



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**

---

---

**“Investigación del método de interacción  
del antagonista Motixafortide y el receptor  
CXCR4: Implicaciones en la enfermedad  
de cáncer”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

**Karla Mariana Rebolledo Bustillo**

ASESORES

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán

Mayo 2023

Esta investigación se realizó gracias al financiamiento del  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

De enero de 2021 a diciembre de 2022

CVU 929045

*Dedicado a mi esposo y familia por siempre creer en mí, los amo.*

*-Mariana*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores, el Dr. José Manuel Pérez Aguilar y la Dra. Brenda Sánchez Gaytán. Gracias por su dedicación, consejos, conocimiento, amabilidad y amistad. Desde que entré al propedéutico supe que quería trabajar con ustedes y el camino ha sido de mucho aprendizaje y amor por la ciencia. Ustedes me inspiran a dar lo mejor de mí.

A mi jurado de tesis, Dra. Norma Caballero, Dra. María Eugenia Castro, Dr. Francisco Bustamante y Dr. José Villegas por el tiempo, la revisión y puntos de vista a este trabajo para su mejora continua.

A mis docentes por su paciencia, apoyo, conocimientos y vocación, Dr. Francisco Bustamante, Dr. Guillermo Soriano, Dra. Lidia Esmeralda García, Dra. Brenda Sánchez Gaytán y Dr. José Manuel Pérez Aguilar.

## ÍNDICE GENERAL

Abstract .....	2
Resumen .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>CAPÍTULO I ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	6
<b>ANTECEDENTES</b> .....	7
1.1 CÁNCER .....	7
1.1.1 Tipos de cáncer y tasa de supervivencia .....	8
1.1.2 Terapias actuales .....	9
1.2 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G .....	9
1.2.1 Características y función .....	11
1.2.2 Activación de los receptores acoplados a proteínas G .....	12
1.3. RECEPTOR CXCR4 Y SU RELEVANCIA EN EL CÁNCER .....	14
1.4 MOTIXAFORTIDE .....	16
1.4.1 Estudios clínicos de Motixafortide .....	17
1.5 SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR .....	19
1.5.1 Fundamentos teóricos .....	19
1.5.2 Campos de fuerza .....	20
1.5.3 Aplicaciones en sistemas biológicos .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO II METODOLOGÍA</b> .....	24
2.1 CONSTRUCCIÓN DEL COMPLEJO SDF1- $\alpha$ /CXCR4 .....	26
2.2 CONSTRUCCIÓN DEL COMPLEJO MOTIXAFORTIDE .....	27
2.3 PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS .....	29
2.4 PRE-DINÁMICA MOLECULAR .....	30

2.5 DINÁMICA MOLECULAR DE LOS SISTEMAS .....	31
2.6 ANÁLISIS DE DATOS .....	32
<b>CAPÍTULO III RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 RMSD DEL COMPLEJO MOTIXAFORTIDE/CXCR4 .....	34
3.2 MOTIVOS CONSERVADOS .....	35
3.2.1 Motivo PIF .....	35
3.2.2 Motivo NPXXY .....	37
3.2.3 Motivo W252 <sup>6.48</sup> “Toggle switch” .....	38
3.3 INTERACCIONES CARGA-CARGA EN EL COMPLEJO MOTIXAFORTIDE/CXCR4 .....	39
3.4 RESIDUOS NO NATURALES DE MOTIXAFORTIDE .....	43
3.4.1 Capping group 4-fluorobenzoilo.....	44
3.4.2 NPA3 derivado de naftaleno .....	45
<b>CAPÍTULO IV DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
4.1 DISCUSIÓN .....	48
4.2 CONCLUSIÓN .....	49
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción ligante-GPCR-Proteína G .....	10
Figura 2. Estructura general de los receptores acoplados a proteínas G.....	11
Figura 3. Estructura del receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4).....	14
Figura 4. Estructura de la quimiocina CXCL12/SDF1- $\alpha$ .....	15
Figura 5. Estructura primaria del antagonista Motixafortide (BL-8040/BKT140) .....	16
Figura 6. Metodología utilizada para las Simulaciones de Dinámica Molecular .....	25
Figura 7. Conformación inicial del complejo SDF1- $\alpha$ /CXCR4 .....	26
Figura 8. Construcción del ligante Motixafortide .....	27
Figura 9. Conformación inicial del complejo Motixafortide/CXCR4 .....	28
Figura 10. Sistema Motixafortide/CXCR4 .....	30
Figura 11. Pasos de la Simulación de dinámica molecular .....	32
Figura 12. Conformación más estable del complejo Motixafortide/CXCR4.....	35
Figura 13. Cambio conformacional del residuo F248 <sup>6.44</sup> .....	36
Figura 14. Cambio conformacional del residuo Y302 <sup>7.53</sup> en ambos complejos .....	37
Figura 15. Ángulos diedros “ <i>Toggle switch</i> ” de ambos complejos .....	39
Figura 16. Intercciones carga-carga del complejo Motixafortide/CXCR.....	40
Figura 17. Gráfica de distancia de la interacción D171-R2 .....	41
Figura 18. Gráfica de distancia de la interacción D187-R11 .....	42
Figura 19. Gráfica de distancia de la interacción E277-R14.....	42
Figura 20. Estructura del antagonista Motixafortide.....	43
Figura 21. Aminoácidos sintéticos del antagonista Motixafortide .....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadísticas de los tipos de cáncer más comunes .....	8
Tabla 2. Estudios clínicos de Motixafortide .....	18
Tabla 3. Interacciones importantes del complejo Motixafortide/CXCR4 .....	40

## **ABSTRACT**

Cancer is a group of diseases that has become a central problem and a priority in public health, since it represents the major cause of mortality and morbidity worldwide. Described as a pathogenic process of uncontrolled growth and dissemination of cells resulting in a disease with the ability to infiltrate, destroy normal body tissue and spread throughout the body, cancer caused approximately 10 million deaths and 19.3 million new cases in 2020. The principal clinical challenge in therapeutic development for cancer is the ability of this disease to develop resistance, therefore, conventional cancer treatment methods are usually useful for specific types of malignant tumor. In this context, not only finding new therapies that stop or eliminate the progression of cancer disease but also understanding in detail the current ones is a central problem in public health.

The main goal of this research work lies in characterizing the interaction formed by the antagonist ligand Motixafortide and the receptor CXCR4 in a physiological medium. This characterization will provide relevant information at the molecular level on the different segments of the peptide involved in stabilizing the inactive conformations of the human receptor of CXCR4. For this, the computational technique of atomistic simulation of molecular dynamics (MD) will be used. The results obtained will allow a better understanding of the pharmacology of Motixafortide and its possible antineoplastic activity.

## **RESUMEN**

El cáncer es un grupo de enfermedades que se ha convertido en un problema central en la salud pública, ya que representa la mayor causa de morbilidad, mortalidad e incidencia a nivel mundial. El cáncer se describe como un proceso patogénico de crecimiento y diseminación de células anormales con la habilidad de infiltrarse, destruir el tejido corporal sano y esparcirse por todo el organismo, causando aproximadamente 10 millones de muertes y 19.3 millones de casos nuevos tan solo en 2020. El principal desafío clínico en el desarrollo terapéutico para el cáncer es la habilidad que tiene para desarrollar resistencia, por ello, los tratamientos convencionales como la quimioterapia o radioterapia se pueden utilizar comúnmente para el caso particular de algunos tumores malignos. En este contexto, no solamente es encontrar nuevas terapias que eliminen o detengan al cáncer sino tener un entendimiento detallado de las terapias actuales es un tema prioritario de salud pública.

El principal objetivo de esta investigación es caracterizar la interacción formada por el ligante antagonista Motixafortide y el receptor celular CXCR4 en un ambiente fisiológico. Esta caracterización proveerá información relevante a nivel molecular sobre diferentes características químicas y estructurales del ligante involucradas en la estabilización de conformaciones inactivas del receptor humano CXCR4. Para lograr este objetivo, se utilizó la técnica computacional de simulaciones atomísticas de dinámica molecular (MD). Los resultados obtenidos permitirán un mejor entendimiento de la farmacología de Motixafortide y su actividad antineoplásica.

## INTRODUCCIÓN

El **cáncer** es un proceso patogénico de crecimiento y diseminación incontrolado de células que resulta en una enfermedad con capacidad de infiltrarse, destruir el tejido corporal normal y propagarse por todo el cuerpo. Es la primera causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial causando aproximadamente 10 millones de muertes y 19.3 millones de casos nuevos en 2020. En este contexto, encontrar nuevas terapias que eliminen o detengan la progresión de dicha enfermedad resulta un problema central de salud pública. Por otro lado, los receptores acoplados a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés) son proteínas integrales de la membrana con una gran importancia farmacológica ya que representan un tercio de los medicamentos existentes en la actualidad en el mercado.

En particular, el receptor **CXCR4** es un receptor de quimiocinas –pequeñas proteínas de señalización que inducen el movimiento direccional de varios tipos de células– cuyo ligante nativo es el factor 1 derivado de células estromales (**SDF-1 $\alpha$** , también llamado **CXCL12**). El receptor CXCR4 se encuentra en la mayoría de las células hematopoyéticas y su sobreexpresión contribuye de manera significativa a la migración celular, angiogénesis, metástasis, crecimiento tumoral y resistencia a la quimioterapia. Debido a que el receptor CXCR4 se expresa en más de 20 tipos de cánceres, es considerado como un blanco farmacológico muy atractivo con un gran potencial terapéutico.

Estudios recientes han demostrado el potencial de diferentes ligantes para inhibir la activación del receptor CXCR4 (ligantes antagonistas) en el contexto de la enfermedad del cáncer. Uno de los ligantes más prometedores para la modulación del receptor CXCR4 es **Motixafortide (BL-8040)**, un péptido sintético cíclico que bloquea la señalización del receptor CXCR4, evitando así su unión con SDF-1 $\alpha$  y la subsiguiente activación del receptor.

El **objetivo principal** de mi trabajo de investigación radica en caracterizar el modo de interacción del complejo formado por el ligante antagonista Motixafortide y el receptor CXCR4 en un medio fisiológico. Dicha caracterización proveerá de información relevante a nivel molecular sobre los distintos segmentos del péptido involucrados en estabilizar las conformaciones inactivas del receptor humana CXCR4. Para esto, se utilizará la técnica computacional de **simulaciones atomísticas de dinámica molecular**. Los resultados

obtenidos permitirán entender de una mejor manera la farmacología de Motixafortide y su posible actividad antineoplásica.

La preparación del sistema molecular consiste en embeber al complejo ligante/receptor en una membrana lipídica hidratada utilizando una concentración salina de NaCl de 0.15 M, con el fin de simular un medio fisiológico. Para contextualizar los resultados, también se estudió al sistema CXCL12 (agonista)/CXCR4. La construcción de los sistemas se realiza con ayuda del programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) mientras que las simulaciones se realizan con el programa NAMD (*Nanoscale Molecular Dynamics*). El campo defuerza utilizado para el describir al sistema molecular es CHARMM36.

Los resultados conseguidos después de 500,000,000 de pasos (1000 ns) de simulación se resumen en:

- Trayectorias del complejo. Evolución temporal de las posiciones y velocidades de los átomos.
- RMSD (raíz de la desviación media cuadrática). A través de este parámetro se determina si tanto el complejo Motixafortide/CXCR4 como el CXCL12/CXCR3 han llegado a un equilibrio estructural.
- Cambios conformacionales. Interacciones directas importantes de Motixafortide/CXCR4 tomando en cuenta una distancia de 4 Å.

# **Capítulo I**

## ***ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

## ANTECEDENTES

### 1.1 CÁNCER

El cáncer es un proceso patogénico de crecimiento y diseminación incontrolado de células que resulta en una colección de enfermedades con la capacidad de infiltrarse, destruir el tejido corporal normal y propagarse por todo el cuerpo. Las mutaciones celulares que provocan cáncer son el resultado de la combinación entre los factores genéticos de un individuo y factores externos como carcinógenos físicos (radiación UV y ionizante), químicos (humo de tabaco, ingesta de alcohol y arsénico, contacto con asbesto) o biológicos (infecciones por virus, bacterias o parásitos) (Ferlay et al., 2021; World Health Organization, 2022).

El cáncer puede formar masas anormales de tejido corporal (tumores malignos) que pueden crecer de forma desproporcionada e invadir y dañar tejidos adyacentes o ganglios linfáticos. Este crecimiento tumoral se realiza mediante el proceso de angiogénesis que consiste en la generación de vasos sanguíneos que alimentan a la masa tumoral. La propagación del cáncer hacia otros sitios u órganos mediante el sistema linfático se denomina metástasis.

La mayoría de los cánceres tiene cuatro etapas y conocer la etapa del cáncer es fundamental para planificar el mejor tratamiento. En la Etapa I, el cáncer se encuentra en un área pequeña y no se ha diseminado a tejidos adyacentes; se le denomina cáncer en estado temprano. Durante las Etapas II y III hay un crecimiento considerable en tejidos adyacentes y en ganglios linfáticos. En la Etapa IV el cáncer se ha esparcido a otras áreas, por lo que se le denomina metastásico o cáncer avanzado. (American Cancer Society, 2018; Cleveland Clinic, 2021)

Esta enfermedad es una de las mayores causas de mortalidad, morbilidad e incidencia a nivel mundial que causó aproximadamente 10 millones de muertes y 19.3 millones de casos nuevos en 2020. Desafortunadamente se espera que la incidencia aumente año con año y se estima que en 2040 existan 27 millones de casos nuevos de cáncer. Por lo anterior mencionado, estudiar el cáncer resulta como una prioridad en las políticas de salud mundial (Cancer Research UK, 2018; World Health Organization, 2020).

### 1.1.1 Tipos de cáncer y tasa de supervivencia

Los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial, en términos de incidencia (de mayor a menor), son el cáncer de mama, pulmón, colorrectal y próstata (Tabla. 1) (World Health Organization, 2022).

Tabla 1. Estadísticas de los tipos de cáncer más comunes

Tipo de cáncer	Incidencia (millones de casos)	Tasa de supervivencia
Mama	2.26	84% <sup>1</sup>
Pulmón	2.21	23%
Colorrectal	1.93	67%
Próstata	1.41	98%
Piel	1.20	98% <sup>2</sup>
Estómago	1.09	31%

<sup>1</sup> Cáncer de mama invasivo no metastásico

<sup>2</sup> Cáncer de piel de tipo melanoma

Gracias al avance de la ciencia, muchos tipos de cáncer están asociados con una alta tasa de supervivencia, incluidos el cáncer de mama, colorrectal y próstata (Tabla 1). La tasa de supervivencia del cáncer indica el porcentaje de personas que sobreviven a un determinado tipo y etapa de cáncer en un tiempo aproximado de 5 años después del diagnóstico. Para calcular el porcentaje de supervivencia se incluye a personas de todas las edades y afecciones médicas (tempranas o tardías) con las que se diagnosticó el cáncer (Pruthi, 2022).

Sin embargo, el cáncer de páncreas, especialmente el Adenocarcinoma Pancreático, está asociado con la peor tasa de supervivencia, pues debido a las dificultades del diagnóstico (detección en Etapa IV), la agresividad de la enfermedad y la ausencia de tratamiento sistémico efectivo, menos del 5% de los pacientes sobreviven a los 5 años tras el diagnóstico. Incluso si los tumores son extirpados, el promedio de vida después de la cirugía es de 17 a 23 meses. En la actualidad el adenocarcinoma pancreático causa 331,000 muertes al año (Aier et al., 2019; Khosravi-Shahi & Díaz Muñoz de la Espada, 2005; Mayo Clinic, 2020; Tan et al., 2019).

### 1.1.2 Terapias Actuales

Hoy en día un diagnóstico correcto de cáncer es fundamental para elegir la mejor terapia, ya que cada tipo de cáncer requiere un tratamiento en específico. Los tratamientos incluyen cirugía, radioterapia, y/o terapia sistémica (Mayo Clinic, 2022) .

En el caso de la cirugía, su objetivo principal es extirpar totalmente el tumor maligno o la mayor cantidad posible de él; si el procedimiento se realiza con éxito y en una etapa adecuada, la cirugía puede ser curativa. Para la radioterapia, se utilizan altas dosis de Rayos X con el fin de eliminar las células cancerígenas y reducir el tamaño de los tumores. Para finalizar, dentro de las terapias sistémicas se encuentran la quimioterapia, tratamientos hormonales y terapias biológicas dirigidas, en donde se utilizan fármacos u hormonas para destruir células cancerígenas y/o disminuir el tamaño de los tumores.

Sin embargo, no todas las terapias son efectivas para detener o eliminar la enfermedad, ya que dependen de la etapa y agresividad del cáncer que se estudie, es por ello por lo que se buscan nuevas alternativas que proporcionen mejores resultados a los pacientes. Por esta razón se realizan estudios clínicos de nuevos medicamentos, dispositivos y/o terapias, en donde se investiga y prueba su eficacia y seguridad para ser utilizados en pacientes, además de que se comparan con los mejores tratamientos conocidos hasta el momento.

Para que un estudio clínico sea aprobado debe de cumplir con tres fases. La fase I consiste en estudiar si el nuevo tratamiento es seguro o causa alguna reacción secundaria y se busca la mejor dosis para administrar el tratamiento. En la fase II se evalúa si un tipo específico de cáncer responde al tratamiento y para ello se monitorea el tamaño los tumores y el estado del paciente. La fase III compara el tratamiento nuevo con el tratamiento convencional para determinar si el nuevo es mejor, causa menores efectos secundarios o ambos (American Cancer Society, 2020).

## 1.2 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés) constituyen la familia de proteínas de membrana más grande y diversa en el genoma humano con alrededor de 800 miembros identificados. Los GPCRs participan en funciones fisiológicas como la visión, olfato,

gusto, dolor, neurotransmisión y respuestas endócrinas e inmunitarias, pero también son responsables de diversas enfermedades si se encuentran sobre expresados. Es por tal razón que los GPCRs son un importante blanco de desarrollo farmacológico ya que aproximadamente un tercio de los medicamentos existentes en el mercado actual se encuentran dirigidos hacia ellos (Nieto Gutierrez & McDonald, 2018; Zhou et al., 2019).

Los GPCRs reciben su nombre porque interactúan con proteínas G (Fig. 1), una familia de proteínas heterotriméricas formadas por subunidades alfa, beta y gamma, que tienen la capacidad de unir e hidrolizar guanosín trifosfato (GTP). Estos receptores al recibir señales extracelulares a través de ligantes (neurotransmisores, hormonas, proteínas, iones) sufren cambios conformacionales que transmiten a las proteínas G, desencadenando en ellas un proceso de activación-inactivación asociado a la hidrólisis de GTP (García-Sáinz, 2011; Hilger, 2021).

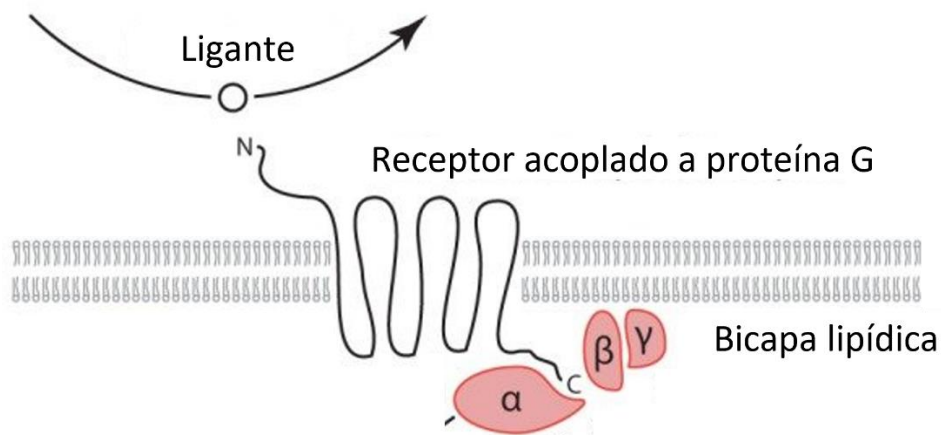


Figura 1. Interacción ligante-GPCR-proteína G

Los ligantes son moléculas que se unen a los receptores causando una respuesta biológica (activación o inactivación del receptor) y pueden ser ligantes endógenos (compuestos que naturalmente se producen en el cuerpo y se une al receptor para después activarlo) o exógenos (medicamentos). Los medicamentos que se unen a los GPCRs pueden promover o bloquear la respuesta fisiológica pues modulan señales intracelulares. Cuando un ligante se une al receptor y lo activa se le llama agonista, mientras que, si un ligante bloquea la acción del ligante agonista y el receptor permanece inactivo, se le llama antagonista.

La clasificación de los GPCR se divide en seis subfamilias, siendo la más grande y diversa en humanos la clase A (rodopsina). La clase B pertenece a la familia secretina, la clase C a los receptores metabotrópicos de glutamato, la clase D a los receptores de feromonas fúngicas, la clase E a los receptores de AMP cíclico y la clase F a los Frizzled/gusto (Isberg et al., 2015).

### 1.2.1 Características y función

La estructura de todos los receptores acoplados a proteínas G se compone por una cadena de aminoácidos cuyo extremo amino-terminal (N-ter) se localiza en la parte extracelular y el extremo carbonilo (C-ter) se encuentra en el citoplasma de la célula; además cuenta con siete hélices transmembranales con un sitio de unión a ligante que atraviesan la bicapa lipídica y que se encuentran unidas por tres asas extracelulares (ECL) y tres asas intracelulares (ICL) (Figura 2).

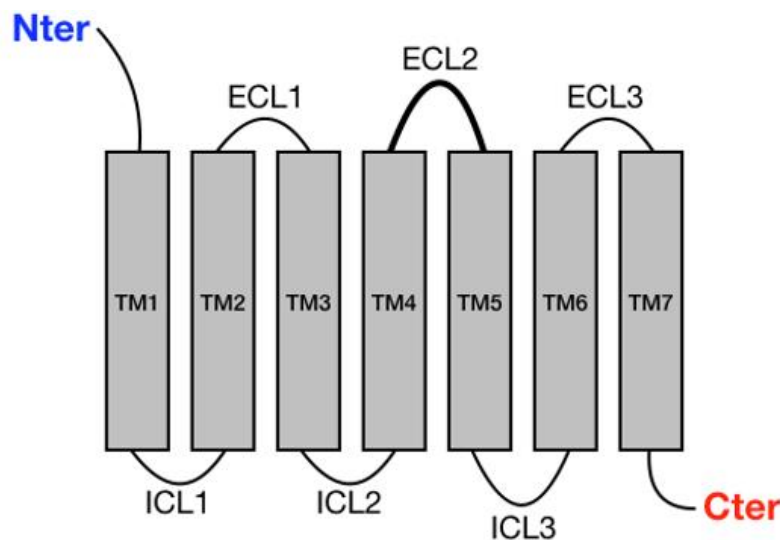


Figura 2. Estructura general de los receptores acoplados a proteínas G

Los GPCR comparten la mayor homología dentro de los segmentos transmembranales, sin embargo, las estructuras con mayor variabilidad dentro de estos receptores son el extremo carbonilo-terminal (C-ter), el asa intracelular 3 (ICL3) y el extremo amino-terminal (N-ter), siendo este último el segmento que muestra una mayor diversidad (Kobilka, 2007).

Existen distintos grupos de GPCRs, siendo en la actualidad los receptores de quimiocinas uno de los receptores más estudiados por sus implicaciones en enfermedades como el cáncer y el VIH. Los receptores de quimiocinas son proteínas integrales de la membrana que se unen e interactúan con ligantes específicos llamados citocinas, las cuales se clasifican en las varias subfamilias CXC, CC, CX3C y XC, dependiendo de la conservación de un motivo estructural en su región N-terminal.

### 1.2.2 Activación de los receptores acoplados a proteínas G

Entender el mecanismo de activación de los receptores acoplados a proteínas G es de gran relevancia farmacológica para el desarrollo de nuevos medicamentos. La activación de los GPCRs implica cambios conformacionales en las hélices transmembranales que conllevan al reclutamiento de diferentes proteínas G; dicho fenómeno es generalmente debido a la unión de ligantes agonistas, es decir, la activación de las GPCRs es clasificada como un proceso alostérico que transforma estímulos externos en respuestas en el interior de la célula. Se han identificado mecanismos comunes en la activación de los GPCRs en donde se involucran grupos de aminoácidos conservados evolutivamente así como sitios de unión a iones (Hilger, 2021; Zhou et al., 2019).

Los aminoácidos que conectan el sitio de unión del ligante a la región de acoplamiento de la proteína G están significativamente más conservados y con motivos particulares de secuencia identificados. De acuerdo con la notación de Ballesteros-Weinstein los motivos más conservados en las hélices transmembranales son DR<sup>3.50</sup>Y en la transmembrana 3 (TM3), VW<sup>4.50</sup>VL, VW<sup>4.50</sup>LT o VW<sup>4.50</sup>FT en la TM4, PIF (P<sup>5.50</sup>, I<sup>3.40</sup>, F<sup>6.44</sup>), CWXP (C<sup>6.47</sup>, W<sup>6.48</sup>, X, P<sup>6.50</sup>) en TM6 y por último NP<sup>7.50</sup>XXY en la TM7, donde X representa a cualquier aminoácido (Zhou et al., 2019).

El cambio conformacional más importante asociado con la activación en los GPCR ocurre en la transmembrana 6 (TM6) ya que se mueve y rota hacia afuera del receptor aproximadamente 10 Å, acompañada por otra rotación menor hacia afuera en la TM5 y un movimiento hacia adentro de los extremos intracelulares de TM7 respectivamente. Estas alteraciones conformacionales

crean una cavidad en la parte intracelular del receptor que permite el acoplamiento con las proteínas G heterotriméricas y la posterior señalización (Hilger, 2021; Zhou et al., 2019).

El movimiento hacia afuera de la parte intracelular de la TM6 tras la activación del receptor se ve facilitado por la flexión de la hélice (aproximadamente 35°) cerca del motivo P<sup>6.50</sup> que, para algunos receptores como los receptores de quimiocinas, va acompañado por cambios en el estado rotamérico del residuo W<sup>6.48</sup> en la TM6. Lo anterior es conocido como “*toggle switch*”, y son residuos que actúan como “interruptor” para la activación de la proteína; si los residuos cambian de conformación, entonces, cambian las propiedades del receptor. Los aminoácidos P<sup>6.50</sup> y W<sup>6.48</sup> son parte del motivo altamente conservado CWXP. (Filipek, 2019; Hilger, 2021; Olivella et al., 2013).

Después de la activación del receptor, los cambios provocados por el agonista en el sitio de unión al ligante provocan cambios rotacionales de las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos del motivo PIF (P<sup>5.50</sup>, I<sup>3.40</sup>, F<sup>6.44</sup>) cerca del sitio ortostérico de unión a ligante. En el caso del motivo NPXXY, que se encuentra localizado cerca del final extracelular de la TM7, contiene a una tirosina altamente conservada en la posición Y<sup>7.53</sup> que actúa como un “microswitch” y cuando el receptor se encuentra activado la cadena lateral de Y<sup>7.53</sup> cambia su conformación rotamérica y apunta hacia la parte central de la TM7 formando una interacción con las cadenas laterales de TM3 y TM6 (Isberg et al., 2015; Katritch et al., 2013).

Un bolsillo de sodio se encuentra entre la cadena lateral de D<sup>2.50</sup> rodeando algunos residuos de la TM3 y TM7. Se ha demostrado que el ion Na<sup>+</sup> puede actuar como un modulador alostérico negativo para la unión de agonistas al estabilizar las TM3 y TM7 en conformaciones inactivas, mientras que la activación del receptor inducido por agonistas conduce a un colapso del bolsillo de unión de sodio y la liberación del catión (Zhou et al., 2019).

### 1.3 RECEPTOR CXCR4 Y SU RELEVANCIA EN EL CÁNCER

El receptor de quimiocinas tipo 4 (CXCR4) es un receptor acoplado a proteínas G clase A (rodopsina) que contiene 352 aminoácidos (Fig. 3). CXCR4 se expresa en tejidos hematopoyéticos que regulan procesos importantes como la respuesta inmunitaria, desarrollo, hematopoyesis, renovación y regeneración de tejidos, por lo tanto, no es de sorprender que la regulación defectuosa de este receptor sea responsable de varias enfermedades inflamatorias, inmunodeficientes o de cáncer. CXCR4 está formado por una región N-terminal localizada en la parte extracelular, siete hélices transmembranales que atraviesan a la bicapa lipídica y que se encuentran unidas por asas (loops) y una región C-terminal en la parte intracelular que contiene residuos de serina y treonina, importantes para la regulación del receptor (Bockorny et al., 2020; Cancilla et al., 2020; Sokkar et al., 2021).

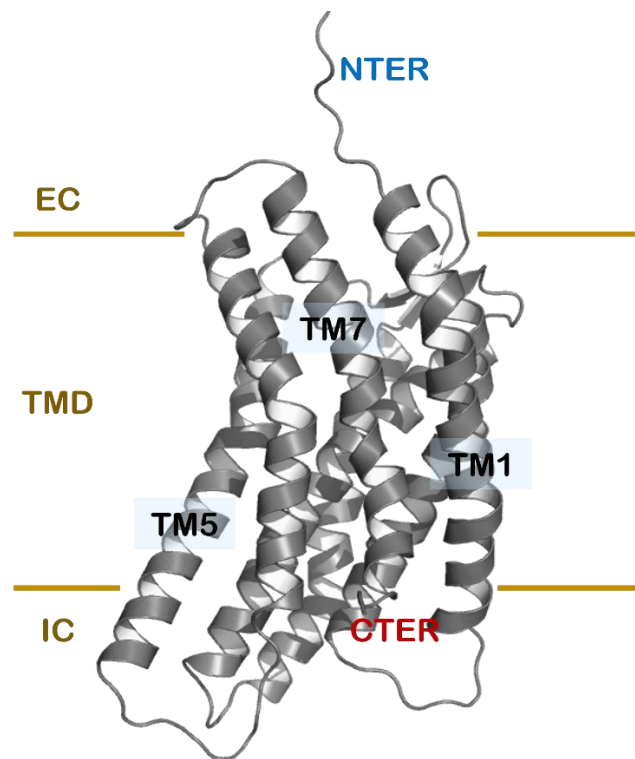


Figura 3. Estructura del receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4)

El ligante endógeno de CXCR4 es el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12), que es una quimiocina de la familia CXC con propiedades importantes dirigidas a linfocitos y monocitos. El ligante SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 (Fig. 4) está principalmente expresado en

la médula ósea, ganglios linfáticos, pulmones e hígado; tejidos donde se produce la metástasis primaria. Además, posee actividad angiogénica, regula la quimiotaxis de leucocitos y la diferenciación de células T y es esencial para el desarrollo del sistema nervioso (Huynh et al., 2020; Teixidó et al., 2018).

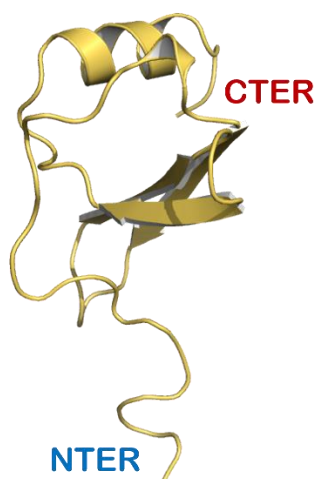


Figura 4. Estructura de la quimiocina CXCL12/SDF1- $\alpha$

La unión de SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 a CXCR4 provoca cambios conformacionales en el receptor. Uno de estos cambios es en la segunda asa intracelular (ECL2) de CXCR4, donde el motivo DRY, altamente conservado en la familia de los GPCR, está implicado en la activación de la señalización intracelular, de tal forma que el residuo de tirosina del motivo DRY, originalmente orientada hacia el interior del complejo, queda expuesta hacia el citoplasma para iniciar la señalización. Además, en la parte extracelular de CXCR4 se encuentra D97<sup>2.63</sup> en el extremo superior de la TM2 y D187ECL2 en el asa extracelular, los cuales están posicionados para unirse con SDF-1 $\alpha$ /CXCL12. Otros residuos importantes que inician la transmisión de señales se encuentran en el extremo inferior del receptor, justo en el bolsillo de unión son W94<sup>2.60</sup>, que es un motivo altamente conservado entre los receptores de quimiocinas, junto con Y45<sup>1.39</sup>, Y116<sup>3.32</sup> y E288<sup>7.39</sup> (Wescott et al., 2016).

En el receptor CXCR4 existen “*microswitches*” que controlan el acoplamiento a las proteínas G: S131<sup>3.47</sup>, Y219<sup>5.58</sup> y Y302<sup>7.53</sup>, donde Y302<sup>7.53</sup> es la última posición del motivo NPXXY que, al cambiar de conformación en el estado activo, forma un soporte estructural para la interfaz de

la proteína G. En el caso de S131<sup>3.47</sup> y Y219<sup>5.58</sup> se han reportado en estudios de rodopsinas que la interacción directa de residuos homólogos estabiliza el estado activado (Goncalves et al., 2010; Wescott et al., 2016).

La sobreexpresión del complejo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 ha sido asociada con más de 20 tipos de cáncer contribuyendo a la migración celular, angiogénesis, crecimiento y progresión tumoral metástasis y resistencia mediada por hipoxia a la quimioterapia. Investigaciones recientes sugieren que CXCR4 y su ligante SDF-1/CXCL12 modulan el microambiente inmunitario en modelos preclínicos de cáncer de páncreas, y la inhibición del complejo mejoró el acceso de las células T al microambiente tumoral (TME).

#### 1.4 MOTIXAFORTIDE

En la actualidad se han descrito e investigado antagonistas potentes y selectivos con blanco en distintos receptores acoplados a proteínas G, incluyendo a CXCR4. Motixafortide (BL-8040/BKT140) es un péptido sintético conformado por 14 aminoácidos que se une con gran afinidad (IC<sub>50</sub> 0.54-4.5 nM) a CXCR4, inhibiendo su función, pues la sobreexpresión de CXCR4 juega un papel clave en el cáncer contribuyendo al crecimiento tumoral, angiogénesis, metástasis y resistencia a las terapias. Hasta el momento no se conoce la estructura tridimensional de Motixafortide, pero sí se tiene conocimiento de su estructura primaria (Fig. 5).

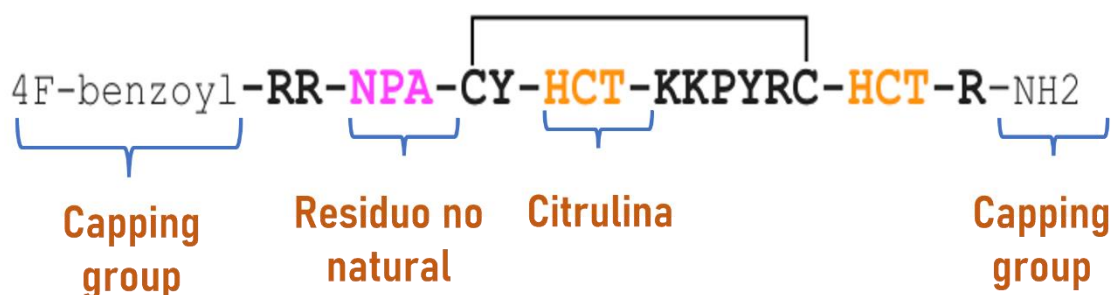


Figura 5. Estructura primaria del antagonista Motixafortide (BL-8040/BKT140)

Motixafortide tiene como particularidades un *capping group* sintético en el extremo amino-terminal llamado grupo 4F-benzoilo, un *capping group* NH<sub>2</sub> en el extremo carbonilo, aminoácidos no esenciales como la citrulina (HCT) y un aminoácido derivado de naftaleno llamado NPA. Las características antes mencionadas pueden hacer de Motixafortide un buen antagonista del receptor CXCR4, pues su eficacia ha sido documentada en estudios clínicos de mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide y adenocarcinoma pancreático, donde el CXCR4 bloqueado promovió la movilización de células T, B y NK (natural killer) (Bockorny et al., 2020; Crees et al., 2021).

En el mercado farmacológico existen diversos inhibidores del receptor CXCR4 además de Motixafortide. En el caso de Plerixafor/Mozobil/AMD3100, que fue el primer antagonista de CXCR4 aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), su aplicación a tumores sólidos es limitada por su baja farmacocinética y los efectos tóxicos (fibrosis pulmonar y renal) generados después de una prolongada administración. En el caso de BPRCX, es un antagonista diseñado experimentalmente y ha sido probado en modelos de cáncer de hígado, no obstante, sigue en vías de desarrollo (Domanska et al., 2012; Oum et al., 2020; Song et al., 2021).

En comparación con los inhibidores antes mencionados, Motixafortide demostró mayor afinidad y estadía del receptor CXCR4 (mayor a 48 horas), proveyendo un mejor efecto en el equilibrio de retención-movilización de las células madre de la médula ósea en estudios con ratones, además ha sido probado en distintos tipos de cáncer en humanos ampliando los beneficios de la quimioterapia y actualmente se encuentra en las Fases II y III en Estudios clínicos para su posterior aprobación por la FDA (BioLineRx, 2022b; Bockorny et al., 2020).

#### 1.4.1 Estudios clínicos de Motixafortide

Motixafortide (BL-8040/BKT140) se ha utilizado para el tratamiento de distintos tipos de cáncer bloqueando al receptor CXCR4 y ampliando los beneficios de la quimioterapia. A continuación, en la Tabla 2 se describen los estudios clínicos en donde se ha implementado:

Tabla 2. Estudios clínicos de Motixafortide

Tipo de cáncer	Intervención/tratamiento	Fase clínica
Mieloma múltiple	1.25 mg/Kg de BL-8040 + G-CSF G-CFS + placebo	III
Adenocarcinoma pancreático	1.25 mg/Kg de BL-8040 + Pembrolizumab + quimioterapia con ONYVIDE	II
Leucemia mieloide aguda	BL-8040 + quimioterapia con Ara-C (1.5-3 g/m <sup>2</sup> /d)	II
Leucemia linfoblástica aguda	BL-8040 + Neralabina	II

En el caso de Mieloma Múltiple (MM), que se encuentra en fase III del estudio clínico, se utilizaron 207 pacientes en quienes se emplearon dos combinaciones de forma aleatoria: la primera de Motixafortide (BL-8040/BKT140) con G-CSF (fármaco estimulador de glóbulos blancos) y la segunda de G-CSF con placebo. Los resultados obtenidos en ambos casos fueron comparados para determinar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de Motixafortide (BioLineRx, 2022a).

Para el Adenocarcinoma Pancreático Metastásico se evaluó en 40 pacientes en etapa terminal la eficacia y seguridad de Motixafortide (BL-8040/BKT140) en combinación con Pembrolizumab (agente anticancerígeno) y quimioterapia con el medicamento liposomal ONYVIDE (irinotecán). La terapia combinada continuará durante 2 años y posteriormente se evaluará el estado de salud de los participantes (BioLineRx, 2022c).

En el caso de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) el objetivo del estudio clínico fue investigar si Motixafortide (BL-8040/BKT140) en combinación con el medicamento antineoplásico Ara-C (citarabina) puede controlar la enfermedad en 42 pacientes con LMA que no respondieron a tratamientos convencionales. Por último, para la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en adultos, se utilizó una combinación de Motixafortide (BL-8040/BKT140) y el antineoplásico Neralabina con la finalidad de crear una terapia que permita la mejoría de los pacientes y un

posible trasplante de células hematopoyéticas (BioLineRx, 2016; Washington University School of Medicine, 2022).

## 1.5 SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR

La dinámica molecular es un tipo de simulación computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema ya sea físico, químico o biológico a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante ecuaciones de movimiento de Newton. Uno de sus usos más frecuentes es en sistemas biológicos, ya que permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus receptores, incluyendo la identificación de sitios de unión y las interacciones moleculares asociadas (Lozano-Aponte & Scior, 2014).

La estructura tridimensional de las proteínas y sus complejos proveen información valiosa, no solo para entender los fundamentos moleculares del cuerpo humano, sino también para investigar y diseñar nuevos medicamentos para tratar distintas enfermedades como el cáncer. Sin embargo, obtener una estructura proteica de alta resolución de manera experimental es costoso y consume mucho tiempo. Es por ello que las simulaciones de dinámica molecular son una opción viable pues han ampliado el alcance de la química y otros campos al proporcionar una resolución espacial y temporal que no está disponible por medio de experimentación (Durrant & McCammon, 2011; Geng et al., 2019).

### 1.5.1 Fundamentos teóricos

Las simulaciones de dinámica molecular pueden predecir cómo cada átomo en una proteína se moverá en el tiempo, basado en el modelo general de interacción interatómicas físicas. Estas simulaciones pueden capturar una amplia variedad de procesos biomoleculares importantes, incluyendo cambios conformacionales, unión de ligantes, plegamiento de proteínas. La técnica de dinámica molecular, en general, consta de tres pasos importantes (Hollingsworth & Dror, 2018):

### Paso 1: Construcción del estado inicial

Se establece o se elige la configuración inicial del sistema de N átomos a utilizar. Además, se asignan los parámetros de la simulación que consisten en todas las posiciones y velocidades iniciales, necesarios para realizar el cálculo con Dinámica Molecular. Mediante esquemas de simulación se lleva el sistema al equilibrio y se pueden definir constantes de temperatura, presión y/o energía.

### Paso 2: Simulación de dinámica molecular

Se define el tiempo de ejecución (número de pasos) e inicia la simulación de dinámica molecular. Dentro de la simulación se calculan las fuerzas de cada átomo mediante la resolución de las ecuaciones de Newton asociadas al movimiento como función del tiempo, En este paso se registran las trayectorias obtenidas y se obtienen las propiedades fisicoquímicas de interés.

### Paso 3: Análisis de resultados

Se procesa la información obtenida de la simulación de dinámica molecular (RMSD, radio de giro, interacciones importantes) e incluso se puede analizar el comportamiento del sistema por medio de animaciones.

## 1.5.2 Campos de Fuerza

Los campos de fuerza son una colección de expresiones matemáticas y constantes asociadas, diseñadas para reproducir la geometría molecular y propiedades selectivas de estructuras probadas. Consiste en una forma analítica a la forma de la función y los parámetros utilizados para calcular la energía potencial de un sistema de átomos mediante dinámica molecular (ec. 1).

Los campos de fuerza son potenciales interatómicos (González, 2011).

$$U = \sum_{\text{enlace}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsión}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)]$$
$$+ \sum_{\text{impropio}} V_{\text{imp}} + \sum_{LJ} 4\epsilon_{ij} \left( \frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{\text{elec}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (1)$$

Los resultados de una simulación de dinámica molecular sólo pueden ser buenos si se elige correctamente el campo de fuerza. Estos expresan cómo los átomos se estiran, vibran, rotan y giran alrededor de los enlaces en respuesta a fuerzas intramoleculares e intermoleculares. Los campos de fuerza frecuentemente utilizados en simulaciones de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) son CHARMM, AMBER, GROMOS, OPLS y COMPASS, siendo CHARMM en su versión 36 (C36) el mejor parametrizado para proteínas (González, 2011; Huang et al., 2016).

### 1.5.3 Aplicaciones en sistemas biológicos

#### - Simulación de dinámica molecular de Doxorubicin

Los sistemas de liberación de fármacos basados en nanotecnología han logrado mejorar los métodos farmacéuticos pues su tamaño permite a travesar las barreras biológicas, entregar los medicamentos y aumentar la durabilidad de estos en el torrente sanguíneo sin causar efectos secundarios. En esta simulación se utilizó el medicamento anticancerígeno Doxorubicin (DOX) para determinar su carga con el portador termosensible de nanotubos (CNT) de N-isopropilacrilamida de carbono (NIP). Se realizaron tres simulaciones de 30 ns con 5 moléculas de DOX, 1 molécula de CNT y 15 pentámeros, 8 decámeros y 5 pentadecámeros de NIP respectivamente (Maleki et al., 2020).

Se utilizó el campo de fuerza OPLSAA, el modelo de agua TIP3P y el programa Gromacs. Los parámetros utilizados para determinar la mejor de carga de DOX fueron el radio de giro, el número de puentes de hidrógeno polímero-polímero y polímero-DOX, y las energías de interacción. Después de la simulación se concluyó que al utilizar pentámeros de NIP se redujo el radio de giro, lo que indica que es el polímero más comprimido y estable. Además, se determinó que los pentámeros formaron más puentes de hidrógeno con el agua, lo que sugiere una alta hidrofilia que permitirá una mejor distribución de los polímeros en agua. En este contexto, los pentámero de NIP compuestos con CNT son los mejores portadores de DOX (Maleki et al., 2020).

#### - Simulación de dinámica molecular del gen humano STK11

La serina-treonina quinasa 11 (STK11) es un gen supresor de tumores que juega un papel clave en la regulación del crecimiento celular y la apoptosis. Las mutaciones de aminoácidos individuales en regiones altamente conservadas en STK11 están asociadas con el síndrome Peutz-Jeghers, que es un trastorno hereditario autosómico y dominante. El objetivo de esta simulación de dinámica molecular fue entender la función del gen STK11 (Islam et al., 2019).

Se realizó una simulación de 150 ns a 310 K, una concentración de 0.9% de NaCl y un paso de 2.5 fs para estudiar la desviación de las proteínas nativas (STK11) y mutantes (W239R, W308C) en ambientes fisiológicos. Se evaluó el RMSD, radio de giro, puentes de hidrógeno y la estructura secundaria utilizando el campo de fuerza AMBER14. Los resultados mostraron desviaciones en regiones importantes de las estructuras mutadas en comparación con la estructura nativa. Estas desviaciones pueden interrumpir la confirmación de la estructura secundaria, y por lo tanto, la estabilidad de la proteína puede verse alterada (Islam et al., 2019).

## **HIPÓTESIS**

A través de métodos computacionales, específicamente simulaciones atomísticas de dinámica molecular, se puede caracterizar el mecanismo de interacción del ligante antagonista Motixafortide (BL-8040) y el receptor CXCR4. Motixafortide puede proveer la inhibición de la vía de señalización CXCR4/SDF-1, promoviendo cambios en el microambiente tumoral (TME) que puedan facilitar la inmunoterapia.

## **OBJETIVOS**

### *General*

Caracterizar a través de simulaciones de dinámica molecular el complejo Motixafortide/CXCR4 en un medio fisiológico.

### *Particulares*

- Construir la estructura terciaria de Motixafortide.
- Construir las estructuras de los complejos Motixafortide/CXCR4 y SDF-1 $\alpha$ /CXCR4.
- Analizar con dinámica molecular los complejos Motixafortide/CXCR4 y CXCR4/SDF-1 $\alpha$ /CXCR4.
- Comparar los resultados de los complejos Motixafortide/CXCR4 y SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 y determinar las diferencias conformacionales en el receptor debidas a la presencia del ligante agonista y ligante antagonista.
- Identificar las interacciones mas importantes del receptor y el antagonista.

**Capítulo II**  
*METODOLOGÍA*

La estructura tridimensional del receptor CXCR4 unido tanto a su ligante endógeno SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 como al antagonista Motixafortide son aún desconocidas. Con la idea de obtener información detallada a nivel molecular de los complejos Motixafortide/CXCR4 y SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, y en ausencia de información experimental, se recurrirá a modelado computacional y a simulaciones atómicas de dinámica molecular. A través de los resultados de ambos complejos se determinará si las interacciones establecidas entre Motixafortide/CXCR4 hacen de este antagonista una alternativa para tratar la enfermedad del cáncer. De manera paralela, se investigarán los detalles de la interacción entre SDF-1 $\alpha$ /CXCR4. La metodología utilizada en este trabajo se muestra en la Figura 6.

Debido a la importancia de CXCR4 en procesos fisiológicos y patológicos se han determinado algunas estructuras del receptor en complejo con diferentes ligantes antagonistas como la quimiocina viral vMIP-II y el péptido cíclico CXV15. Dada la similitud de dichos ligantes con los ligantes de nuestro interés, se utilizará su información tridimensional durante la construcción de las conformaciones iniciales de los complejos SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 y Motixafortide/CXCR4 (Wu et al., 2010).

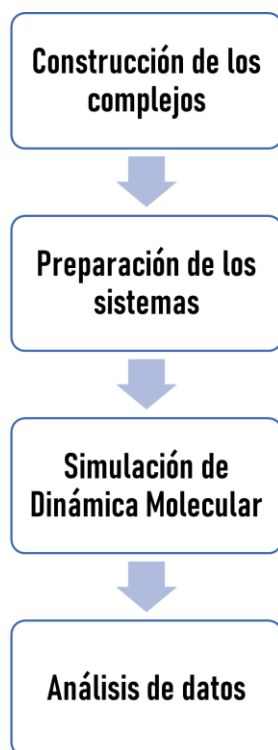


Figura 6. Metodología utilizada para las Simulaciones de Dinámica Molecular

## 2.1 CONSTRUCCIÓN DEL COMPLEJO SDF-1 $\alpha$ /CXCR4

Con la finalidad de obtener una conformación inicial del complejo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 se utilizó la estructura depositada en la base de datos PDB con el código de acceso 4RWS que contiene la estructura de rayos X del receptor humano CXCR4 enlazado a una quimiocina viral denominada vMIP-II (importante para el VIH). Por su parte, la estructura del ligante SDF-1 $\alpha$  fue obtenida en la misma base de datos con el código de acceso 1SDF.

Para unir a las estructuras 4RWS y 1SDF se realizó un alineamiento estructural de todos los átomos utilizando el programa PyMOL en donde la estructura de SDF1- $\alpha$  se traslapó con la estructura del ligante vMIP-II en el contexto del receptor CXCR4. La estructura inicial se observa en la Figura 7:

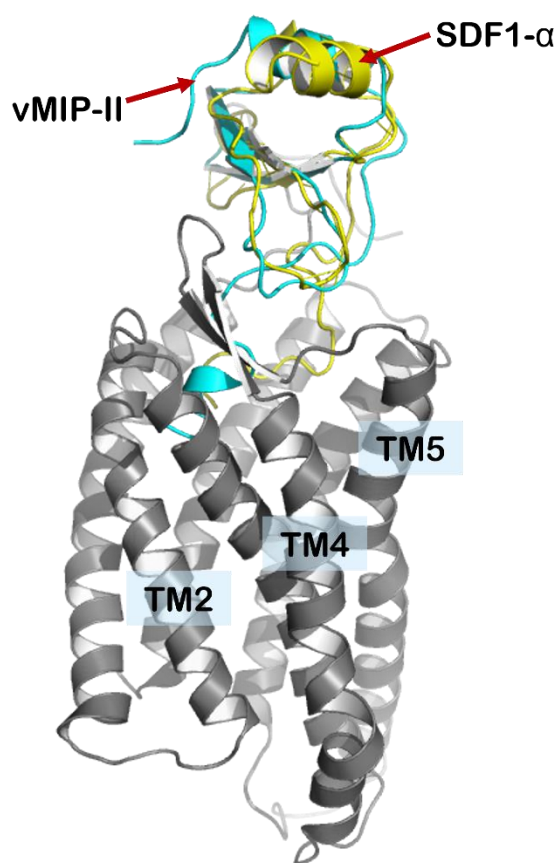


Figura 7. Conformación inicial del complejo SDF1- $\alpha$ /CXCR4



*Dynamics*) se construyeron los aminoácidos sintéticos y no esenciales de Motixafortide. La estructura inicial del complejo Motixafortide/CXCR4 se observa en la Figura 9.

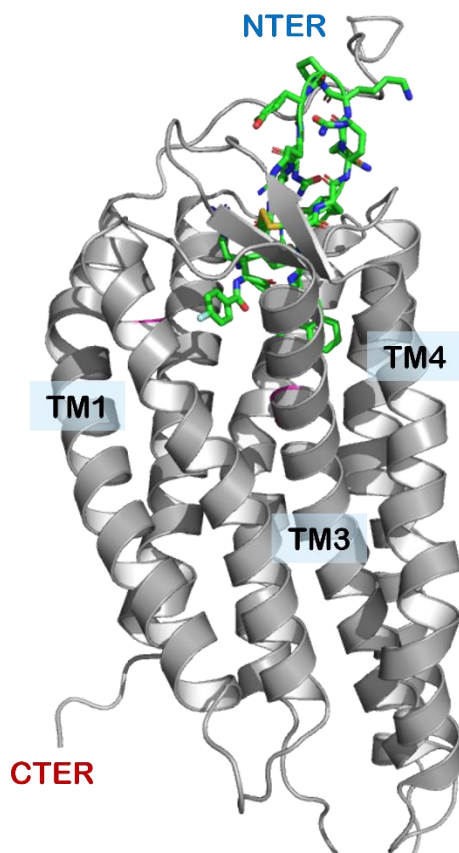


Figura 9. Conformación inicial del complejo Motixafortide/CXCR4

### 2.3 PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS

Para llevar a cabo la preparación de los sistemas se utilizó el software VMD (*Visual Molecular Dynamics*) con el objetivo de generar los archivos denominados PSF (protein structure file) y PDB, los cuales contienen la conectividad y las coordenadas del sistema, respectivamente. Ambos archivos son indispensables para poder realizar las simulaciones de dinámica molecular. Los pasos detallados se describen a continuación:

- I. Se incorporó en los complejos SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 y Motixafortide/CXCR4 una bicapa lipídica de 1-palmitol-2-oleoil-sn-glicero-fosfatidilcolina (POPC) con el fin de simular la membrana celular.
- II. Se removieron las moléculas de lípido que se traslapan con la estructura del complejo proteico.
- III. Ambos sistemas fueron solvatados utilizando el modelo de agua TIP3 y se diseñó una caja de agua con medidas de 16 x 16 Å.
- IV. Los sistemas fueron ionizados añadiendo solución salina (NaCl) a una concentración de 0.15 M para simular la concentración salina del medio fisiológico.
- V. Se establecieron restricciones en los átomos pesados para delimitar su movimiento con la idea de realizar el proceso denominado pre-dinámica.

En la preparación de los sistemas se utilizó el campo de fuerza CHARMM36 para todos los componentes del sistema, incluyendo proteína, ligante, lípidos, agua y iones. Los parámetros del campo de fuerza proveen información sobre el tipo de átomo, la masa atómica y carga parcial de cada átomo en cada uno de los elementos que componen al sistema molecular. La Figura 10 muestra el sistema Motixafortide/CXCR4 después de añadir los pasos descritos anteriormente; el sistema cuenta con aproximadamente 80 mil átomos. Ambos sistemas (Motixafortide/CXCR4 y SDF1- $\alpha$ ) fueron investigados utilizando la infraestructura computacional del Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

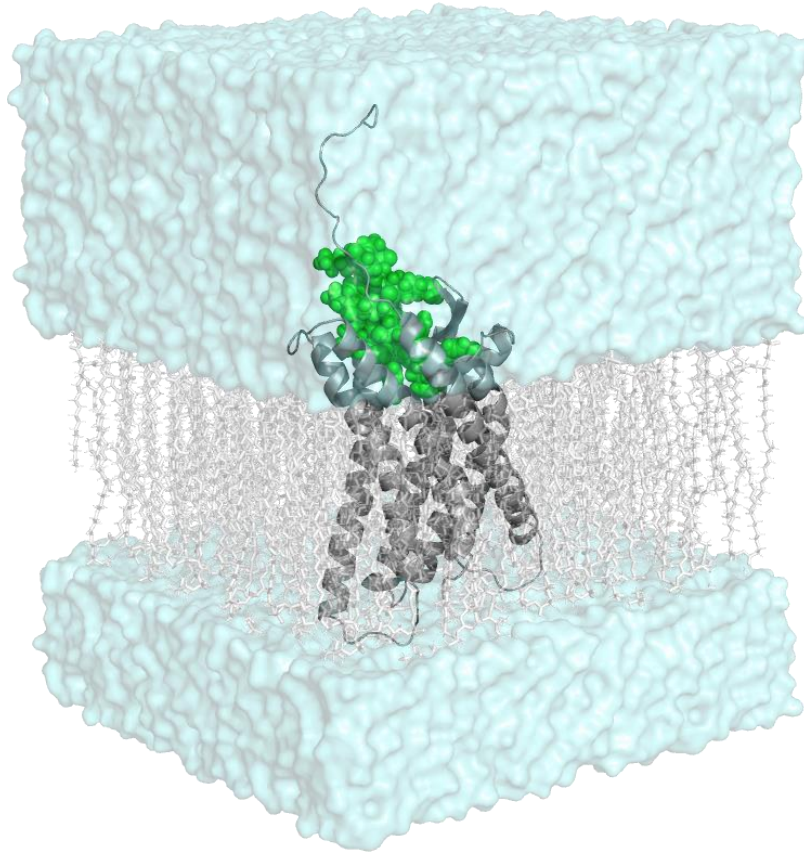


Figura 10. Sistema Motixafortide/CXCR4

## 2.4 PRE-DINÁMICA MOLECULAR

Se llevaron a cabo seis fases preliminares para la preparación de los sistemas Motixafortide/CXCR4 y SDF1- $\alpha$ /CXCR4 utilizando el programa NAMD. Los pasos se describen a continuación:

Paso 1. Los sistemas fueron minimizados en 10,000 pasos para evitar posibles choques, utilizando el algoritmo de gradiente conjugado. Posteriormente se realizaron 100,000 pasos de dinámica molecular con un paso de tiempo de 0.5 fs en el ensamble NVT. Las posiciones de los átomos en los sistemas se mantuvieron fijas a excepción de las colas de los lípidos y los átomos de la cadena principal de la proteína.

Paso 2: Se realizó una minimización de los sistemas en 20,000 pasos con un paso de tiempo de 0.5 fs. A la minimización le siguieron 250,000 pasos de Dinámica Molecular en los que se

fijaron los átomos de la proteína y se aplicaron restricciones (potencial armónico con una fuerza constante de  $1 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$ ) en los átomos de los lípidos fijados en el Paso 1. Además, se aplicaron fuerzas externas a las moléculas de agua para evitar que penetren al interior de la membrana lipídica.

Paso 3: Se llevan a cabo 250,000 pasos de Dinámica Molecular con fuertes restricciones (potencial armónico con una fuerza constante de  $1 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$ ) en los átomos pesados de la proteína utilizando un paso de tiempo de 1 fs. Se aplican fuerzas externas a las moléculas de agua para evitar que entren en la membrana lipídica.

Paso 4: Se llevan a cabo 250,000 pasos de Dinámica Molecular con fuertes restricciones (potencial armónico con una fuerza constante de  $1 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$ ) en los átomos pesados de la proteína utilizando un paso de tiempo de 2 fs en el ensamble NTP.

Paso 5: Se llevan a cabo 250,000 pasos de Dinámica Molecular con restricciones moderadas (potencial armónico con una fuerza constante de  $1 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$ ) en los átomos pesados de la proteína utilizando un paso de tiempo de 2 fs en el ensamble NTP.

Paso 6: Se llevan a cabo 250,000 pasos de Dinámica Molecular con restricciones leves (potencial armónico con una fuerza constante de  $1 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$ ) en los átomos pesados de la proteína utilizando un paso de tiempo de 2 fs en el ensamble NTP.

## 2.5 DINÁMICA MOLECULAR DE LOS SISTEMAS

El programa utilizado para realizar las simulaciones de los complejos SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 y Motixafortide/CXCR4 fue NAMD. En el contexto de las simulaciones de Dinámica Molecular se debe definir la función del potencial y la descripción de los términos que lo componen que definirá la manera en que las partículas interactuarán durante la simulación, por ello, se utilizaron los parámetros del campo de fuerza CHARMM36, los cuales se ha observado que describen adecuadamente a los sistemas biomoleculares aunado a que trabajan de manera eficiente con NAMD. Las condiciones a las que fueron sometidas los sistemas fueron 310.15 K y 1 atm de presión para simular un ambiente fisiológico. Las interacciones electrostáticas se evaluaron utilizando las técnicas de PME con un espaciado de  $<1 \text{ Å}$  en cada dimensión y una

interpolación de cuarto orden. Las longitudes de enlace que involucran a los átomos de hidrógeno se restringieron a sus valores de equilibrio mediante el algoritmo SHAKE.

Todas las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con un tamaño de paso de 2 fs y por un total de 500,000,000 pasos, lo que equivale a un tiempo de simulación para cada complejo de 1000 ns (1.0  $\mu$ s) (Fig. 11). Las simulaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP), en la supercomputadora Cuetlaxcoapan y Cholollan.

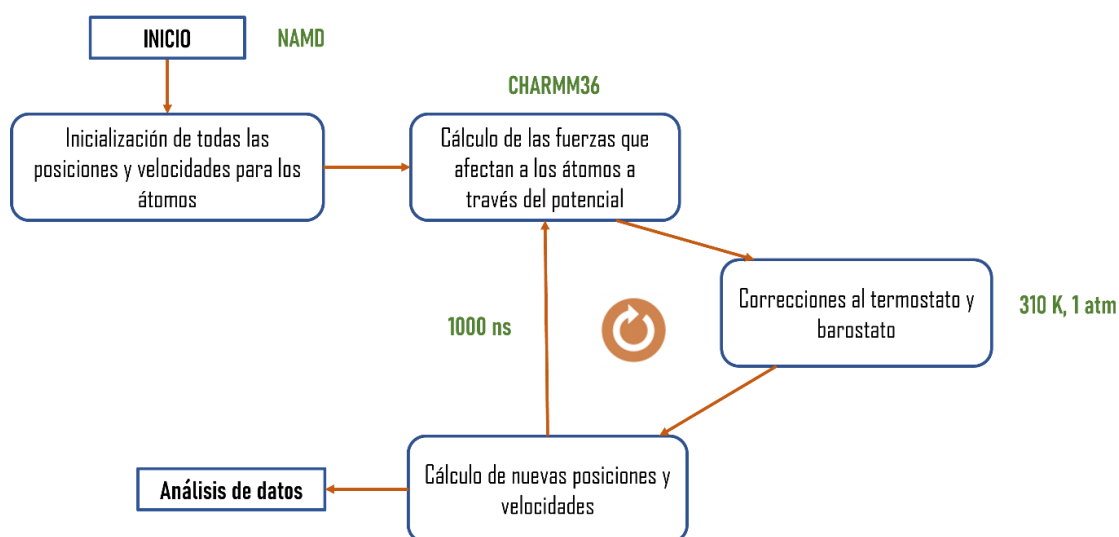


Figura 11. Pasos de la Simulación de dinámica molecular

## 2.6 ANÁLISIS DE DATOS

Se analizaron las trayectorias de cada átomo del sistema a lo largo del tiempo de simulación (1000 ns) utilizando parámetros estructurales que incluyeron a la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD) con la finalidad de identificar cambios estructurales e interacciones estables en el sistema. Posteriormente se comparó la estructura tridimensional inicial de cada complejo con las estructuras obtenidas durante la Simulación de Dinámica Molecular.

**Capítulo III**  
*RESULTADOS*

Para investigar las interacciones importantes del antagonista Motixafortide y sus implicaciones en el cáncer, se construyó su complejo con el receptor humano de quimiocinas CXCR4, el cual fue analizado mediante la técnica computacional de simulaciones de dinámica molecular. Con el fin de contextualizar los resultados obtenidos, también se generó e investigó el complejo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 (SDF-1 $\alpha$  es el ligante endógeno de CXCR4). Dado que ambas simulaciones de dinámica molecular comenzaron a partir de la misma estructura de CXCR4, los cambios conformacionales en el receptor deberían ser consecuencia de la presencia de los ligantes. Con esto en mente, primeramente, se evaluó la confiabilidad de la caracterización computacional analizando los cambios conformacionales del receptor provocados por la presencia del ligante agonista (SDF-1 $\alpha$ ) y el antagonista (Motixafortide). Los resultados de la investigación muestran cambios específicos en diversos motivos estructurales altamente conservados que se han asociado con la activación de los GPCR. Mas aún, los resultados sugirieron que las interacciones carga-carga contribuyen fuertemente a la formación del complejo Motixafortide/CXCR4 y que los grupos sintéticos son relevantes para determinar su actividad como ligante antagonista. Los resultados se describen a continuación:

### 3.1 RMSD DEL COMPLEJO MOTIXAFOTIDE/CXCR4

A través del estudio de la desviación media cuadrática (RMSD) aplicado a proteínas y ligantes, se pudo encontrar la estabilidad del complejo en las simulaciones de dinámica molecular. En la Figura 12.A se puede observar una conformación representativa del complejo Motixafortide/CXCR4 después de 1000 ns de simulación. El análisis de los valores de RMSD (*root mean square deviation*) indican que aproximadamente a los 500 ns de simulación y a un valor de 2 Å, el receptor CXCR4 llegó a un equilibrio estructural. Las fluctuaciones que se notan en la Figura 12.B indican la naturaleza dinámica del sistema ya que la simulación se realizó en un ambiente fisiológico.

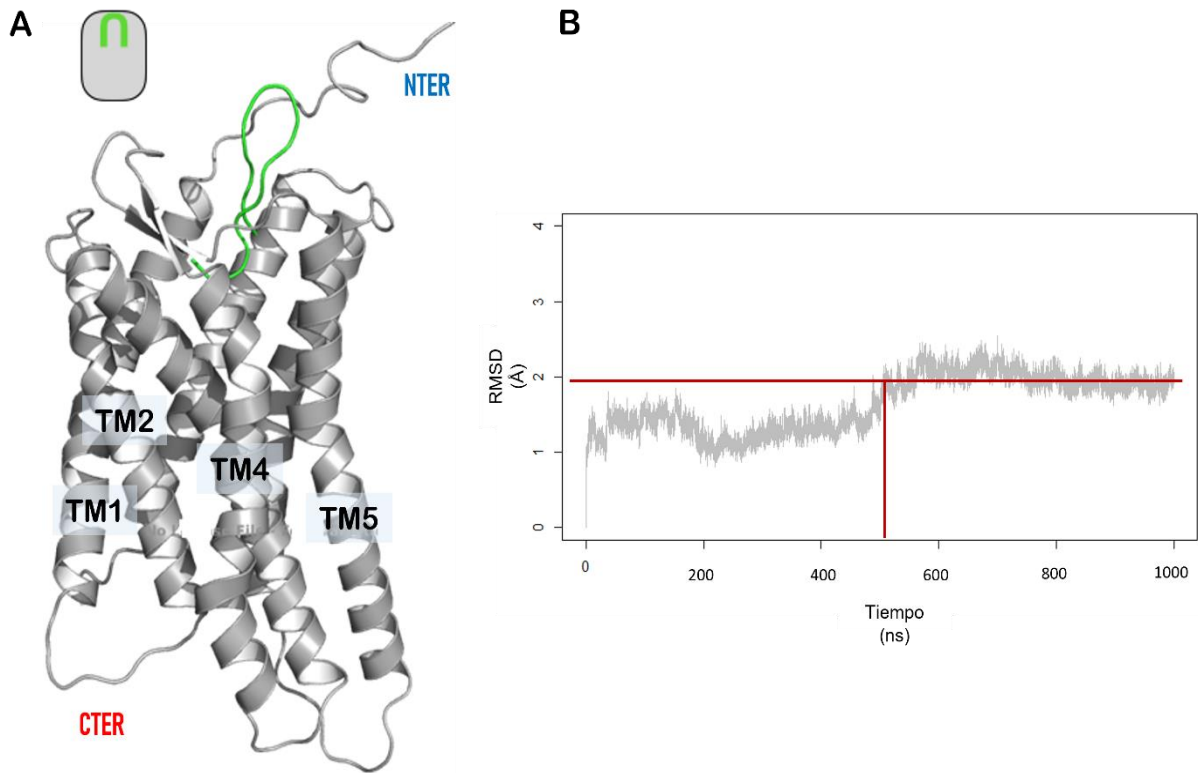


Figura 12. Conformación más estable del complejo Motixafortide/CXCR4

## 3.2 MOTIVOS CONSERVADOS

### 3.2.1 Motivo PIF

El motivo estructural altamente conservado denominado PIF está formado en el receptor humano CXCR4 por los residuos hidrofóbicos P211<sup>5,50</sup>, V124<sup>3,40</sup> y F248<sup>6,44</sup>. Durante la activación del receptor GPCR causada por la presencia de un ligante agonista (SDF-1 $\alpha$ /CXCR4), existe un reagrupamiento de PIF que contribuye al característico movimiento hacia afuera del segmento intracelular TM6, y también contribuye al movimiento hacia dentro de la TM7. El análisis de las conformaciones adoptadas por el residuo F248<sup>6,44</sup> (PIF) en los complejos Motixafortide/CXCR4 y SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 indican un comportamiento diferente en la cadena lateral de dicho residuo (Fig.13).

Durante la simulación, en el complejo SDF1- $\alpha$ /CXCR4, se produjo un cambio en la orientación del residuo F248<sup>6.44</sup> hacia la hélice TM5, mientras que en el sistema unido a Motixafortide, la cadena lateral aromática oscila alrededor de la posición inicial; la posición inicial corresponde a la posición del receptor CXCR4 en su estado inactivo. En la figura 13 se observa las conformaciones adoptadas por la cadena lateral del residuo F248<sup>6.44</sup> durante los últimos 200 ns de simulación en ambos complejos. Las conformaciones están representadas por el carbono CZ, el cual es el carbono localizado en la posición más externa respecto a la posición del anillo. En particular, las conformaciones exploradas en el sistema SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 están asociadas a estructuras activas del receptor, mientras que las exploradas en el sistema Motixafortide/CXCR4 están vinculadas a conformaciones inactivas del receptor.

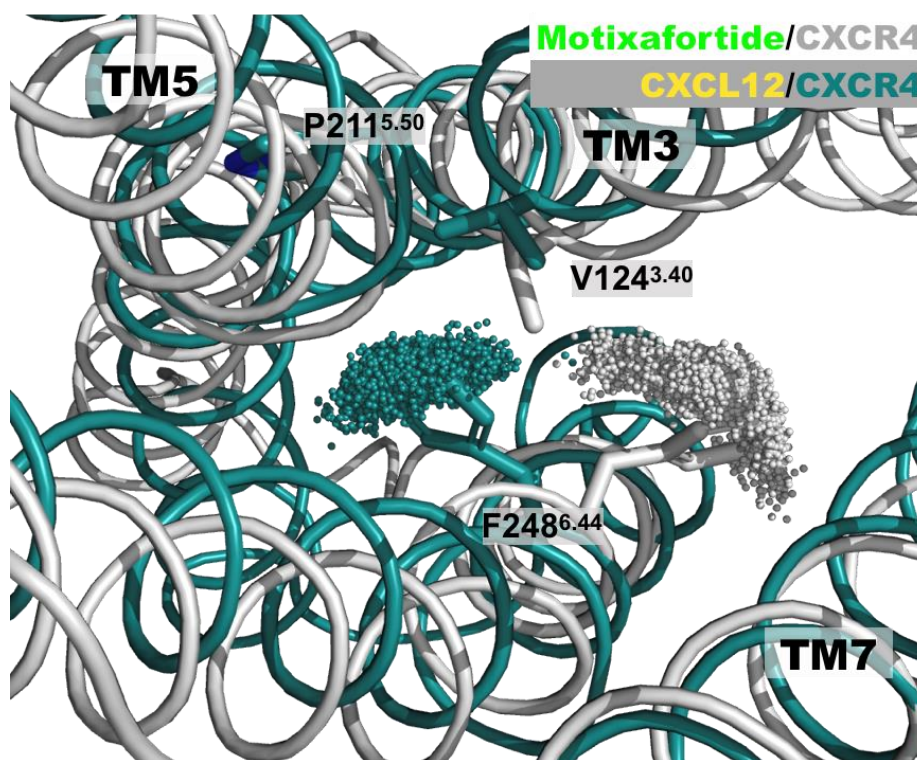


Figura 13. Cambio conformacional del residuo F248<sup>6.44</sup> en ambos complejos (Rebolledo-Bustillo et al., 2023)

### 3.2.2 Motivo NPXXY

El motivo NPXXY (N298<sup>7.49</sup>, P299<sup>7.50</sup> y Y302<sup>7.53</sup>) se encuentra altamente conservado en los receptores acoplados a proteínas G y juega un rol fundamental en su activación. Se ha propuesto que durante la activación del GPCR, el residuo Y302<sup>7.53</sup>, perteneciente a NPXXY, permite interacciones inter helicoidales que facilitan el característico movimiento hacia afuera de la parte intracelular de la hélice TM6. A través de las simulaciones de dinámica molecular se observó que el residuo Y302<sup>7.53</sup> muestra diferentes conformaciones en los complejos SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 y Motixafortide/CXCR4 (Fig. 14).

En la Figura 14 se observa que, en el complejo Motixafortide/CXCR4, el residuo Y302<sup>7.53</sup> apunta su cadena lateral hacia la región intracelular donde forma interacciones polares con la cadena lateral del residuo D74<sup>2.40</sup>. En contraste, la cadena lateral de Y302<sup>7.53</sup> en el sistema SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 apunta hacia el centro del resto de las hélices, particularmente hacia la hélice TM3. La conformación de Y302<sup>7.53</sup> en el sistema agonista es estabilizada por una interacción pi-cación con el residuo R77<sup>2.43</sup> (línea morada en la figura 14).

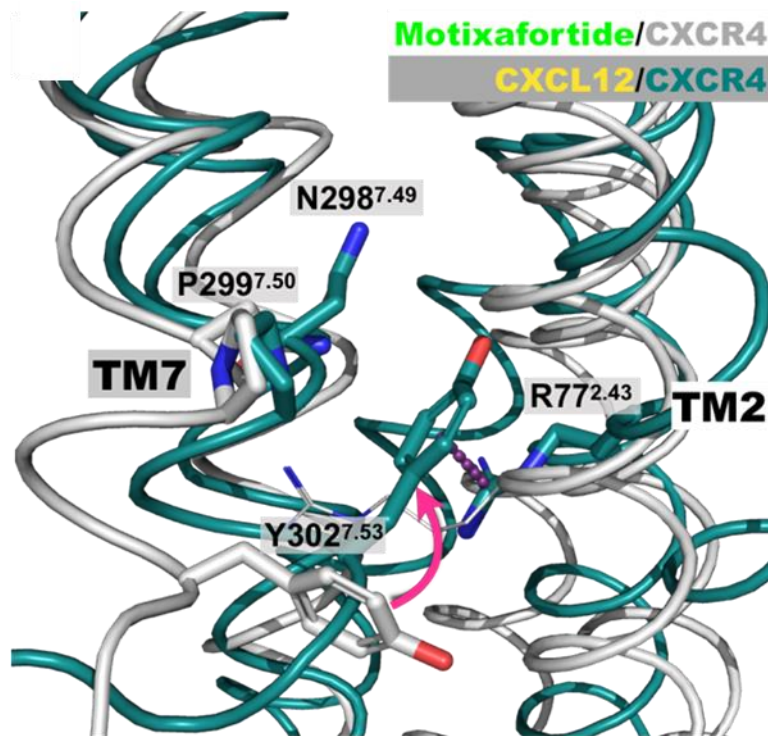


Figura 14. Cambio conformacional del residuo Y302<sup>7.53</sup> en ambos complejos

### 3.2.3 Motivo W252<sup>6,48</sup> “*Toggle switch*”

Una característica distintiva en la activación de los GPCR es el cambio conformacional que involucra un movimiento rotacional de la TM6, y que da como resultado una separación de la transmembrana relativo al resto de las hélices por aproximadamente 10 Å. Este cambio conformacional es necesario para el acoplamiento de la respectiva proteína G y es iniciado por un estímulo intracelular, que en el caso de CXCR4, es debido a la unión de la quimiocina SDF-1 $\alpha$  (ligante endógeno).

Los cambios conformacionales que ocurrieron en la parte intracelular de CXCR4 se encuentran fuertemente acoplados a los cambios rotacionales del residuo W252<sup>6,48</sup>. Este residuo aromático se conoce como “*Toggle switch*” y está muy relacionado con la activación de los GPCRs. El residuo W252<sup>6,48</sup>, en conjunto con el residuo P<sup>6,50</sup>, forma parte del motivo altamente conservado denominado CWXP. El análisis de los estados rotaméricos de W252<sup>6,48</sup>, particularmente el ángulo diedro formado por los átomos N-CA-CB-CG, muestra un comportamiento diferente entre el ligante agonista y antagonista. En la Figura 15 se observa que los valores explorados en el complejo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 presentan una distribución bimodal, que asociamos a un comportamiento más diverso y dinámico que el observado en el complejo Motixafortide/CXCR4. Cabe resaltar que los cambios conformacionales del “*Toggle switch*” se han asociado con la presencia de un ligante agonista.

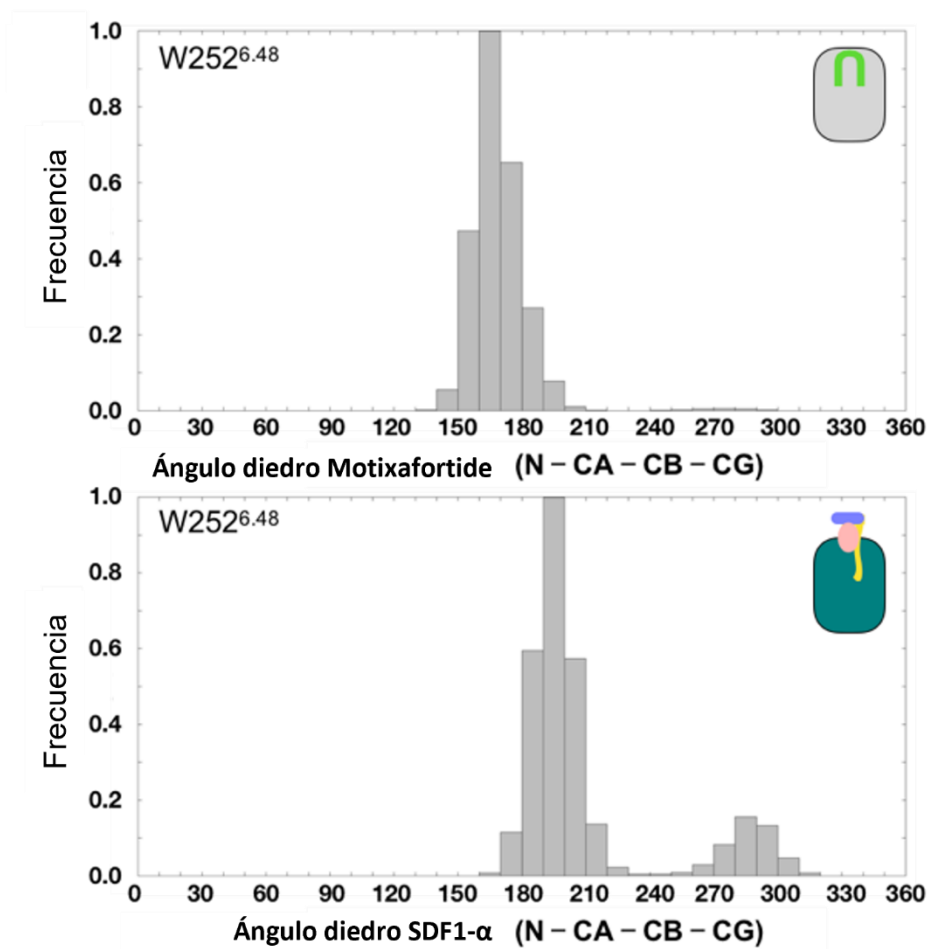


Figura 15. Ángulos diedros “Toggle switch” de ambos complejos

Dado que las simulaciones de dinámica molecular pudieron identificar correctamente las diferencias conformacionales asociadas a los sistemas de CXCR4 (agonista y antagonista), se prosiguió a caracterizar a nivel molecular las interacciones que estabilizan a Motixafortide en el sitio de unión ortostérico de CXCR4.

### 3.3 INTERACCIONES CARGA-CARGA EN EL COMPLEJO MOTIXAFORITDE/CXCR4

Motixafortide es un péptido sintético que contiene 14 residuos donde seis de ellos son de tipo catiónicos, 4 argininas y 2 lisinas (R1, R2, K7, K8, R11 y R14). A lo largo de las simulaciones

de dinámica molecular, se observó que estos residuos están involucrados en interacciones de tipo carga-carga con residuos en el receptor cargados negativamente (aspartatos y glutamatos), mismas que se sugiere sean una de las causas principales de la gran afinidad de Motixafortide por el receptor CXCR4. En la Tabla 3 y Figura 15, se muestran las interacciones importantes:

Tabla 3. Interacciones polares importantes del complejo Motixafortide/CXCR4

CXCR4	MOTIXAFORTIDE	TIPO
D187	R1	Carga-Carga
D171	R2	Carga-Carga
D187	R11	Carga-Carga
E277	R14	Carga-Carga
D193	K7	Carga-Carga
D22	K8	Carga-Carga
W94	R1	Pi-catión
T117	R2	Polar

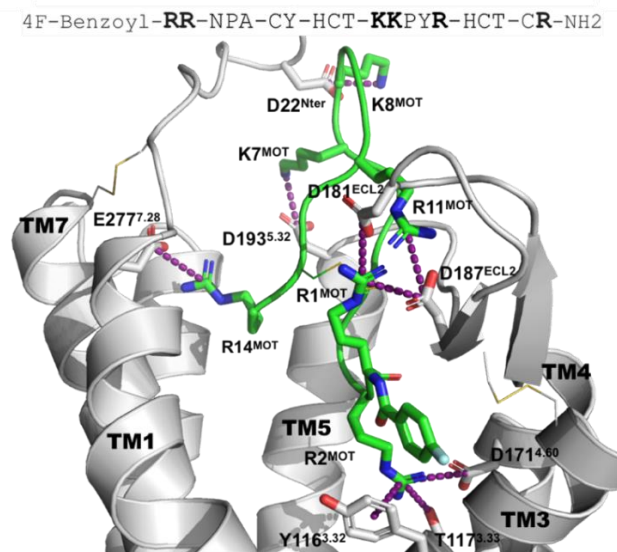


Figura 16. Interacciones carga-carga del complejo Motixafortide/CXCR4

La arginina R2<sup>MOT</sup> se encuentra insertada profundamente en el sitio de unión al ligante (Fig. 16), donde forma interacciones carga-carga con el residuo D171<sup>4.60</sup> que se mantienen estables a lo largo de los 1000 ns de simulación (Fig. 17). Además de formar la interacción carga-carga, R2<sup>MOT</sup> forma una interacción de tipo polar con el residuo T117<sup>3.33</sup> y otra de tipo Pi-cación con el residuo Y116<sup>3.32</sup>, ambos localizados en la hélice TM3; es importante notar que Y116<sup>3.32</sup> juega un papel importante en la activación de los GPCRs (Chang et al., 2020).

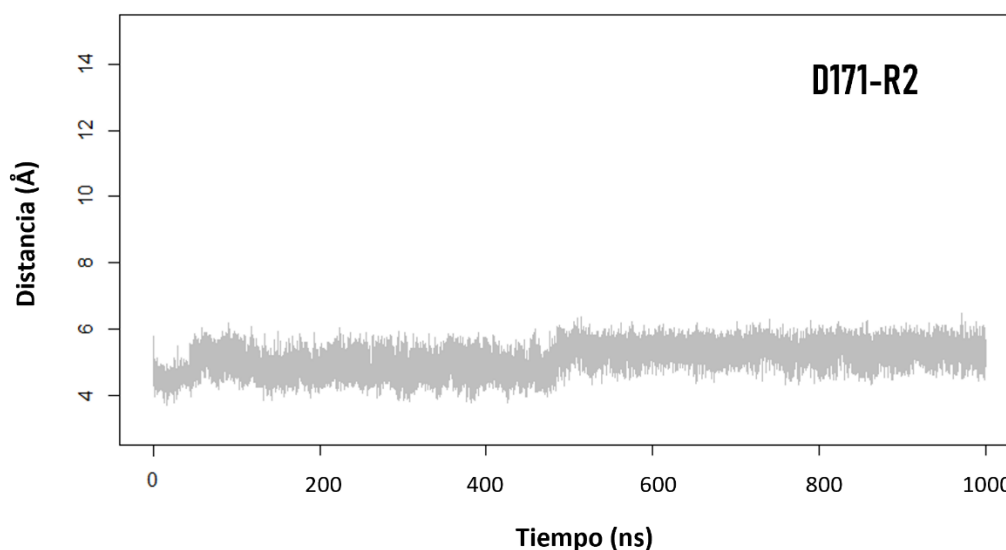


Figura 17. Gráfica de distancia de la interacción D171-R2

Los residuos de lisina K7<sup>MOT</sup> y K8<sup>MOT</sup> interactúan con residuos de aspartato (D). El primer residuo (K7<sup>MOT</sup>), interactúa con D193<sup>5.32</sup> que se encuentra en el inicio de la hélice TM5. El segundo residuo (K8<sup>MOT</sup>) involucra al aspartato D22 que se localiza en el segmento N-terminal de CXCR4; esta interacción no se encontraba presente en la conformación inicial del complejo, pero en aproximadamente 500 ns de simulación ambos residuos formaron un puente salino y su interacción se mantuvo estable por el resto de la trayectoria.

De manera similar, la interacción entre R11<sup>MOT</sup> y D187<sup>ECL2</sup> no se encontraba presente en la estructura del complejo inicial, pero se formó relativamente rápido (aproximadamente a los 50 ns de simulación) y permaneció estable a lo largo del resto de la trayectoria. (Fig. 18). Por último, la interacción entre R14<sup>MOT</sup> y E277<sup>7.28</sup> se formó en la simulación después de una fase de

formación-disrupción que duró aproximadamente 400 ns. La interacción se mantuvo estable durante el resto de la simulación (Fig. 19).

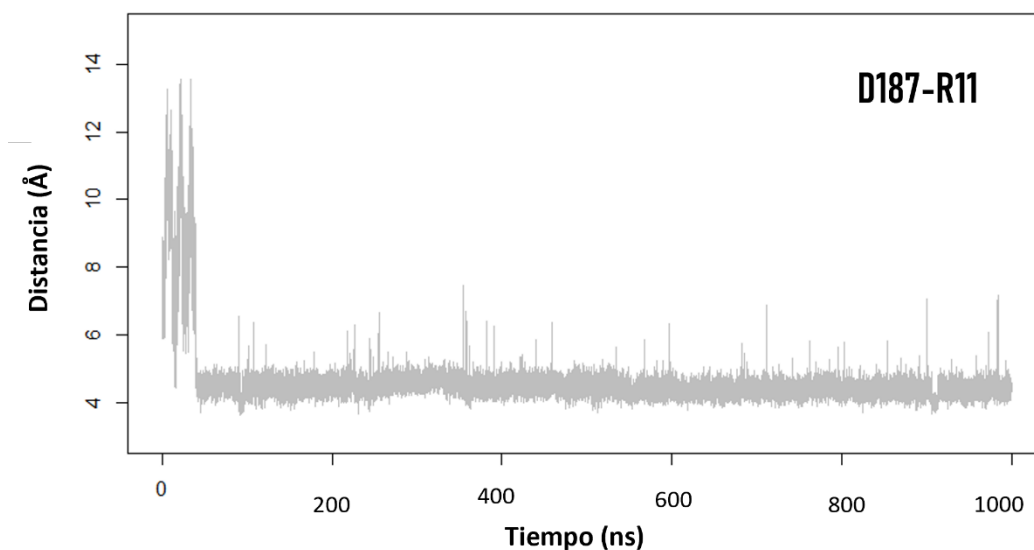


Figura 18. Gráfica de distancia de la interacción D187-R11

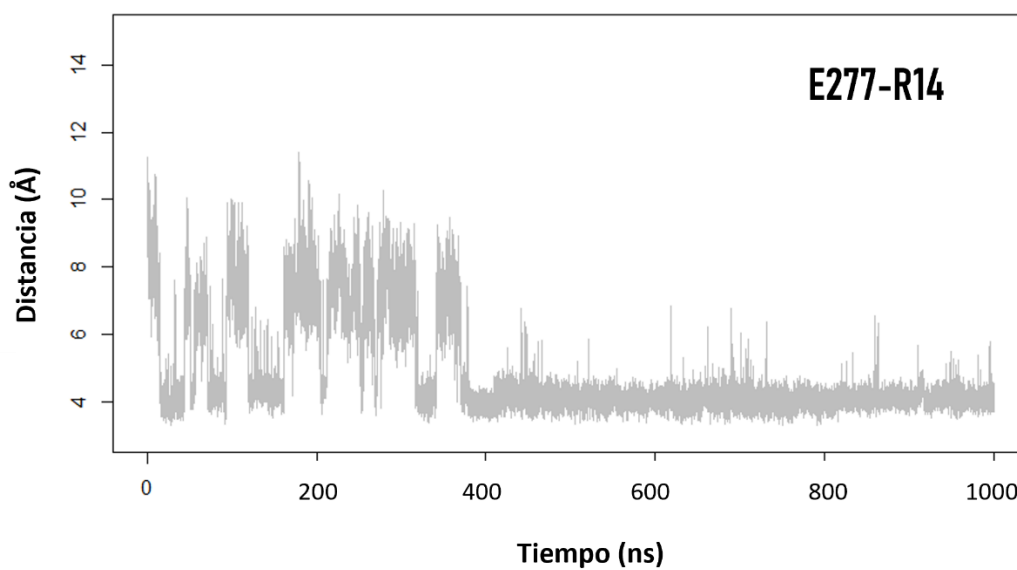


Figura 19. Gráfica de distancia de la interacción E277-R14

Todos los residuos cargados positivamente en Motixafortide interactúan con su contraparte negativa en el sitio de unión del receptor CXCR4, y estas interacciones pueden ser la razón detrás de la alta afinidad del ligante antagonista ( $IC_{50}$  0.54–4.5nM) y de su larga permanencia

(>48 horas) en el receptor. Gracias a las simulaciones de dinámica molecular se identificaron interacciones que no se encontraban en la conformación inicial del complejo Motixafortide/CXCR4 y que permiten entender de manera detallada el funcionamiento del fármaco.

### 3.4 RESIDUOS NO NATURALES DE MOTIXAFORTIDE

La secuencia de aminoácidos de Motixafortide contiene una serie de grupos químicos que difieren de los  $\alpha$ -aminoácidos estándar (Fig. 20), entre los que se encuentran el *capping group* no natural 4-fluorobenzoilo ubicado en la parte N-terminal de CXCR4, la presencia del  $\alpha$ -aminoácido citrulina (HCT), y el residuo sintético derivado de naftaleno (NPA). Mediante las simulaciones de dinámica molecular se investigó el papel de dichos grupos químicos sintéticos tanto en las posibles interacciones que establecen, como en su capacidad de mediar cambios conformacionales en el receptor.

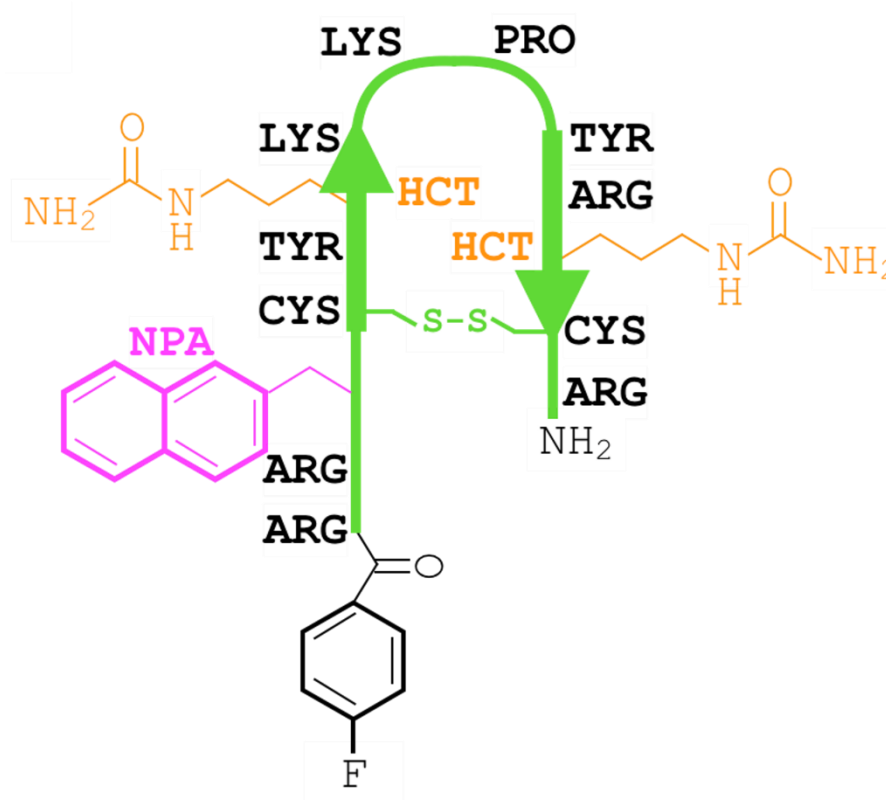


Figura 20. Esquema de la estructura del antagonista Motixafortide

### 3.4.1 Capping group 4-fluorobenzoilo

En la Figura 20 se observa que en el residuo R1<sup>MOT</sup> existe el grupo químico sintético llamado 4-fluorobenzoilo. Las simulaciones de dinámica molecular indican que el grupo 4-fluorobenzoilo se encuentra cerca de las hélices TM2 y TM3 donde establece interacciones aromáticas con los residuos W94<sup>2.60</sup> y Y116<sup>3.32</sup>; ambos residuos son importantes en la activación de los GPCRs. Además, este grupo sintético hidrofóbico interactúa con el residuo C186, localizado en el segmento extracelular denominado por sus siglas en inglés ECL2 (*extracellular loop 2*). C186 es un residuo muy conservado en esta familia de receptores y forma un puente de disulfuro con otra cisteína ubicada en la TM3; este puente de disulfuro está altamente conservado en los GPCRs de clase A (Zhou et al., 2019).

La presencia del anillo aromático en el *capping group* 4-fluorobenzoilo de Motixafortide estabiliza y restringe la posición de los residuos W94<sup>2.60</sup> y Y116<sup>3.32</sup>, los cuales permanecen relativamente cerca durante la simulación. En particular, el espacio conformacional reducido que tiene la cadena lateral de Y116<sup>3.32</sup> posiciona su grupo hidroxilo cerca de E277<sup>7.39</sup> donde estos dos residuos pueden establecer una interacción polar.

Por el contrario, en el complejo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, los residuos W94<sup>2.60</sup> y Y116<sup>3.32</sup> se separan debido a la ausencia de un “ancla aromática” como el *capping group* 4-fluorobenzoilo de Motixafortide. En este caso, el ligante SDF-1 $\alpha$  posiciona su residuo N-terminal, K1<sup>SDF-1 $\alpha$</sup> , en esta región, donde la cadena principal de K1<sup>SDF-1 $\alpha$</sup> , que se encuentra cargada positivamente, establece una interacción carga-carga con E288<sup>7.39</sup>. Además, la cadena lateral polar de Y116<sup>3.32</sup> forma interacciones con la cadena lateral de Y255<sup>6.51</sup>, siendo este último el residuo que influye fuertemente en las conformaciones exploradas por el “toggle switch” W252<sup>6.48</sup> altamente conservado en la TM6 de CXCR4.

Hay que destacar que se ha reportado que Y116<sup>3.32</sup> juega un papel importante en la activación de CXCR4 con SDF1- $\alpha$  y ha sido denominado un residuo inicializador de señales. Algunos estudios de mutagénesis del receptor CXCR4 han mostrado que la mutación de la posición del residuo Y116<sup>3.32</sup> por una serina o alanina (Y116<sup>3.32</sup>S y Y116<sup>3.32</sup>A) causa una disminución en la

activación del receptor cuando es estimulado por su ligante endógeno (Thiele et al., 2014; Wescott et al., 2016).

Como se observa en la Figura 21.A, en el complejo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 los residuos aromáticos Y255<sup>6.51</sup> y W252<sup>6.48</sup> muestran un comportamiento dinámico en relación con el complejo Motixafortide/CXCR4, que puede atribuirse a la presencia del *capping group* 4-fluorobenzoilo de Motixafortide.

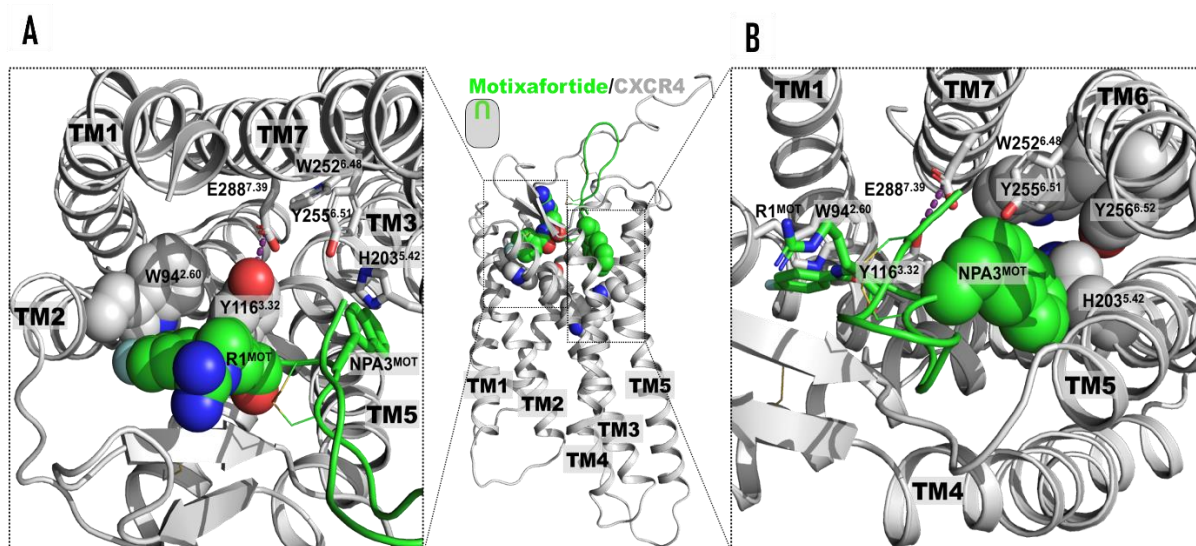


Figura 21. Aminoácidos sintéticos del antagonista Motixafortide

### 3.4.2 NPA3 derivado de naftaleno

La posición 3 de Motixafortide tiene una cadena lateral sintética llamada NPA (2-Naftil-alanina). En relación con el *capping group* 4-fluorobenzoilo, esta cadena lateral aromática se coloca en el lado opuesto del sitio de unión ortostérico cerca de la hélice TM5 (Fig. 21.B). En esta posición, la cadena lateral de NPA3<sup>MOT</sup> establece interacciones aromáticas con los residuos H203<sup>5.42</sup> y Y190<sup>ECL2</sup>. Además, NPA3<sup>MOT</sup> se encuentra en proximidad con el residuo W252<sup>6.48</sup> comúnmente conocido como “*toggle switch*”, que como se ha mencionado anteriormente, está directamente implicado en la activación de los GPCR.

Como se mencionó anteriormente, algunos estudios de mutagénesis en CXCR4 revelan que las posiciones mutantes Y116<sup>3.32</sup>S y Y116<sup>3.32</sup>A disminuyen la activación del receptor cuando se encuentra unido a su ligante endógeno (SDF1- $\alpha$ ). En el caso del “*toggle switch*” en la hélice TM6, cuando se muta el anillo aromático por una alanina (W252<sup>6.48</sup>A), dicho cambio no afecta significativamente la unión de SDF-1 $\alpha$ , pero tiene un gran efecto en la potencia y eficacia de la quimiocina. Las simulaciones de dinámica molecular identificaron el papel de NPA3<sup>MOT</sup> en la restricción de las conformaciones de estos residuos importantes en la activación de los GPCR. Lo anterior nos dice que los dos grupos químicos sintéticos de Motixafortide (4-fluorobenzoilo y NPA3<sup>MOT</sup>) trabajan de manera conjunta para restringir las conformaciones importantes de los residuos Y116<sup>3.32</sup> y W252<sup>6.48</sup> en el sitio de unión ortostérico, los cuales se han asociado con la activación de CXCR4.

## **CAPÍTULO IV**

### *DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES*

## 4.1 DISCUSIÓN

En la actualidad, las distintas enfermedades catalogadas como cáncer son consideradas un tema central de salud pública a nivel mundial ya que implican una de las mayores causas de muerte. Entre los principales tipos de cáncer se encuentra el de pulmón, colorrectal, hígado, mama, próstata y el cáncer pancreático.

Debido a la naturaleza diversa que el cáncer tiene, el hecho de estudiar la mayoría de sus características nocivas, incluyendo la mortalidad, morbilidad, la carga económica y la resistencia a los medicamentos, requiere un enfoque multidisciplinario. Los métodos computacionales permiten comprender los mecanismos funcionales de las biomoléculas directamente involucradas con el cáncer, tienen la capacidad de complementar varias técnicas de caracterización experimental y ofrecen información detallada a nivel molecular que puede ser crucial para resolver los problemas antes mencionados.

En este trabajo se utilizó el método computacional de simulaciones atomísticas de dinámica molecular (MD) para caracterizar el mecanismo de interacción de Motixafortide, que es un compuesto prometedor actualmente involucrado en estudios clínicos para los diferentes tipos de cáncer que regula la vía de señalización SDF1- $\alpha$ -CXCR4. Motixafortide es un péptido cíclico sintético que actualmente está involucrado en diversos estudios clínicos relacionados con terapias para varios tipos de cáncer incluyendo mama, pulmón, melanoma y páncreas. En este contexto, recientes avances terapéuticos han demostrado beneficios significativos de la administración de Motixafortide en conjunto con el antineoplásico Pembrolizumab y quimioterapia para el adenocarcinoma pancreático (PDCA).

El principal blanco farmacológico de Motixafortide es el receptor de quimiocinas CXCR4, que se ha asociado directamente con la progresión tumoral, angiogénesis, metástasis y la supervivencia celular. El receptor CXCR4 es un receptor de la clase A de la familia de GPCR, los cuales están compuesto por siete hélices transmembranales que atraviesan la bicapa lipídica celular.

Utilizando la técnica de dinámica molecular (MD), se investigaron los cambios conformacionales provocados por la presencia de los ligantes Motixafortide y SDF1- $\alpha$ , los

cuales muestran características antagonistas y agonistas respectivamente. En caso del sistema Motixafortide/CXCR4, las conformaciones inactivas del receptor se estabilizaban, mientras que en el segundo sistema estudiado (SDF1- $\alpha$ /CXCR4) se facilitaba la activación del receptor. Cabe recalcar que ambas simulaciones partieron de la misma estructura del receptor CXCR4. Los resultados de la extensa simulación de dinámica molecular (500,000,000 de pasos) indicaron cambios conformacionales diferentes provocados por la presencia de los ligantes investigados y estos resultados concuerdan con la información experimental conocida sobre CXCR4 unido a diferentes ligantes.

Para el caso de Motixafortide se encontró que los seis residuos catiónicos (R1, R2, K7, K8, R11 y R14) están involucrados en interacciones carga-carga con aminoácidos ubicados en el sitio de unión ortostérico de CXCR4; lo anterior puede explicar por qué este antagonista tiene una alta afinidad y permanencia en el receptor. Además, el análisis indicó que los dos residuos sintéticos (4-fluorobezoilo y NPA3) juegan un papel clave para mantener las conformaciones inactivas de residuos importantes en la activación de CXCR4 (Y116<sup>3.32</sup>, W94<sup>2.60</sup> y W252<sup>6.48</sup>). Por último, nuestros resultados indican que los dos residuos de citrulina (HCT) no desempeñan un rol importante en la mediación de la interacción de Motixafortide y CXCR4.

La técnica de Simulaciones Atomísticas de Dinámica Molecular aplicada a la caracterización de fármacos como Motixafortide puede ayudar a entender el mecanismo de interacción del ligante y proveer de información detallada sobre el papel que juegan diferentes grupos químicos en la efectividad del fármaco. Dicha información es crucial para diseñar o rediseñar otros medicamentos que conserven las características farmacológicas del ligante.

## 4.2 CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se estudió el comportamiento del péptido sintético Motixafortide y su interacción con el receptor de quimiocinas CXCR4 que juega un papel importante en la enfermedad de cáncer. Motixafortide es un antagonista del receptor CXCR4 que ha mostrado ampliar los beneficios de tratamientos sistémicos como la quimioterapia para combatir distintos

tipos de cáncer, sin embargo, su estructura terciaria, así como su método de interacción permanecían desconocidos.

Al utilizar simulaciones de dinámica molecular extensas y sin sesgo, se elucidó el mecanismo a nivel molecular por el cual Motixafortide interactúa con CXCR4, estabiliza los estados inactivos del receptor e inhibe el eje de señalización con el ligante endógeno SDF1- $\alpha$ . Además, los resultados brindan información esencial para diseñar de manera racional inhibidores de CXCR4 que conserven las características farmacológicas sobresalientes de Motixafortide, ya que se ha comprobado su eficacia en el tratamiento del cáncer de páncreas, leucemia y mieloma múltiple.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de maestría fueron publicados en la revista internacional **International Journal of Molecular Sciences**, en un volumen especial titulado **State-of-the-Art Molecular Oncology in Mexico**. La referencia correspondiente es:

Mariana Rebolledo-Bustillo†, David Garcia-Gomez†, Eliud Morales Dávila, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Melendez, Victor M. Baizabal-Aguirre, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Jose Manuel Perez-Aguilar. “Structural basis of the binding mode of antineoplastic compound Motixafortide (BL-8040) in the chemokine receptor CXCR4”. *International Journal of Molecular Sciences*. (2023) 24(5), 4393 1:14.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24054393>

## REFERENCIAS

- Aier, I., Semwal, R., Sharma, A., & Varadwaj, P. K. (2019). A systematic assessment of statistics, risk factors, and underlying features involved in pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology*, 58(December 2018), 104–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.12.001>
- American Cancer Society. (2018). *Etapas del cáncer de origen primario desconocido*. Detección Temprana, Diagnóstico y Clasificación Por Etapas.  
<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-origen-primario-desconocido/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/pruebas.html>
- American Cancer Society. (2020). *Tipos y fases de los estudios clínicos*. Estudios Clínicos, Lo Que Necesitas Saber. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/estudios-clinicos/lo-que-usted-necesita-saber/fases-de-los-estudios-clinicos.html>
- BioLineRx. (2016). *Phase IIa study evaluating safety and efficacy of BL-8040 in relapsed/refractory AML patients*. Clinical Trials.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01838395?term=Open-label+Study+Designed+to+Evaluate+the+Safety+and+Efficacy+of+Escalating+Doses+of+BL-8040+in+Adult+Subjects+with+Relapsed%2FRefractory+Acute+Myeloid+Leukemia&rank=1&view=results>
- BioLineRx. (2022a). *A phase III, safety, tolerability and efficacy of combination treatment of BL-8040 and G-CSF as compared to placebo and G-CSF of the mobilization of hematopoietic stem cells for autologous transplantation in subjects with multiple myeloma*. Clinical Trials. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03246529>
- BioLineRx. (2022b). *Motixafortide (BL-8040)*. Stem-Cell Mobilization.  
<https://www.biolinerx.com/pipeline/bl-8040/stem-cell-mobilization>
- BioLineRx. (2022c). *Study assessing safety and efficacy of combination of BL-8040 and*

*pembrolizumab in metastatic pancreatic cancer patients*. Clinical Trials.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02826486>

Bockorny, B., Semenisty, V., Macarulla, T., Borazanci, E., Wolpin, B. M., Stemmer, S. M., Golan, T., Geva, R., Borad, M. J., Pedersen, K. S., Park, J. O., Ramirez, R. A., Abad, D. G., Feliu, J., Muñoz, A., Ponz-Sarvisé, M., Peled, A., Lustig, T. M., Bohana-Kashtan, O., ... Hidalgo, M. (2020). BL-8040, a CXCR4 antagonist, in combination with pembrolizumab and chemotherapy for pancreatic cancer: the COMBAT trial. *Nature Medicine*, 26(6), 878–885. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0880-x>

Cancer Research UK. (2018). *Worldwide cancer statistics*. Cancer Research UK.

<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Zero>

Cancilla, D., Rettig, M. P., & DiPersio, J. F. (2020). Targeting CXCR4 in AML and ALL. *Frontiers in Oncology*, 10(September). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01672>

Chang, C. C., Liou, J. W., Dass, K. T. P., Li, Y. T., Jiang, S. J., Pan, S. F., Yeh, Y. C., & Hsu, H. J. (2020). Internal water channel formation in CXCR4 is crucial for Gi-protein coupling upon activation by CXCL12. *Communications Chemistry*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00383-0>

Cleveland Clinic. (2021). *Cancer*. Cleveland Clinic.

<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/12194-cancer#:~:text=Stage I%3A Cancer is localized,or areas of your body.>

Crees, Z. D., Stockerl-Goldstein, K. E., Larson, S., Illes, A., Milone, G., Martino, M., Stiff, P., Sborov, D. W., Pereira, D. L., Micallef, I. N., Moreno Jimenez, G., & Mikala, G. (2021). Motixafortide (BL-8040) and G-CSF versus Placebo and G-CSF to mobilize hemotopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma: The Genesis Trial. *Blood*, 138(Supplement 1), 435. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood-2021-144296>

Domanska, U. M., Timmer-Bosscha, H., Oude Munnick, T. H., Kruizinga, R. C., Ananias, H.

- J. K., Kliphuis, N. M., & Huls, G. (2012). CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia*, *14*(8), 709–718. <https://doi.org/10.1593/neo.12324>
- Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, *9*, 71. [https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71](https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71)
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, *149*(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Filipek, S. (2019). Molecular switches in GPCRs. *Current Opinion in Structural Biology*, *55*(iv), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.017>
- García-Sáinz, J. A. (2011). Receptores acoplado a proteínas G y su desensibilización. *Rev Odont Mex*, *15*(4), 210–213.
- Geng, H., Chen, F., Ye, J., & Jiang, F. (2019). Applications of Molecular Dynamics Simulation in Structure Prediction of Peptides and Proteins. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *17*, 1162–1170. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.010>
- Goncalves, J. A., South, K., Ahuja, S., Zaitseva, E., Opefi, C. A., Eilers, M., Vogel, R., Reeves, P. J., & Smith, S. O. (2010). Highly conserved tyrosine stabilizes the active state of rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(46), 19861–19866. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009405107>
- González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *Collection SFN*, *12*, 169–200. [https://doi.org/DOI: 10.1051/sfn/201112009](https://doi.org/DOI:10.1051/sfn/201112009)
- Hilger, D. (2021). The role of structural dynamics in GPCR-mediated signaling. *FEBS Journal*, *288*(8), 2461–2489. <https://doi.org/10.1111/febs.15841>
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics for all. *Neuron*, *99*(6).

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>

Huang, J., Rauscher, S., & Nawrocki, G. (2016). CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods*, *14*, 71–73.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>

Huynh, C., Dingemans, J., Meyer zu Schwabedissen, H. E., & Sidharta, P. N. (2020). Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacological Research*, *161*, 105092.

<https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105092>

Isberg, V., De Graaf, C., Bortolato, A., Cherezov, V., Katritch, V., Marshall, F. H., Mordalski, S., Pin, J. P., Stevens, R. C., Vriend, G., & Gloriam, D. E. (2015). Generic GPCR residue numbers - Aligning topology maps while minding the gaps. *Trends in Pharmacological Sciences*, *36*(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.11.001>

Islam, M. J., Khan, A. M., Parves, R., Hossain, N., & Halim, M. A. (2019). Prediction of deleterious Non-synonymous SNPs of human STK11 gene by combining algorithms, molecular docking and molecular dynamics simulation. *Sci Rep*, *9*.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-019-52308-0>

Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-Function of the G-protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *53*, 531–556.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>

Khosravi-Shahi, P., & Díaz Muñoz de la Espada, M. V. (2005). Adenocarcinoma de páncreas: actualizaciones terapéuticas. *Anales de Medicina Interna*, *22*(8).

[https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992005000800010](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992005000800010)

Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1768*(4), 794–807.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.021>

Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (2014). ¿Qué sabe usted acerca de dinámica molecular?

*Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(1).

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952014000100010](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000100010)

- Maleki, R., Afrouzi, H. H., Hosseini, M., Toghraie, D., & Rostami, S. (2020). Molecular dynamics simulation of Doxorubicin loading with N-isopropyl acrylamide carbon nanotube in a drug delivery system. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 184, 105303. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.105303>
- Mayo Clinic. (2020). *Cáncer de páncreas*. Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/pancreatic-cancer/symptoms-causes/syc-20355421>
- Mayo Clinic. (2022). *Cancer treatment*. Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/cancer-treatment/about/pac-20393344>
- Nieto Gutierrez, A., & McDonald, P. H. (2018). GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets. *Cellular Signalling*, 41, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.09.005>
- Olivella, M., Caltabiano, G., & Cordoní, A. (2013). The role of cystein 6.47 in class A GPCRs. *BMC Struct Biol*, 13(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1472-6807-13-3>
- Oum, Y. H., Kell, S. A., Yoon, Y., Liang, Z., Burger, P., & Shim, H. (2020). Discovery of novel aminopiperidiny amide CXCR4 modulators through virtual screening and rational drug design. *Eur J Med Chem*, 201. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112479>
- Pruthi, S. (2022). *Tasa de supervivencia del cáncer: qué significado tiene el pronóstico*. Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/es-es/about-this-site/meet-our-medical-editors>
- Rebolledo-Bustillo, M., Garcia-Gomez, D., Dávila, E. M., Castro, M. E., Caballero, N. A., Melendez, F. J., Baizabal-Aguirre, V. M., Sanchez-Gaytan, B. L., & Perez-Aguilar, J. M. (2023). Structural Basis of the Binding Mode of the Antineoplastic Compound Motixafortide (BL-8040) in the CXCR4 Chemokine Receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4393. <https://doi.org/10.3390/ijms24054393>

- Sokkar, P., Harms, M., Stürzel, C., Gilg, A., Kizilsavas, G., Raasholm, M., Preising, N., Wagner, M., Kirchhoff, F., Ständker, L., Weidinger, G., Mayer, B., Münch, J., & Sanchez-Garcia, E. (2021). Computational modeling and experimental validation of the EPI-X4/CXCR4 complex allows rational design of small peptide antagonists. *Communications Biology*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02638-5>
- Song, J. S., Chang, C. C., Wu, C. H., Dinh, T. K., Jan, J. J., Huang, K. W., Chou, M. C., Shiue, T. Y., Yeh, K. C., Ke, Y. Y., Yeh, T. K., Ta, Y. N. N., Lee, C. J., Huang, J. K., Sung, Y. C., Shia, K. S., & Chen, Y. (2021). A highly selective and potent CXCR4 antagonist for hepatocellular carcinoma treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.2015433118>
- Tan, E., Song, J., Lam, S., D'Souza, M., Crawford, M., & Sandroussi, C. (2019). Postoperative outcomes in elderly patients undergoing pancreatic resection for pancreatic adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Surgery*, 72, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsu.2019.09.030>
- Teixidó, J., Martínez-Moreno, M., Díaz-Martínez, M., & Sevilla-Movilla, S. (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 95, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.018>
- Thiele, S., Mungalpara, J., Steen, A., Rosenkilde, M. M., & Våbenø, J. (2014). Determination of the binding mode for the cyclopentapeptide CXCR4 antagonist FC131 using a dual approach of ligand modifications and receptor mutagenesis. *British Journal of Pharmacology*, 171(23), 5313–5329. <https://doi.org/10.1111/bph.12842>
- Washington University School of Medicine. (2022). *BL-8040 and neralabine for relapsed or refractory T-Acute Lymphoblastic Leukemia/ Lymphoblastic Lymphoma*. Clinical Trials. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02763384?term=NCT02763384&rank=1>
- Wescott, M. P., Kufareva, I., Paes, C., Goodman, J. R., Thaker, Y., Puffer, B. A., Berdugo, E., Rucker, J. B., Handel, T. M., & Doranz, B. J. (2016). Signal transmission through the

CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) transmembrane helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(35), 9928–9933.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1601278113>

World Health Organization. (2020). *Las diez principales causas de defunción*. World Health Organization. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death#:~:text=Las causas principales de defunción,obstructiva crónica%2C infecciones de las>

World Health Organization. (2022). *Cancer*. World Health Organization.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Wu, B., Chien, E. Y. T., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F. C., Hamel, D. J., Kuhn, P., Handel, T. M., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 330(6007), 1066–1071.  
[https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1194396/SUPPL\\_FILE/WU.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1194396/SUPPL_FILE/WU.SOM.PDF)

Zhou, Q., Yang, D., Wu, M., Guo, Y., Guo, W., Zhong, L., Cai, X., Dai, A., Jang, W., Shakhnovich, E., Liu, Z. J., Stevens, R. C., Lambert, N. A., Babu, M. M., Wang, M. W., & Zhao, S. (2019). Common activation mechanism of class a GPCRs. *ELife*, 8, 1–31.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.50279>