscar análogos al compuesto o realizar cambios al compuesto mediante síntesis química con el objetivo de mejorar su afinidad y su posible actividad.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez T. y Shoichet B. Virtual screening in drug discovery. Taylor & Francis, England, 2005.

Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P., & Cho, H. et al. (2010). Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 467(7315), 596-599. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09454>

Bos, J., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, 129(5), 865-877. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>

Britten, C. (2013). PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, 71(6), 1395-1409. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-013-2121-1>

Bryant, K., Mancias, J., Kimmelman, A., & Der, C. (2014). KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends In Biochemical Sciences*, 39(2), 91-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>

Buckingham, J., Glen, R., Hill, A., Hyde, R., Martin, G., & Robertson, A. et al. (1995). Computer-Aided Design and Synthesis of 5-Substituted Tryptamines and Their Pharmacology at the 5-HT_{1D} Receptor: Discovery of Compounds with Potential Anti-Migraine Properties. *J. Med. Chem.*, 38(18), 3566-3580. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00018a016>

Campbell, P., Boufaied, N., Fiordalisi, J., Cox, A., Falardeau, P., Der, C., & Gourdeau, H. (2010). TLN-4601 suppresses growth and induces apoptosis of pancreatic carcinoma cells through inhibition of Ras-ERK MAPK signaling. *Journal Of Molecular Signaling*, 5, 18. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-2187-5-18>

Caporuscio, F., Rastelli, G., Imbriano, C., & Del Rio, A. (2011). Structure-Based Design of Potent Aromatase Inhibitors by High-Throughput Docking. *J. Med. Chem.*, 54(12), 4006-4017. <http://dx.doi.org/10.1021/jm2000689>

Carugo, O. (2003). How root-mean-square distance (r.m.s.d.) values depend on the resolution of protein structures that are compared. *J Appl Cryst*, 36(1), 125-128. <http://dx.doi.org/10.1107/s0021889802020502>

Cerchietti, L., Ghetu, A., Zhu, X., Da Silva, G., Zhong, S., & Matthews, M. et al. (2010). A Small-Molecule Inhibitor of BCL6 Kills DLBCL Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Cell*, 17(4), 400-411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.050>

Chandra, A., Grecco, H., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., & Skoulidis, F. et al. (2012). The GDI-like solubilizing factor PDE δ sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nature Cell Biology*, 14(3), 329-329. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2462>

Chandra, A., Grecco, H., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., & Skoulidis, F. et al. (2012). The GDI-like solubilizing factor PDE δ sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nature Cell Biology*, 14(3), 329-329. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2462>

Cherfils, J. & Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, 93(1), 269-309. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>

Chopra, A., Anderson, A., & Giardina, C. (2013). Novel Piperazine-based Compounds Inhibit Microtubule Dynamics and Sensitize Colon Cancer Cells to Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis. *Journal Of Biological Chemistry*, 289(5), 2978-2991. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m113.499319>

- Collins, M., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J., Galbán, S., & Galbán, C. et al. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *Journal Of Clinical Investigation*, 122(2), 639-653. <http://dx.doi.org/10.1172/jci59227>
- Collins, M., Brisset, J., Zhang, Y., Bednar, F., Pierre, J., & Heist, K. et al. (2012). Metastatic Pancreatic Cancer Is Dependent on Oncogenic Kras in Mice. *Plos ONE*, 7(12), e49707. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049707>
- Court, H., Amoyel, M., Hackman, M., Lee, K., Xu, R., & Miller, G. et al. (2013). Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase deficiency exacerbates KRAS-driven pancreatic neoplasia via Notch suppression. *Journal Of Clinical Investigation*, 123(11), 4681-4694. <http://dx.doi.org/10.1172/jci65764>
- Cox, A., Der, C., & Philips, M. (2015). Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery?. *Clinical Cancer Research*, 21(8), 1819-1827. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-3214>
- Cox, A., Fesik, S., Kimmelman, A., Luo, J., & Der, C. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission Possible?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(11), 828-851. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4389>
- Cushman, D. & Ondetti, M. (1991). History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*, 17(4), 589-592. <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.17.4.589>
- Danovi, S., Wong, H., & Lemoine, N. (2008). Targeted therapies for pancreatic cancer. *British Medical Bulletin*, 87(1), 97-130. <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldn027>
- Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E., Urosevic, J., Lechuga, C., & Esteban, L. et al. (2010). Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *EMBO J*, 29(6), 1091-1104. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.7>
- Duncan, J., Whittle, M., Nakamura, K., Abell, A., Midland, A., & Zawistowski, J. et al. (2012). Dynamic Reprogramming of the Kinome in Response to Targeted MEK Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell*, 149(2), 307-321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.053>
- Duncia, J., Chiu, A., Carini, D., Gregory, G., Johnson, A., & Price, W. et al. (1990). The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: a new class of potent antihypertensives. *J. Med. Chem.*, 33(5), 1312-1329. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00167a007>
- Ekonomiuk, D., Su, X., Ozawa, K., Bodenreider, C., Lim, S., & Otting, G. et al. (2009). Flaviviral Protease Inhibitors Identified by Fragment-Based Library Docking into a Structure Generated by Molecular Dynamics. *J. Med. Chem.*, 52(15), 4860-4868. <http://dx.doi.org/10.1021/jm900448m>
- Elliott, M. (2001). Zanamivir: from drug design to the clinic. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1416), 1885-1893. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2001.1021>
- Engelman, J., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A., & Upadhyay, R. et al. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Medicine*, 14(12), 1351-1356. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1890>

- Enyedy, I., Ling, Y., Nacro, K., Tomita, Y., Wu, X., & Cao, Y. et al. (2001). Discovery of Small-Molecule Inhibitors of Bcl-2 through Structure-Based Computer Screening. *J. Med. Chem.*, 44(25), 4313-4324. <http://dx.doi.org/10.1021/jm010016f>
- Esteban, L., Vicario-Abejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., & Yienger, K. et al. (2001). Targeted Genomic Disruption of H-ras and N-ras, Individually or in Combination, Reveals the Dispensability of Both Loci for Mouse Growth and Development. *Molecular And Cellular Biology*, 21(5), 1444-1452. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.21.5.1444-1452.2001>
- Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., & Andricopulo, A. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, 20(7), 13384-13421. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Fleming, J. (2005). Molecular Consequences of Silencing Mutant K-ras in Pancreatic Cancer Cells: Justification for K-ras-Directed Therapy. *Molecular Cancer Research*, 3(7), 413-423. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-04-0206>
- Freeman, A., Ritt, D., & Morrison, D. (2013). Effects of Raf Dimerization and Its Inhibition on Normal and Disease-Associated Raf Signaling. *Molecular Cell*, 49(4), 751-758. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.018>
- García-Gutiérrez, P., Landa-Piedra, A., Rodríguez-Romero, A., Parra-Unda, R., & Rojo-Domínguez, A. (2011). Novel inhibitors to *Taenia solium* Cu/Zn superoxide dismutase identified by virtual screening. *Journal Of Computer-Aided Molecular Design*, 25(12), 1135-1145. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-011-9498-x>
- Gilmartin, A., Bleam, M., Groy, A., Moss, K., Minthorn, E., & Kulkarni, S. et al. (2011). GSK1120212 (JTP-74057) Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained In Vivo Pathway Inhibition. *Clinical Cancer Research*, 17(5), 989-1000. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-10-2200>
- Goldstein, J. (1995). Polylysine and CVIM Sequences of K-RasB Dictate Specificity of Prenylation and Confer Resistance to Benzodiazepine Peptidomimetic in Vitro. *Journal Of Biological Chemistry*, 270(11), 6221-6226. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.11.6221>
- Gorfe, A., Grant, B., & McCammon, J. (2008). Mapping the Nucleotide and Isoform-Dependent Structural and Dynamical Features of Ras Proteins. *Structure*, 16(6), 885-896. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2008.03.009>
- Grädler, U., Gerber, H., Goodenough-Lashua, D., Garcia, G., Ficner, R., & Reuter, K. et al. (2001). A new target for shigellosis: rational design and crystallographic studies of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase¹¹Edited by R. Huber. *Journal Of Molecular Biology*, 306(3), 455-467. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4256>
- Grant, B., Gorfe, A., & McCammon, J. (2009). Ras Conformational Switching: Simulating Nucleotide-Dependent Conformational Transitions with Accelerated Molecular Dynamics. *Plos Comput Biol*, 5(3), e1000325. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000325>
- Grüneberg, S., Wendt, B., & Klebe, G. (2001). Subnanomolar Inhibitors from Computer Screening: A Model Study Using Human Carbonic Anhydrase II. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(2), 389-393. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773\(20010119\)40:2<389::aid-anie389>3.0.co;2-#](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773(20010119)40:2<389::aid-anie389>3.0.co;2-#)

Hatzivassiliou, G., Haling, J., Chen, H., Song, K., Price, S., & Heald, R. et al. (2013). Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. *Nature*, 501(7466), 232-236. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12441>

Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B., Anderson, D., & Alvarado, R. et al. (2010). Abstract 5753: RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Cancer Research*, 70(8 Supplement), 5753-5753. <http://dx.doi.org/10.1158/1538-7445.am10-5753>

Honma, T., Hayashi, K., Aoyama, T., Hashimoto, N., Machida, T., & Fukasawa, K. et al. (2001). Structure-Based Generation of a New Class of Potent Cdk4 Inhibitors: New de Novo Design Strategy and Library Design. *J. Med. Chem.*, 44(26), 4615-4627. <http://dx.doi.org/10.1021/jm0103256>

Ihle, N., Byers, L., Kim, E., Saintigny, P., Lee, J., & Blumenschein, G. et al. (2012). Effect of KRAS Oncogene Substitutions on Protein Behavior: Implications for Signaling and Clinical Outcome. *JNCI Journal Of The National Cancer Institute*, 104(3), 228-239. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djr523>

Ishii, N., Harada, N., Joseph, E., Ohara, K., Miura, T., & Sakamoto, H. et al. (2013). Enhanced Inhibition of ERK Signaling by a Novel Allosteric MEK Inhibitor, CH5126766, That Suppresses Feedback Reactivation of RAF Activity. *Cancer Research*, 73(13), 4050-4060. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-3937>

Ismail, S., Chen, Y., Rusinova, A., Chandra, A., Bierbaum, M., & Gremer, L. et al. (2011). Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 942-949. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.686>

Ivetac, A. & Andrew McCammon, J. (2010). Mapping the Druggable Allosteric Space of G-Protein Coupled Receptors: a Fragment-Based Molecular Dynamics Approach. *Chemical Biology & Drug Design*, no-no. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.01012.x>

Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., & Schmitt, E. et al. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes & Development*, 11(19), 2468-2481. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.11.19.2468>

Koga, H., Itoh, A., Murayama, S., Suzue, S., & Irikura, T. (1981). Cheminform Abstract: Structure-Activity Relationships Of Antibacterial 6,7- And 7,8-Disubstituted 1-Alkyl-1,4-Dihydro-4-Oxoquinoline-3-Carboxylic Acids. *Chemischer Informationsdienst*, 12(16). <http://dx.doi.org/10.1002/chin.198116281>

Koutmou, K., McDonald, M., Brunelle, J., & Green, R. (2014). RF3:GTP promotes rapid dissociation of the class 1 termination factor. *RNA*, 20(5), 609-620. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.042523.113>

Kubinyi, H. (1999) Chance Favors the Prepared Mind - From Serendipity to Rational Drug Design, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 19:1-4, 15-39, DOI: 10.3109/10799899909036635

Laheru, D., Shah, P., Rajeshkumar, N., McAllister, F., Taylor, G., & Goldsweig, H. et al. (2012). Integrated preclinical and clinical development of S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid (FTS, Salirasib) in pancreatic cancer. *Invest New Drugs*, 30(6), 2391-2399. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-012-9818-6>

- Lim, S., Westover, K., Ficarro, S., Harrison, R., Choi, H., & Pacold, M. et al. (2013). Therapeutic Targeting of Oncogenic K-Ras by a Covalent Catalytic Site Inhibitor. *Angewandte Chemie*, 126(1), 203-208. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201307387>
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 4-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
- Lito, P., Rosen, N., & Solit, D. (2013). Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature Medicine*, 19(11), 1401-1409. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3392>
- Liu, M., Sjogren, A., Karlsson, C., Ibrahim, M., Andersson, K., & Olofsson, F. et al. (2010). Targeting the protein prenyltransferases efficiently reduces tumor development in mice with K-RAS-induced lung cancer. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 107(14), 6471-6476. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908396107>
- Luksch, T., Chan, N., Brass, S., Sotriffer, C., Klebe, G., & Diederich, W. (2008). Computer-Aided Design and Synthesis of Nonpeptidic Plasmepsin II and IV Inhibitors. *Chemmedchem*, 3(9), 1323-1336. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200700270>
- Lyons, J. (2001). Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocrine Related Cancer*, 8(3), 219-225. <http://dx.doi.org/10.1677/erc.0.0080219>
- Martin, Y., Bures, M., Danaher, E., DeLazzer, J., Lico, I., & Pavlik, P. (1993). A fast new approach to pharmacophore mapping and its application to dopaminergic and benzodiazepine agonists. *Journal Of Computer-Aided Molecular Design*, 7(1), 83-102. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00141577>
- Maurer, T., Garrenton, L., Oh, A., Pitts, K., Anderson, D., & Skelton, N. et al. (2012). Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(14), 5299-5304. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1116510109>
- McCormick, F. (2016). K-Ras protein as a drug target. *Journal Of Molecular Medicine*, 94(3), 253-258. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-016-1382-7>
- Morris, E., Jha, S., Restaino, C., Dayananth, P., Zhu, H., & Cooper, A. et al. (2013). Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors. *Cancer Discovery*, 3(7), 742-750. <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-13-0070>
- Morris, G. & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking. *Methods In Molecular Biology*, 443, 365-382. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Nancy, V.; Callebaut, I.; El Marjou, A.; de Gunzburg, J. J. The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *Biol. Chem.* 2002, 277, 15076–15084. DOI: 10.1074/jbc.M109983200
- Oberholzer, P., Kee, D., Dziunycz, P., Sucker, A., Kamsukom, N., & Jones, R. et al. (2011). RAS Mutations Are Associated With the Development of Cutaneous Squamous Cell Tumors in Patients Treated With RAF Inhibitors. *Journal Of Clinical Oncology*, 30(3), 316-321. <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2011.36.7680>

Ostrem, J., Peters, U., Sos, M., Wells, J., & Shokat, K. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, 503(7477), 548-551. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12796>

Padilla Zúñiga J y Rojo Domínguez A. (2002) Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking: aplicación al diseño de fármacos. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, XXVI: 129-145

Pang, Y., Xu, K., Kollmeyer, T., Perola, E., McGrath, W., Green, D., & Mangel, W. (2001). Discovery of a new inhibitor lead of adenovirus proteinase: steps toward selective, irreversible inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters*, 502(3), 93-97. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02672-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02672-2)

Papke, B., Murarka, S., Vogel, H., Martín-Gago, P., Kovacevic, M., & Truxius, D. et al. (2016). Identification of pyrazolopyridazinones as PDE δ inhibitors. *Nature Communications*, 7, 11360. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11360>

Perola, E. & Charifson, P. (2004). Conformational Analysis of Drug-Like Molecules Bound to Proteins: An Extensive Study of Ligand Reorganization upon Binding. *J. Med. Chem.*, 47(10), 2499-2510. <http://dx.doi.org/10.1021/jm030563w>

Riely, G., Johnson, M., Medina, C., Rizvi, N., Miller, V., & Kris, M. et al. (2011). A Phase II Trial of Salirasib in Patients with Lung Adenocarcinomas with KRAS Mutations. *Journal Of Thoracic Oncology*, 6(8), 1435-1437. <http://dx.doi.org/10.1097/jto.0b013e318223c099>

Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>

Rowell, C., Kowalczyk, J., Lewis, M., & Garcia, A. (1997). Direct Demonstration of Geranylgeranylation and Farnesylation of Ki-Ras in Vivo. *Journal Of Biological Chemistry*, 272(22), 14093-14097. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.22.14093>

Schmick, M., Vartak, N., Papke, B., Kovacevic, M., Truxius, D., Rossmannek, L., & Bastiaens, P. (2014). KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport. *Cell*, 157(2), 459-471. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.051>

Scholl, C., Fröhling, S., Dunn, I., Schinzel, A., Barbie, D., & Kim, S. et al. (2009). Synthetic Lethal Interaction between Oncogenic KRAS Dependency and STK33 Suppression in Human Cancer Cells. *Cell*, 137(5), 821-834. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.017>

Singh, A., Greninger, P., Rhodes, D., Koopman, L., Violette, S., Bardeesy, N., & Settleman, J. (2009). A Gene Expression Signature Associated with "K-Ras Addiction" Reveals Regulators of EMT and Tumor Cell Survival. *Cancer Cell*, 15(6), 489-500. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.022>

Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. (2013). Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 334-395. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.112.007336>

Spiegel, J., Cromm, P., Zimmermann, G., Grossmann, T., & Waldmann, H. (2014). Small-molecule modulation of Ras signaling. *Nature Chemical Biology*, 10(8), 613-622. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1560>

- Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., & Spleiss, O. et al. (2012). RAS Mutations in Cutaneous Squamous-Cell Carcinomas in Patients Treated with BRAF Inhibitors. *New England Journal Of Medicine*, 366(3), 207-215. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1105358>
- Sun, Q., Burke, J., Phan, J., Burns, M., Olejniczak, E., & Waterson, A. et al. (2012). Discovery of Small Molecules that Bind to K-Ras and Inhibit Sos-Mediated Activation. *Angewandte Chemie*, 124(25), 6244-6247. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201201358>
- Taveras, A., Remiszewski, S., Doll, R., Cesarz, D., Huang, E., & Kirschmeier, P. et al. (1997). Ras oncoprotein inhibitors: The discovery of potent, ras nucleotide exchange inhibitors and the structural determination of a drug-protein complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5(1), 125-133. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896\(96\)00202-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896(96)00202-7)
- Thiel, P., Kaiser, M., & Ottmann, C. (2012). ChemInform Abstract: Small-Molecule Stabilization of Protein-Protein Interactions: An Underestimated Concept in Drug Discovery?. *Cheminform*, 43(24), no-no. <http://dx.doi.org/10.1002/chin.201224269>
- Tsai, F., Lopes, M., Zhou, M., Court, H., Ponce, O., & Fiordalisi, J. et al. (2015). K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 112(3), 779-784. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1412811112>
- Vacca, J. & Condra, J. (1997). Clinically effective HIV-1 protease inhibitors. *Drug Discovery Today*, 2(7), 261-272. [http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446\(97\)01053-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1359-6446(97)01053-2)
- Wahlstrom, A., Cutts, B., Liu, M., Lindskog, A., Karlsson, C., & Sjogren, A. et al. (2008). Inactivating lcmt ameliorates K-RAS-induced myeloproliferative disease. *Blood*, 112(4), 1357-1365. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-094060>
- Wani, M., Taylor, H., Wall, M., Coggon, P., & McPhail, A. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, 93(9), 2325-2327. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00738a045>
- Watkins, A. & Arora, P. (2015). Structure-based inhibition of protein-protein interactions. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 94, 480-488. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.047>
- Weise, K., Kapoor, S., Werkmüller, A., Zimmermann, G., Triola, G., Waldmann, H., & Winter, R. (2013). Dissociation of the K-Ras4B/PDEδ Complex Upon Contact with Lipid Membranes: Membrane Delivery Instead of Extraction. *Biophysical Journal*, 104(2), 95a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.567>
- Whyte, D., Kirschmeier, P., Hockenberry, T., Nunez-Oliva, I., James, L., & Catino, J. et al. (1997). K- and N-Ras Are Geranylgeranylated in Cells Treated with Farnesyl Protein Transferase Inhibitors. *Journal Of Biological Chemistry*, 272(22), 14459-14464. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.22.14459>
- Wilhelm, S. (2004). BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Research*, 64(19), 7099-7109. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-1443>
- Zhang, F. & Cheong, J. (2016). The renewed battle against RAS-mutant cancers. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73(9), 1845-1858. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2155-8>

Zhang, H., Li, S., Doan, T., Rieke, F., Detwiler, P., Frederick, J., & Baehr, W. (2007). Deletion of PrBP/ impedes transport of GRK1 and PDE6 catalytic subunits to photoreceptor outer segments. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 104(21), 8857-8862. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701681104>

Zhao, L., Huang, W., Liu, H., Wang, L., Zhong, W., & Xiao, J. et al. (2006). FK506-Binding Protein Ligands: Structure-Based Design, Synthesis, and Neurotrophic/Neuroprotective Properties of Substituted 5,5-Dimethyl-2-(4-thiazolidine)carboxylates. *J. Med. Chem.*, 49(14), 4059-4071. <http://dx.doi.org/10.1021/jm0502384>

Zimmermann, G., Papke, B., Ismail, S., Vartak, N., Chandra, A., & Hoffmann, M. et al. (2013). Small molecule inhibition of the KRAS–PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature*, 497(7451), 638-642. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12205>

APENDICE A

“Círculo virtuoso: biología y bioinformática”

Los descubrimientos accidentales siempre han desempeñado un papel importante en la ciencia, en especial en la búsqueda de nuevos fármacos, sin embargo, en los últimos años, el enfoque computacional se ha convertido en un método de gran importancia para el diseño de fármacos (Kubingy, 1999).

El diseño de fármacos basados en estructura se refiere al diseño y optimización de una estructura química con el objetivo de identificar un compuesto adecuado para análisis, un posible candidato farmacéutico. Se basa en el conocimiento de la estructura tridimensional del fármaco, y como su forma y carga pueden interactuar con su blanco biológico, en última instancia provocar un efecto (Morris y Lim-Wilby, 2008).

Los métodos computacionales (*in silico*) han sido desarrollados y aplicados ampliamente al diseño de fármacos basados en estructura. Estos métodos *in silico* incluyen, bases de datos de moléculas pequeñas (ligandos), relaciones cuantitativas estructura-actividad, búsqueda de similitud, farmacóforos, modelado por homología y otros tipo de modelado molecular, aprendizaje automático y manejo de datos, herramientas de análisis de red y herramientas de análisis de datos computacionales. Estos métodos, han sido frecuentemente utilizados en el descubrimiento y optimización de nuevas moléculas con afinidad a un blanco, así como para la aproximación de propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad, y caracterización fisicoquímica (Ferreira et al., 2015). Estos enfoques pueden ser utilizados para comprender la selectividad del receptor y por tanto la especificidad de los fármacos que interactúan con su blanco.

En la **tabla 5** se muestran algunos fármacos desarrollados mediante métodos computacionales que podemos encontrar actualmente en el mercado.

Tabla 5| Fármacos existentes en el mercado obtenidos *in silico* (diseño de fármacos basados en estructura). Algunos logros alcanzados haciendo uso de herramientas computacionales.

Fármaco	Nombre comercial (compañía farmacéutica)	Uso	Referencia
Captopril	CAPOTEN-GRUPO BRISTOL-MYERS-SQUIBB	antihipertensividad	Cushman et al.1991
Norfloxacin	NOROXIN (Kyorin Pharmaceutical)	Antibacteriano	Koga et al. 1981
Losartan	COZAAR (DuPont-Merck)	Tratamiento de la hipertensión	Duncia et al 1990.
Dorzolamida	TRUSOPT (Merck)	Tratamiento del glaucoma	Kubinyi, 1998
Zolmitriptan	ZOMING (AstraZeneca)	Tratamiento de la migraña	Martín et al., 1993.
Indinavir	CRIXIVAN (Merck)	Inhibidor de proteasa de VIH	Vacca y Condra, 1997.
Saquinavir	Invirase (Hoofmann- LA Roche)	Inhibidor de proteasa de VIH	Vacca y Condra, 1997.
Ritonavir	Norvir (Abbott Laboratories)	Inhibidor de proteasa de VIH	Vacca y Condra, 1997.
Nelfinavir	Viracept (Agouron pharmaceuticals)	Inhibidor de proteasa de VIH	Vacca y Condra, 1997.
Zanamivir	Relenza (GSK)	antigripal	Elliott, 2001.

¿Por qué utilizar docking molecular?

El *docking* molecular es una herramienta en biología molecular estructural y diseño de fármacos asistidos por computadora. El objetivo del *docking* es predecir los modos de unión predominantes de un ligando con una proteína con estructura tridimensional conocida. El *docking* se puede utilizar para realizar un screening virtual de grandes bases de datos de compuestos, clasificar resultados, y proponer hipótesis estructurales de como un ligando puede generar una actividad sobre el blanco, técnica sumamente valiosa de optimización (Morris y Lim-Wilby, 2008).

El área de *docking* molecular ha surgido durante las últimas tres décadas impulsada por las necesidades de la biología molecular estructural y el descubrimiento de fármacos basado en estructura. Se ha facilitado en gran medida por el crecimiento dramático en la disponibilidad y la potencia de las computadoras y la creciente facilidad de bases de datos de moléculas pequeñas y proteínas. El objetivo del software automatizado de *docking*

molecular, es la búsqueda de probabilidades de unión y la predicción de la afinidad de unión, el *docking* molecular se realiza generalmente entre una molécula blanco, esto se refiere a un soporte de la proteína para ligando, pero hay un interés creciente en el *docking* proteína-proteína (Ekins et al., 2007).

¿Cómo se realiza el docking molecular?

En términos generales se describe con los siguientes pasos (**Fig. 29**) (Padilla Zuñiga y Rojo Dominguez, 2002):

1. Es necesario disponer de una estructura tridimensional de la molécula blanco.
2. Debe indentificarse el sitio de unión sobre la molécula blanco.
3. Se requiere un archivo numeroso de ligandos potenciales, esto es, moléculas orgánicas con estructuras tridimensionales ya conocidas, estas deben de poseer características basadas en las reglas de Lipinski.
4. Se requiere un algoritmo computacional que toma a cada uno de los ligandos de la base de datos y lo coloca dentro del sitio de unión de la proteína blanco, generando una gran cantidad de orientaciones, con la intención de quedarnos con la orientación más favorable.

Cada uno de estos pasos conlleva a una serie de acciones a realizar, como se puede observar en la sección de métodos. Para determinar cuál es la interacción proteína-ligando más favorable, durante el *docking* se emplea un criterio numérico denominado score, el cual ayuda a distinguir cual ligando es el que presenta la mejor interacción.

Posterior al *docking* se pueden realizar una serie de ensayos con la finalidad de aproximar la afinidad y estabilidad del ligando sobre la proteína, los cuales suelen ser de igual manera un criterio de selección.

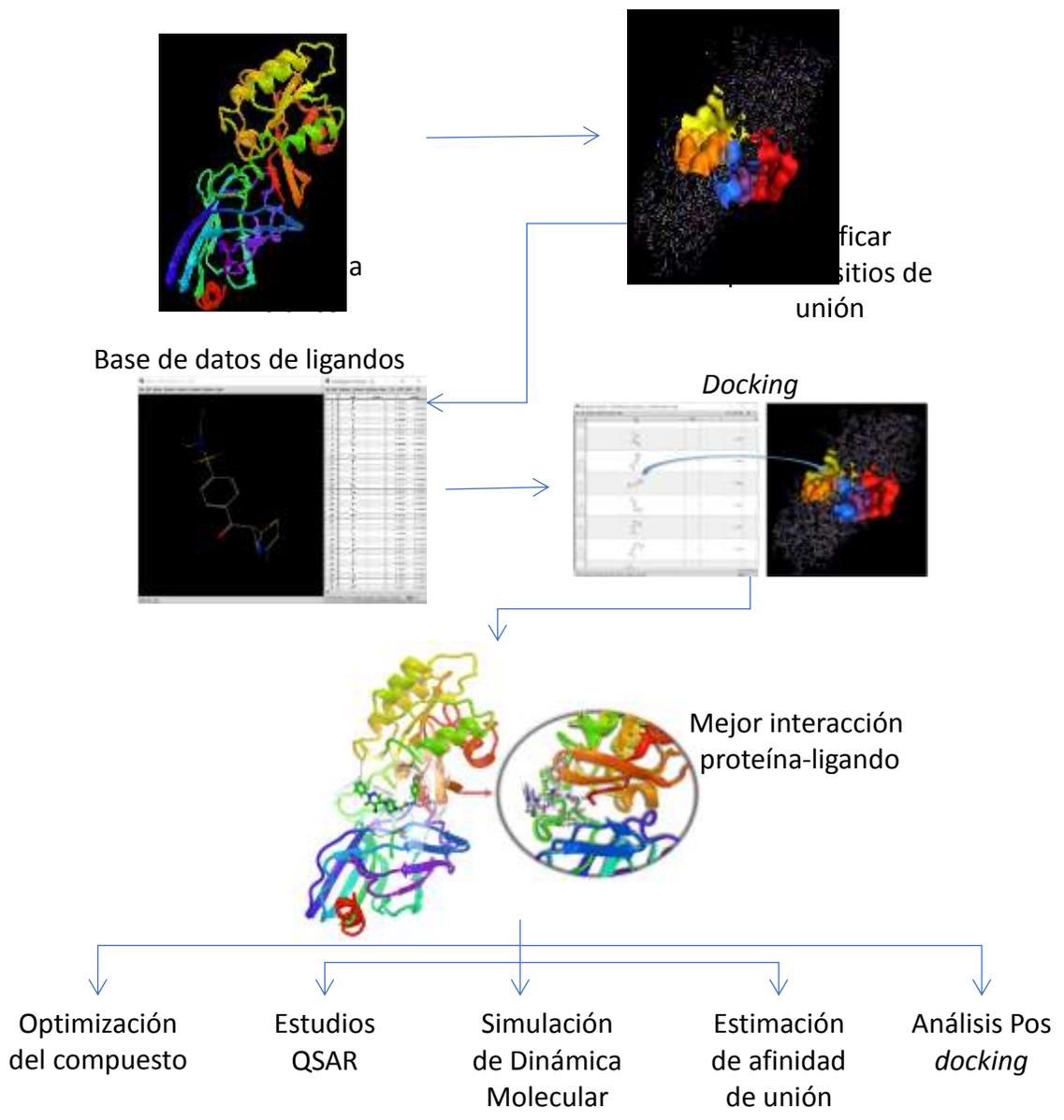


Figura 29] Esquema simplificado de los pasos de simulación del reconocimiento molecular o *docking*.

¿Qué se puede hacer si no contamos con una estructura tridimensional del blanco?

Para un estudio de *docking* es necesario contar una estructura tridimensional del blanco, si no es el caso, se puede recurrir a realizar un modelado molecular por homología. Esta técnica es basada en la observación de que la estructura terciaria de las proteínas es mejor conservada de la secuencia de

aminoácidos. El procedimiento de modelado por homología es realizado por varios pasos (**Fig. 30**) (Sliwosky, 2014):

1. Se debe seleccionar la estructura que servirá como templado. Estos templados consisten en proteínas que comparten similitud significativa de la secuencia con el blanco de la proteína (más del 30% de identidad de la secuencia) y que su estructura tridimensional esté disponible. Lo recomendable es tener una identidad de más del 50% para evitar errores en la proteína a modelar.
2. Se realiza un alineamiento de la secuencia de la proteína blanco con la del templado.
3. Basado sobre el alineamiento de la secuencia y la estructura tridimensional del templado, los criterios geométricos son utilizados para generar un modelo estructural tridimensional de la proteína blanco.
4. El modelo estructural es evaluado de acuerdo a cálculos de energía y potenciales estadísticos.

Es necesario mencionar que existen muchas otras técnicas que en combinación con el modelado molecular y *docking* contribuyen a mejorar el direccionamiento de la molécula sobre su sitio blanco.

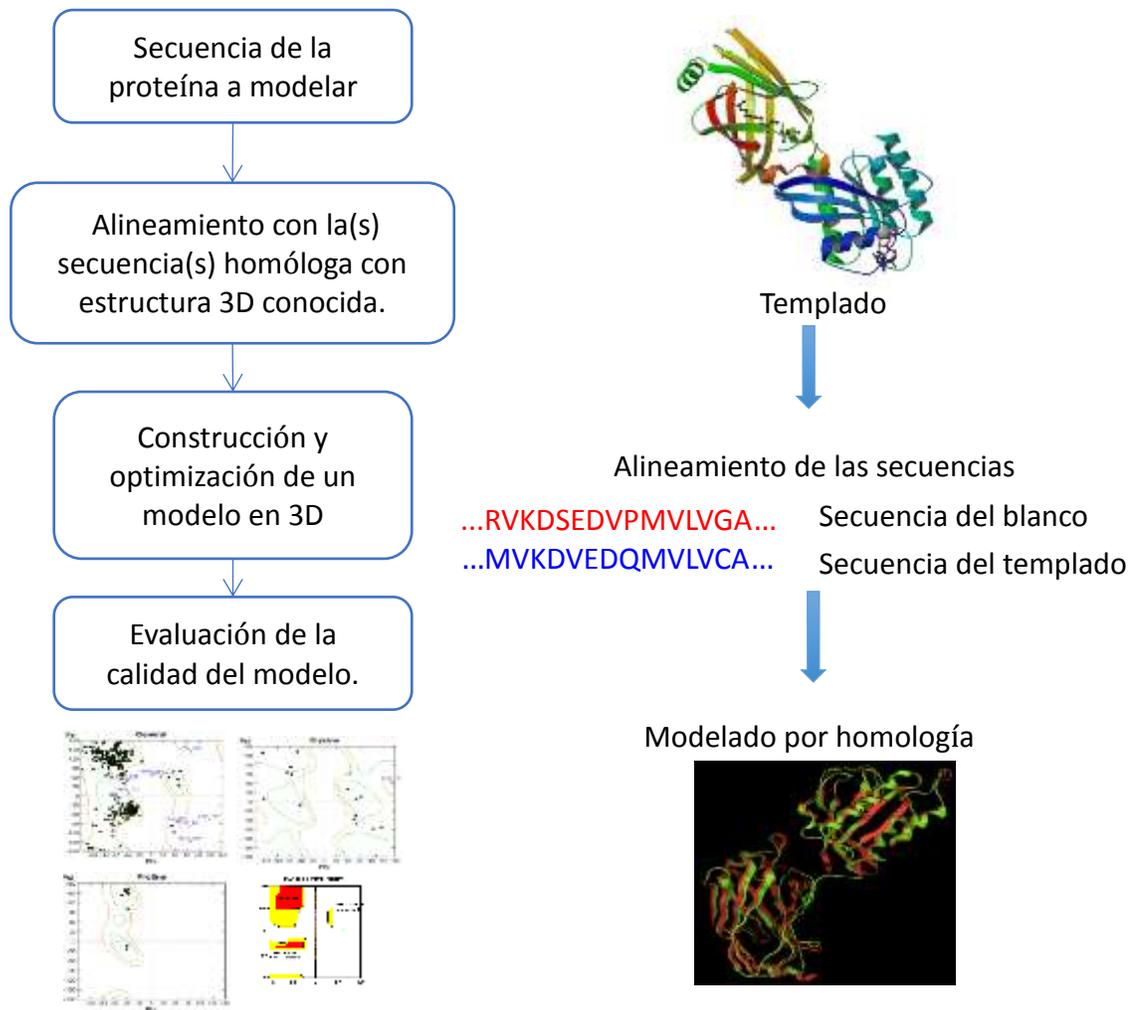


Figura 30 | Esquema simplificado de las etapas del modelado molecular por homología.

El modelado por homología y *docking* pueden ser combinados con éxito para acelerar el descubrimiento de fármacos (Watkins y Arora, 2015), sin embargo, es necesario remarcar que los experimentos juegan un papel esencial para la validación de esta metodología, las comparaciones de técnicas de modelado molecular por homología y *docking* con los datos experimentales sirven para comprobar la exactitud de los resultados calculados y establecer criterios para la mejora de la metodología. Varios estudios han mostrado buenos resultados entre estudios computacionales y experimentales, en la **Tabla 6** se muestran algunos de ellos.

Tabla 6| Ejemplos de aplicaciones exitosas en el descubrimiento de compuestos usando *docking* molecular. Tabla modificada de Shoichet et al. 2002.

Blanco	Tipo de estructura utilizada.	Estructura del complejo resuelta	Referencia
CDK4	Modelo por homología	Si	Honma et al. 2001
Bcl-2	Modelo por homología	No	Enyedy et al. 2001
Proteasa de adenovirus	Rayos-X	No	Pang et al. 2001
Receptor de ácido retinoico	Modelo por homología	No	Gradler et al. 2001.
TGT	Rayos-X	Si	Gradler et al. 2001.
Anhidrasa carbónica II	Rayos-X	Si	Gruneberg et al. 2001.
Proteasas de Flavivirus	Rayos-X	No	Ekonomiuk et al 2009 ab
Plasmepsina II y IV	Modelo por homología	No	Luksch et al., 2008.
BCL6 sobre linfomas en células B	Rayos-X	Si	Cerchietti et al., 2010
Superóxido dismutasa Cu/Zn	Rayos-X	No	García-Gutiérrez et al. 2011.

En conclusión, la aplicación de métodos *in silico* basados en estructura en el diseño de fármacos está en curso, la predicción y el diseño sugiere un futuro potencial presentando un amplio campo de oportunidades en el descubrimiento de nuevos blancos moleculares y en última instancia en encontrar compuestos con actividad biológica para estos nuevos blancos

APENDICE B

“Reglas de Lipinski”

Estas reglas basadas sobre el 90% de las propiedades de distribución de fármacos, solo se aplican a la absorción por difusión pasiva de compuestos a través de las membranas celulares; compuestos que son transportados activamente a través de las membranas celulares por proteínas transportadoras son excepciones de la regla. Debido a gran parte a su simplicidad, los criterios de Lipinski (Lipinski *et al.* 2001) son ampliamente utilizados por los químicos farmacéuticos para predecir no sólo la absorción de los compuestos, como Lipinski había pensado originalmente, sino también la semejanza de los fármacos en general. Los criterios son los siguientes:

- No debe de contener más de cinco grupos donadores de enlaces puente de hidrógeno.
- No debe de contener más de diez grupos aceptores de enlaces con puente de hidrógeno.
- Debe de poseer una masa molecular inferior a 600 Da.
- Debe de poseer un coeficiente de reparto octanol-agua (logP) inferior a cinco.

APENDICE C

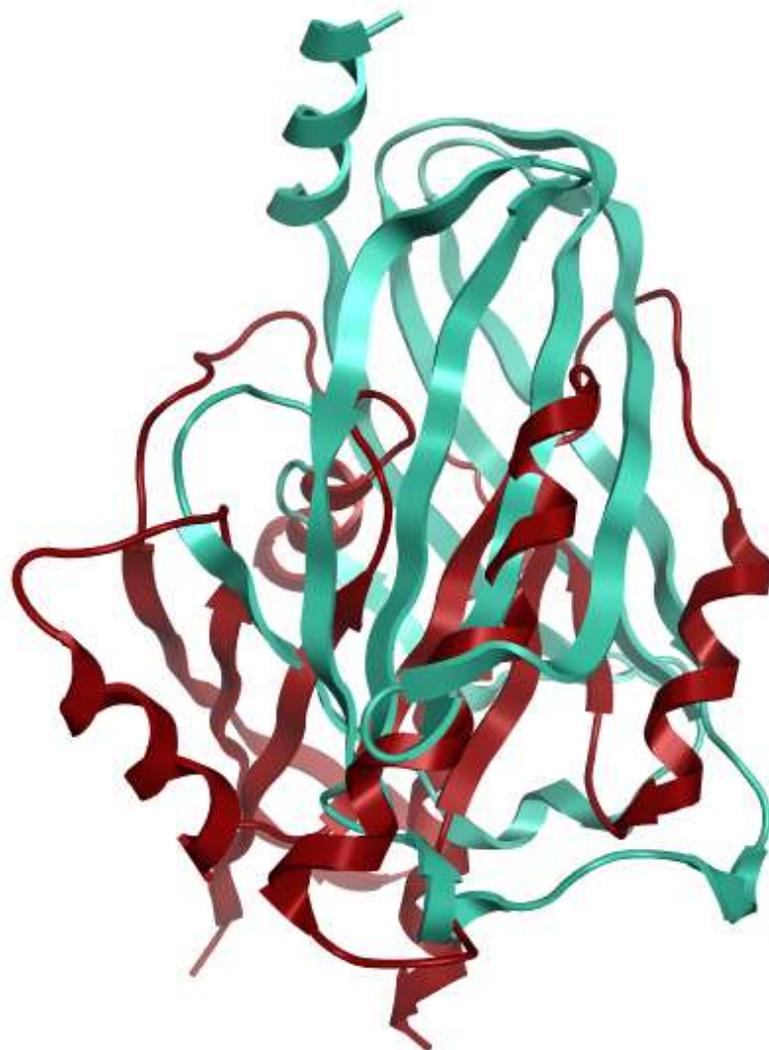


Figura 31| Proteína KRas4B superpuesta con la PDEδ. La proteína KRas4B en color vino (PDB: 4TQ9) superpuesta con la proteína PDEδ en color verde (PDB: 3T5G).

APENDICE D

KRas4B	1	---	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILD	57
HRas	1	---	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILD	57
NRas	1	---	MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILD	57
Rheb	1	MPQSKSRKIAILGYRSGVGSLLTIQFVEGQFVDSYDPTIENTFTKLITVNGQYHLQLVD	60	
RhoA	1	-MAAIRKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDOFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWD	59	
			:..: . **:* * : : * : * ** : : : : : * : *	
KRas4B	58	TAGQEEYSAMRDQYMRGEGFLCVFAINNTKSFEDTHHYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNK	117	
HRas	58	TAGQEEYSAMRDQYMRGEGFLCVFAINNTKSFEDTHQYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNK	117	
NRas	58	TAGQEEYSAMRDQYMRGEGFLCVFAINNTKSFADINLYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNK	117	
Rheb	61	TAGQDEYSIFPQYSIDINGYILVYSVTSIKSFEVTKVIHGKLLDMVGKVOIPIMLVGNK	120	
RhoA	60	TAGQEDYDRLRPLSPDPTDVLIMCFSIDSPDLENLPEKWTPEV-KHFCPNVPIILVGNK	118	
			****:*. : : : : : . * : * : : : : ****	
KRas4B	118	CDLPSRT-----VDTKQAOGLARSY-GIPFIETSAKTROGVDDAFYTLVREI	163	
HRas	118	CDLAART-----VESROAOGLARSY-GIPYIETSAKTROGVDDAFYTLVREI	163	
NRas	118	CDLPTRT-----VDTKQAEHLAKSY-GIPFIETSAKTROGVDDAFYTLVREI	163	
Rheb	121	KDLHMERV-----ISYEEGKALAESW-NAAFLESSAKENQTAVDVFERRIILEA	167	
RhoA	119	KDLRNDDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAA	178	
			** : : . . . : : * : : * ** : : . : *	
KRas4B	164	RKHKEKMSKDGG-KKKKSKTKCVIM	188	
HRas	164	ROHKLRLKNPPDESGPGCMCKCVLS	189	
NRas	164	RQYRMKKLNSDDGTQGCMLPCVVM	189	
Rheb	168	EKMD---GAASQGK---SSCSVM	184	
RhoA	179	LOAR-----RGKKKSGCLVL	193	
			: * :	

Figura 32| Alineamiento de la secuencia de las GTPasas Ras reguladas por PDEδ. El alineamiento de las GTPasas se realizó utilizando el servidor *Align* de UniProt (<http://www.uniprot.org>). El símbolo (*) indica que en esa posición los residuos son idénticos, (:) indica sustituciones conservativas, (.) sustituciones menos conservativas. Los residuos conservados se encuentran sombreados. Este alineamiento presenta una identidad del 17 %. Los puntos rojos indican los residuos de KRas4B que interactúan con el compuesto D14 y los puntos azules los que interactúan con el compuesto C22.