



Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Reconocimiento y Evaluación In Silico de los Sitios
de Interacción de Derivados de 1,6-
dihidrociclohepta[b]pirrol frente a Tirosina Cinasas”**

Tesis que presenta:
MCQ. Manuel de Jesús Solís Hernández

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas

Director de Tesis:

Dr. Pedro Navarro Santos

Codirector:

Dr. Luis Chacón García

Morelia, Michoacán, noviembre 2023

CREDITOS INSTITUCIONALES



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Computo de Alto Desempeño del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la codirección del Dr. Pedro Navarro Santos y el Dr. Luis Chacón García, contando con el financiamiento del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por medio de la Beca de Doctorado con registro No. **755896**.

DEDICATORIAS

A mis queridos Padres Alicia Hernández y José Solís por su trabajo y esfuerzo; por darme con tanto amor todo lo que estuvo a su alcance y lo mejor, la oportunidad de estudiar y así mismo dedicarme a lo que tanto me gusta, les bendigo grandemente más allá de la vida confiando en que nos volveremos a encontrar.

A Male mi amada esposa por no soltar mi mano en todo este proceso, dándome en cada momento su apoyo incondicional y aliento para que hoy éste trabajo sea una realidad.

A mi pequeña Amanda; que desde que me enteré de su existencia me dio un impulso de alegría y energía para culminar esta meta tan importante de mi vida, anhelando después le sirva de ejemplo para que ella pueda hacer lo que se proponga con pasión, respeto y dedicación.

A mi Lee-loo, mi tremenda husky, que también forma parte de ésta manada, gracias a esas horas de juegos y alegrías que hicieron que liberara el estrés que en ocasiones se llegó a presentar.

A mi familia Solís Hernández y Mora Baltazar por sus diversas formas de apoyo y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, por ser mi fortaleza y guía para culminar ésta anhelada meta.

A mis directores de tesis, al Dr. Pedro Navarro Santos y al Dr. Luis Chacón García por todo su apoyo, amistad, guía y enseñanzas durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Hugo Alejandro García Gutiérrez por las sugerencias y apoyo que me brindo durante este tiempo, como tutor y como parte de mi comité evaluador, sus valiosas observaciones aportaron mucho para mejorar este trabajo.

A mi comité evaluador, al Dr. Carlos Jesús Cortés García y al Dr. Pablo López Albarrán, por sus observaciones y sugerencias que aportaron mucho a esta tesis.

Al Dr. Juan Pedro Palomarez Báez, por su hospitalidad, paciencia y enseñanzas durante mi estancia en la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Finalmente, gracias a cada uno de los compañeros, doctores y personas que forman parte de este instituto, que de alguna u otra forma necesite de su apoyo.

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I.....	14
I.1 INTRODUCCIÓN	14
I.2. ANTECEDENTES.....	18
<i>I.2.1. Ciclohepta[b]pirrol.....</i>	<i>18</i>
<i>I.2.2. Tirosina cinasas.....</i>	<i>19</i>
I.3 JUSTIFICACIÓN.....	20
I.4 HIPÓTESIS	21
I.5 OBJETIVOS	21
<i>I.5.1 Objetivo general.....</i>	<i>21</i>
<i>I.5.2 Objetivos específicos.....</i>	<i>22</i>
CAPÍTULO II.....	23
METODOLOGÍA COMPUTACIONAL	23
II.1 MARCO TEÓRICO.	23
<i>II.1.1 Acoplamiento Molecular (Molecular Docking)</i>	<i>23</i>
<i>II.1.2 Dinámica molecular (Molecular Dynamics, MD).....</i>	<i>24</i>
<i>II.1.3 Energía libre de unión y análisis de descomposición de energía por residuo.</i>	<i>25</i>
<i>II.1.4 Perfil de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET).....</i>	<i>26</i>
II.2. DETALLES COMPUTACIONALES.	28
<i>II.2.1 Preparación de los ligandos.....</i>	<i>28</i>
<i>II.2.2 Acoplamiento molecular.</i>	<i>28</i>
<i>II.2.3 Dinámica molecular (Molecular Dynamics, MD).....</i>	<i>29</i>
<i>II.2.4 Cálculo de energía libre de unión y análisis de descomposición de energía por residuo.</i>	<i>30</i>
.....	30

<i>II.2.5 Perfil de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET)</i>	31
CAPÍTULO III	32
RESULTADOS	32
III.1 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	32
<i>III.1.1 Validación del protocolo de acoplamiento molecular</i>	32
<i>III.1.2 Análisis de la energía libre de unión y de la constante de inhibición (K_i)</i>	33
<i>III.1.3 Interacciones de los complejos proteína-ligando</i>	35
III.2. DINÁMICA MOLECULAR	40
<i>III.2.1 Análisis de la estabilidad de los complejos proteína-ligando</i>	40
<i>III.2.2 Análisis de puentes de hidrógeno</i>	47
<i>III.2.3 Análisis de energía libre de unión (ΔG)</i>	52
<i>III.2.4 Análisis de descomposición de energía por residuo de aminoácido</i>	54
III.3. PREDICCIÓN DEL PERFIL DE ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, METABOLISMO, EXCRECIÓN Y TOXICIDAD (ADMET)	59
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFIA	66
ANEXO I	72
ANEXO II	81

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. RESULTADOS DE ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN (ΔG), K_i Y pK_i DE LOS COMPLEJOS DE DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL Y TIROSINA CINASAS BCR-ABL1 DE TIPO SILVESTRE Y TRANSFORMADA T315I	34
TABLA 2. RMSD PROMEDIO Y MÁXIMA DE LAS FLUCTUACIONES DEL CA DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE EN COMPLEJO CON LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL Y EL LIGANDO DE REFERENCIA AXI. RMSD PROMEDIO Y MÁXIMA DE LAS FLUCTUACIONES DE LOS LIGANDOS CON RESPECTO A LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE	42
TABLA 3. RMSD PROMEDIO Y MÁXIMA DE LAS FLUCTUACIONES DEL CA DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE EN COMPLEJO CON LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL Y EL LIGANDO DE REFERENCIA AXI. RMSD PROMEDIO Y MÁXIMA DE LAS FLUCTUACIONES DE LOS LIGANDOS CON RESPECTO A LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I	45
TABLA 4. PORCENTAJE DE RESIDENCIA DE LOS PUENTES DE HIDRÓGENO FORMADOS ENTRE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL Y LAS PROTEÍNAS CINASAS BCR-ABL1 SILVESTRE Y TRANSFORMADA T315I	51
TABLA 5. ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN (ΔG) Y CONTRIBUCIÓN DE SUS COMPONENTES INDIVIDUALES EN KCAL/MOL DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL EN COMPLEJO CON LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE.	53
TABLA 6. ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN (ΔG) Y SUS COMPONENTES INDIVIDUALES EN KCAL/MOL DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL EN COMPLEJO CON LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I	53
TABLA 7. DESCOMPOSICIÓN DE ENERGÍA POR RESIDUO PARA LOS AMINOÁCIDOS SELECCIONADOS DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE.	55
TABLA 8. DESCOMPOSICIÓN DE ENERGÍA POR RESIDUO PARA LOS AMINOÁCIDOS SELECCIONADOS DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I	57
TABLA 9. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL Y EL COMPUESTO DE REFERENCIA AXI	60
TABLA 10. PREDICCIONES ADMET DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE 1,6-DIHI-DROCI-CLOHEPTA[B]PIRROL Y EL COMPUESTO DE REFERENCIA AXI	62

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. HERRAMIENTAS QUE EMPLEA EL CADD EN EL DESCUBRIMIENTO Y/O DISEÑO DE FÁRMACOS (MODIFICADO DE SLIWOSKI)[4].	15
FIGURA 2. DESARROLLO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC).[8]	17
FIGURA 3. DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL.	18
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE LAS POSES DE AXI EN EL CÁLCULO DE RMSD. A) LA REFERENCIA EXPERIMENTAL SE MUESTRA EN COLOR ROJO Y LA CALCULADA EN AZUL PARA LA PROTEÍNA SILVESTRE Y B) LA REFERENCIA EXPERIMENTAL SE MUESTRA EN COLOR CIAN Y LA CALCULADA EN COLOR NARANJA PARA LA PROTEÍNA TRANSFORMADA T315I.	32
FIGURA 5. ENERGÍA LIBRE DE UNIÓN (ΔG) Y pKi DE LOS COMPLEJOS DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL Y LA PROTEÍNA SILVESTRE (4WA9) EN COLOR ROJO Y TRANSFORMADA T315I (4TWP) EN COLOR AZUL.	34
FIGURA 6. MODO DE UNIÓN DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL CON MEJOR ΔG . A) PROTEÍNA SILVESTRE EN CONFORMACIÓN DFG-OUT Y LA PRESENCIA DEL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315. B) PROTEÍNA TRANSFORMADA, CONFORMACIÓN DFG-IN Y LA PRESENCIA DEL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE15.	36
FIGURA 7. MAPA DE INTERACCIONES DE AXI CON A) PROTEÍNA SILVESTRE Y B) PROTEÍNA TRANSFORMADA T315I.	37
FIGURA 8. MAPA DE INTERACCIONES DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL EN COMPLEJO CON TIROSINA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE.	38
FIGURA 9. MAPA DE INTERACCIONES DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL EN COMPLEJO CON TIROSINA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I.	40
FIGURA 10. RMSD DEL C _A DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE EN COMPLEJO CON LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL Y EL LIGANDO DE REFERENCIA AXI.	41
FIGURA 11. RMSD < 3.5 Å DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL CON RESPECTO A LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE.	43
FIGURA 12. RMSD > 4.0 Å DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL CON RESPECTO A LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE.	43
FIGURA 13. SUPERPOSICIÓN DE A) 2, B) 5 Y C) 9 EN COMPLEJO CON LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE. EN COLOR AZUL SE PRESENTA LA POSE INICIAL Y EN COLOR ROJO LA POSE FINAL DESPUÉS DE 200 ns.	44
FIGURA 14. RMSD DEL C _A DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I EN COMPLEJO CON LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCIcloHEPTA[B]PIRROL Y EL LIGANDO DE REFERENCIA AXI.	45

FIGURA 15. RMSD < 3.0 Å DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCICLOHEPTA[B]PIRROL CON RESPECTO A LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I	46
FIGURA 16. RMSD > 3.5 Å DE LOS DERIVADOS DE 1,6-DIHDROCICLOHEPTA[B]PIRROL CON RESPECTO A LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I	47
FIGURA 17. SUPERPOSICIÓN DE A) 7 Y B) 8 EN COMPLEJO CON LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 TRANSFORMADA T315I . EN COLOR AZUL SE PRESENTA LA POSE INICIAL Y EN COLOR ROJO LA POSE FINAL DESPUÉS DE 200 NS	47
FIGURA 18. NÚCLEO BASE 1,6-DIHDROCICLOHEPTA[B]PIRROL Y SUS SUSTITUYENTES.	49
FIGURA 19. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DE LOS COMPLEJOS MÁS ESTABLES A) 7-SILVESTRE, B) 3-SILVESTRE, C) 7-TRANSFORMADA Y D) 2-TRANSFORMADA . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π-π, CIAN-INTERACCIONES π-ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315 Y EN ROJO ILE315.....	58
FIGURA A1.1. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO 1 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π-π, CIAN-INTERACCIONES π-ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	73
FIGURA A1.2. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO 2 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π-π, CIAN-INTERACCIONES π-ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	73
FIGURA A1.3. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO 4 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π-π, CIAN-INTERACCIONES π-ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	74
FIGURA A1.4. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO 5 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π-π, CIAN-INTERACCIONES π-ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	74
FIGURA A1.5. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO 6 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π-π, CIAN-INTERACCIONES π-ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y	

CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	75
FIGURA A1.6. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO 8 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	75
FIGURA A1.7 INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO 9 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	76
FIGURA A1.8. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 SILVESTRE Y EL LIGANDO AXI . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN NARANJA SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO THR315.....	76
FIGURA A1.9. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE T315I Y EL LIGANDO 1 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315.	77
FIGURA A1.10. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE T315I Y EL LIGANDO 3 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315.	77
FIGURA A1.11. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE T315I Y EL LIGANDO 4 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315.	78
FIGURA A1.12. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE T315I Y EL LIGANDO 5 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315.	78
FIGURA A1.13. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE T315I Y EL LIGANDO 6 . ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE	

HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315. 79

FIGURA A1.14. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE **T315I** Y EL LIGANDO **8**. ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315. 79

FIGURA A1.15. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE **T315I** Y EL LIGANDO **9**. ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315. 80

FIGURA A1.16. INTERACCIONES FORMADAS DURANTE LAS SIMULACIONES MD DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA CINASA BCR-ABL1 MUTANTE **T315I** Y EL LIGANDO **AXI**. ESQUEMA DE COLORES: VERDE-PUENTES DE HIDRÓGENO, ROSA-INTERACCIONES π - π , CIAN-INTERACCIONES π -ALQUÍLICAS, PURPURA-INTERACCIONES ALQUÍLICAS Y CAFÉ-PUENTES DE HIDRÓGENO NO CONVENCIONALES. EN ROJO SE MUESTRA EL RESIDUO DE AMINOÁCIDO ILE315. 80

RESUMEN

En los últimos años, el diseño, desarrollo y comercialización de nuevos fármacos ha sido un proceso lento y costoso, el tiempo empleado para el desarrollo de una sustancia desde su primera síntesis hasta su comercialización oscila entre los 9 a 13 años. En ese aspecto el diseño de fármacos asistido por computadoras, desempeña un papel muy importante en el desarrollo y estudio de moléculas de peso molecular bajo con posibles propiedades terapéuticas. El desarrollo de fármacos asistido por computadora puede clasificarse en dos categorías, la primera basada en el receptor y la segunda basada en el ligando. Generalmente elegimos la primera si tenemos información detallada del receptor a través de bibliotecas cristalográficas.

En ese sentido se sabe que la leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad producto de la transformación neoplásica de una célula madre hematopoyética, que presenta una anomalía característica, la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph), el cual genera un gen de fusión BCR-ABL1 que produce una proteína con actividad tirosina cinasa aumentada, la transformación maligna de las células es dependiente de su actividad cinasa, por tanto, es un objetivo atractivo para la terapéutica de inhibidores de su actividad. Aunado a esto, recientemente describimos la síntesis de una familia de moléculas cuya estructura base es el 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol, estas moléculas adquieren gran interés químico, sintético y biológico ya que es un sistema heterocíclico fusionado que presenta analogía estructural al indol y al 1-azaazuleno cuya actividad biológica es conocida, por lo que las moléculas derivadas podrían presentar actividad inhibitoria contra estas proteínas tirosina cinasas.

En este trabajo se emplearon herramientas químico-computacionales utilizados en el diseño de fármacos asistidos por computadora, particularmente las técnicas de acoplamiento y dinámica molecular, así como la determinación de la energía libre de unión, que permitieron determinar las interacciones de los complejos proteína-ligando y evaluar su estabilidad en el sitio de unión y su posible actividad inhibitoria.

Palabras clave: acoplamiento molecular, dinámica molecular, PTK, TKI, BCR-ALB1

ABSTRACT

In recent years, the design, development and commercialization of new drugs has been a slow and expensive process; the time taken to develop a substance from its first synthesis to its commercialization ranges from 9 to 13 years. In this aspect, computer-assisted drug design plays a very important role in the development and study of low molecular weight molecules with possible therapeutic properties. Computer-aided drug development can be classified into two categories, the first one being receptor-based and the second one being ligand-based. We generally choose the first one if we have detailed receptor information through crystallographic libraries.

In this sense, it is known that chronic myeloid leukemia (CML) is a disease resulting from the neoplastic transformation of a hematopoietic stem cell, which presents a characteristic anomaly, the presence of the Philadelphia chromosome (Ph), which generates a BCR-ABL1 fusion gene, produces a protein with increased tyrosine kinase activity, the malignant transformation of cells is dependent on its kinase activity, therefore, it is an attractive target for the therapeutics of inhibitors of its activity. In addition to this, we recently described the synthesis of a family of molecules whose base structure is 1,6-dihydrocyclohepta[b]pyrrole. These molecules acquire great chemical, synthetic and biological interest since it is a fused heterocyclic system that presents structural analogy to indole and 1-azaazulene whose biological activity is known, so the derived molecules could present inhibitory activity against these protein tyrosine kinases.

In this work, chemical-computational tools used in computer-assisted drug design were used, particularly docking and molecular dynamics techniques, as well as the determination of the binding free energy, which allowed determining the interactions of the protein-ligand complexes and evaluate its stability at the binding site and its possible inhibitory activity.

Capítulo I

I.1 Introducción

En los últimos años, el diseño, desarrollo y comercialización de nuevos fármacos ha sido un proceso largo y costoso, el tiempo empleado para el desarrollo de un compuesto desde que se sintetiza hasta que se comercializa dura aproximadamente entre 9 a 13 años, durante este proceso solo una cantidad mínima de candidatos se examinan y pocos llegan a las etapas finales de desarrollo, de los cuales unos cuantos serán comercializados.[1] En ese aspecto el diseño de fármacos asistido por computadoras (CADD, por sus siglas en inglés) desempeña un papel muy importante en el estudio y desarrollo de moléculas de peso molecular bajo, cuyo objetivo es identificar compuestos con posibles propiedades terapéuticas.

El CADD emplea herramientas y recursos computacionales que permiten generar bibliotecas virtuales de miles de compuestos y proteínas de interés, además, del análisis y modelado de compuestos, así como herramientas para la evaluación de posibles candidatos antes de que se sinteticen y prueben, como son el acoplamiento molecular, dinámica molecular, perfil de absorción, metabolismo y toxicidad, entre otros, haciendo así el proceso más eficiente.[2]

Este diseño de fármacos se puede clasificar en dos categorías generales: basado en la estructura del receptor y basado en la estructura del ligando. Como se observa en la **Figura 1** el CADD basado en la estructura del receptor se fundamenta en el conocimiento de la estructura de la proteína blanco y así identificar los residuos de aminoácidos que forman parte importante del mecanismo de reconocimiento de sus sustratos y compuestos que se prueban, además, es posible calcular las energías de interacción para estos complejos, mientras que el CADD basado en la estructura del ligando aprovecha el conocimiento de moléculas activas e inactivas conocidas a través de búsquedas de similitud química en bibliotecas virtuales o la construcción de modelos predictivos de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).

En general se elige el CADD basado en la estructura del receptor cuando se dispone de datos estructurales de alta resolución de la proteína diana, es decir, para proteínas solubles que pueden cristalizarse fácilmente. Por otra parte, se prefiere el CADD basada en la estructura del ligando cuando hay poca información estructural del receptor disponible, a menudo para proteínas diana de la membrana. El objetivo principal del CADD basado en la estructura del receptor es diseñar compuestos que se unan estrechamente a la proteína diana y sean específicos, es decir, que tengan efectos nulos o reducidos fuera de esta.[3, 4]

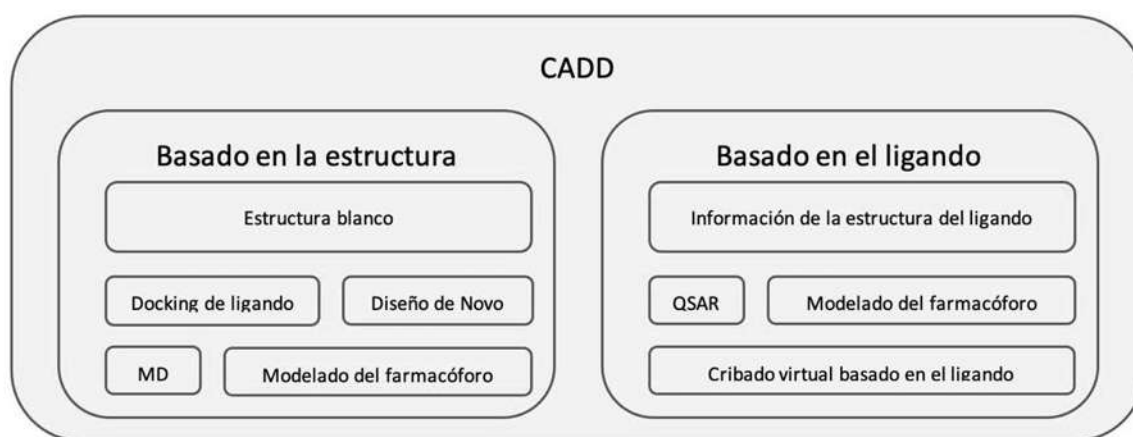


Figura 1. Herramientas que emplea el CADD en el descubrimiento y/o diseño de fármacos (modificado de Sliwoski)[4].

En el contexto de la estructura del receptor, se sabe que las proteínas tirosina cinasas (PTKs) forman parte del mecanismo fundamental de comunicación de las células de organismos multicelulares. Estas proteínas se dividen en dos grandes familias, por un lado, se encuentran los receptores de tirosina cinasa (RTKs), que son glicoproteínas transmembrana, las cuales son activadas mediante la unión de su ligando a fin y que transducen la señal extracelular hacia el citoplasma por fosforilación de los residuos de aminoácidos de tirosina en sus mismas cadenas (autofosforilación) lo que genera una cascada de señalización proteica. Los RTKs activan varias rutas de señalización entre las células, tales como diferenciación, proliferación, migración o cambios metabólicos celulares.[5]

La familia RTKs incluye los receptores para la insulina (InsR) y para muchos factores de crecimiento, tales como, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas

(PDGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento nervioso (NGF). La estructura general de los RTKs consiste en una porción extracelular polipeptídica que une a los ligandos, una hélice transmembrana y una porción citoplásmica que posee la actividad catalítica tirosina cinasa.[6]

Por otra parte, existe una numerosa familia de no receptores de tirosina cinasa (NRTKs), los cuales incluyen Src, las Janus cinasas (Jaks), Csk, Syk, Abl, entre otros. Los NRTKs son componentes esenciales de la cascada de señalización desencadenada por los RTKs y por otros receptores de superficie celular tales como la proteína G y receptores del sistema inmune.[7]

Es de gran interés biológico comprender el mecanismo detallado de la señalización de tirosina cinasas ya que la función anómala tanto de RTKs como de NRTKs, está presente en ciertas enfermedades, como la leucemia mieloide crónica (LMC), una enfermedad producto de la transformación neoplásica de una célula madre hematopoyética, la cual presenta dos fases, la primera, conocida como fase crónica inicial que se caracteriza por la producción masiva de células del linaje granulocítico, esta fase dura en promedio de tres a cuatro años. La adquisición de otras anomalías genéticas o epigenéticas da como consecuencia la progresión a la segunda fase, la fase blástica, que se caracteriza por la pérdida de la diferenciación celular provocando la presencia de un 30% o más de blastocitos linfoides o mieloides en sangre periférica o en medula ósea (**Figura 2**).[8]

Además, la LMC presenta una anomalía genética característica, la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph) producto de la translocación (9,22) (q34, q11), generando un gen de fusión BCR-ABL1 que produce una proteína con actividad tirosina cinasa aumentada. Se ha identificado que esta proteína BCR-ABL1 desempeña un papel central en la patogénesis de la LMC, la transformación maligna de las células por BCR-ABL1 es críticamente dependiente de su actividad tirosina cinasa ya que activa múltiples vías de señalización y, por tanto, la activación de tales vías puede afectar la expresión de genes que confieren el fenotipo maligno,[9] por lo tanto la tirosina cinasa BCR-ABL1 y las PTKs en general son un objetivo atractivo para terapéutica de inhibidores de su actividad catalítica.[10, 11]

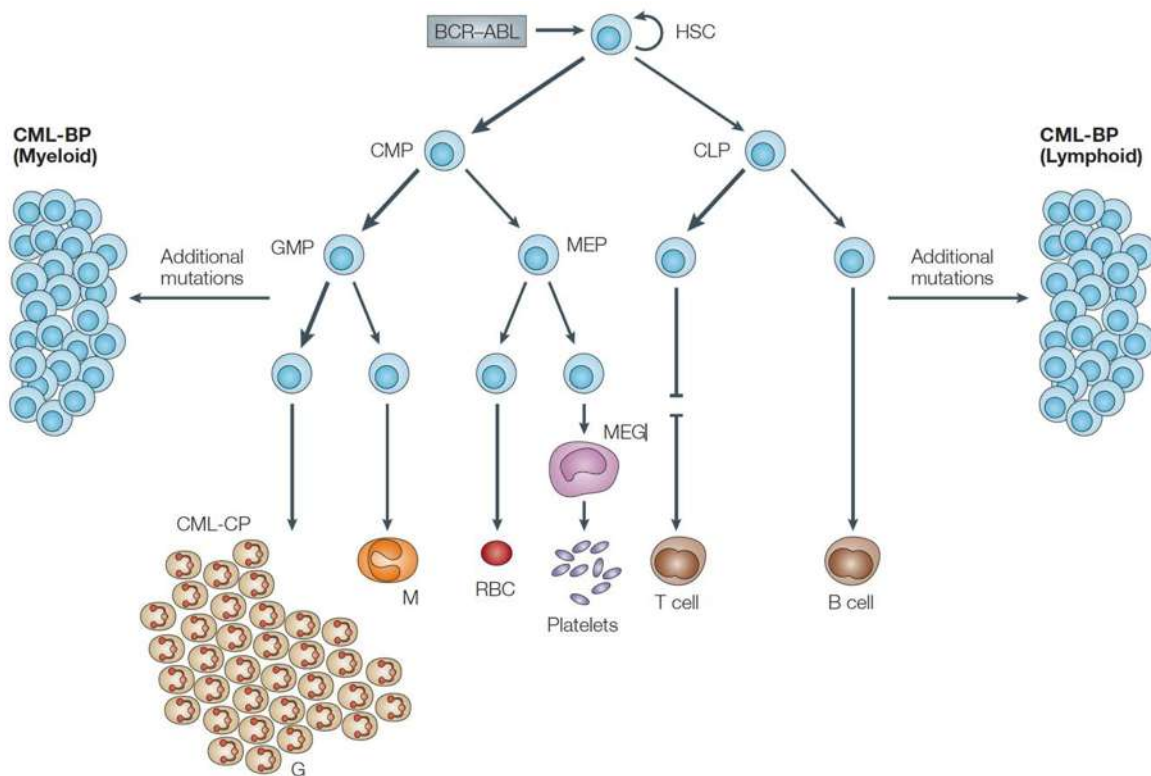


Figura 2. Desarrollo de la leucemia mieloide crónica (LMC).[8]

Recientemente en el grupo de trabajo se ha descrito la síntesis de una familia de moléculas heterocíclicas las cuales se esquematizan en la **Figura 3**, su estructura base es el ciclohepta[*b*]pirrol[12] del cual se han encontrado pocos reportes sobre su síntesis[13, 14] por lo cual los derivados insaturados de estas moléculas adquieren gran interés químico, sintético y biológico ya que es un sistema heterocíclico fusionado que presenta analogía al indol y al 1-azaazuleno cuya actividad biológica es conocida,[15-17] un ejemplo importante de esta actividad es la capacidad de inhibir a las PTKs.[18]

Debido a estas características, existe la posibilidad de que las moléculas derivadas de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol puedan tener actividad inhibitoria contra estas PTKs de tipo BCR-ABL1 que desempeñan un papel muy importante en la LMC. Para el desarrollo de este proyecto se emplearán herramientas y recursos químico-computacionales empleados en el desarrollo de fármacos asistido por computadora, como son el modelado molecular, técnicas de acoplamiento molecular, simulaciones de dinámica molecular, técnicas de determinación de energía libre de unión y perfiles de absorción, metabolismo,

excreción y toxicidad teóricos, para determinar el mecanismo de interacción de estas moléculas con las PTKs y además determinar su posible capacidad inhibitoria.

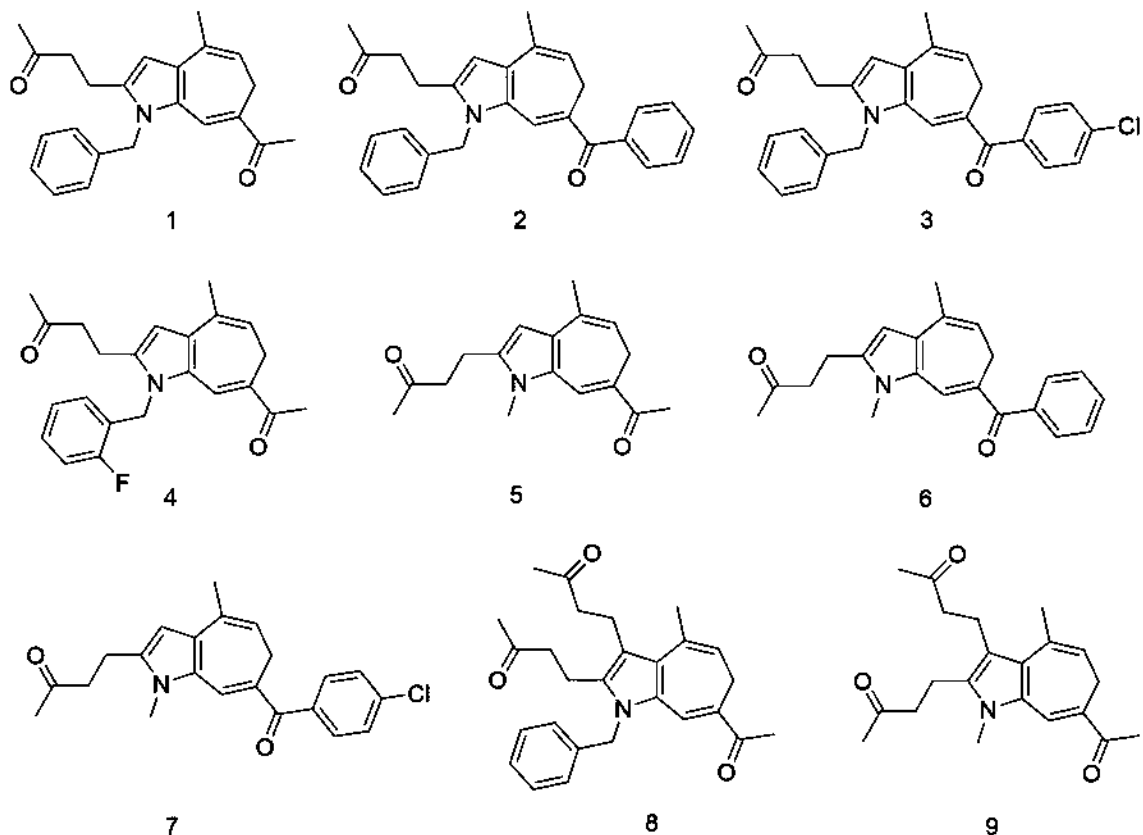


Figura 3. Derivados de 1-6-dihidrociclohepta[b]pirrol.

I.2. Antecedentes

I.2.1. Ciclohepta[b]pirrol.

El núcleo ciclohepta[b]pirrol es un biciclo fusionado que contiene el núcleo base del pirrol el cual es considerado un núcleo privilegiado de interés en química medicinal, estas moléculas han generado gran interés debido a las posibles aplicaciones farmacológicas, por ejemplo, se ha encontrado que derivados de estas moléculas tienen un efecto inhibitorio de la enzima aldosa reductasa lo que resulta útil para el tratamiento de las complicaciones de la diabetes como neuropatía, nefropatía, retinopatía, cataratas y aterosclerosis ya que estas consecuencias se han relacionado con la acumulación indeseable de sorbitol en los tejidos, la cual es a su vez consecuencia de los altos niveles de glucosa de los

pacientes diabéticos.[19] Se han descrito también alcaloides que presentan el núcleo ciclohepta[*b*]pirrol, obtenidos de cianobacterias y se ha visto que presentan actividad inhibitoria contra *Mycobacterium tuberculosis*.[20]

Desde un enfoque experimental en el grupo de trabajo se ha descrito la síntesis de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirroles en tres etapas de reacción lo cual es un aporte importante en la química sintética ya que hasta dónde se sabe solo existe un reporte que aborda la obtención de este compuesto y desde el punto de vista químico computacional no existe antecedente de la realización de algún estudio de acoplamiento y/o dinámica molecular de derivados insaturados de los ciclohepta[*b*]pirroles.

1.2.2. Tirosina cinasas.

Las tirosinas cinasas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de algunos procesos cancerosos, en este rubro el gen de fusión BCR-ABL1 es un oncogén cuyo producto es una PTK con función cinasa aberrante, el cual impulsa el desarrollo de la leucemia mieloide crónica en el 90% de los casos y arriba del 15% de los casos de leucemia linfoblástica aguda en adultos.[21] Existen medicamentos inhibidores de la cinasa ABL1 que han ayudado a la supervivencia del paciente, sin embargo, las mutaciones puntuales en el dominio de la cinasa ABL1 provocan que la unión del inhibidor se debilite y representan el mecanismo de resistencia clínica más común, por ejemplo, la mutación puntual del dominio cinasa BCR-ABL1 Thr315Ile (**T315I**) confiere resistencia a todos los inhibidores ABL1 aprobados, excepto al fármaco comercial ponatinib.[22]

En un estudio de acoplamiento y dinámica molecular realizado utilizando el módulo CDOCKER del software Discovery Studio, para las proteínas cinasas BCR-ABL1 de tipo salvaje y mutante, se demostró este mecanismo de resistencia, la molécula de ponatinib fue capaz de unirse a las estructuras de tirosina cinasa BCR-ABL1 tipo salvaje y mutante **T315I**, debido a la presencia en su estructura de un triple enlace carbono-carbono que le ayuda a anclarse de tal forma que se evita el impedimento estérico causado por el residuo de isoleucina (I315), lo cual fue comparado con el fármaco imatinib, que carece de este enlace y no se ancla a la forma alterada del sitio activo de la BCR-ABL1 tirosina cinasa **T315I**, los resultados

de la energía de unión obtenidas mostraron una energía menos favorable para imatinib que para ponatinib.[23]

Se han explorado además otras alternativas como Axitinib, un fármaco aprobado contra el cáncer renal como agente anti angiogénico, altamente selectivo para el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) que tiene función tirosina cinasa. En este estudio se encontró que Axitinib inhibió de forma potente a la proteína BCR-ABL1 transformada **T315I** ya que presentó interacciones de unión más óptimas que con la proteína BCR-ABL1 silvestre con constantes de inhibición (K_i) de 0.1 y 3.8 nM respectivamente, además, se observó que la mutación **T315I** cambia el equilibrio conformacional de la cinasa a favor de una conformación activa DFG-in, lo que significa que el aminoácido aspartato del motivo DFG está orientado hacia el interior del sitio activo, lo que le permite coordinar a iones magnesio que son indispensables para el mecanismo de hidrólisis del ATP, mientras que la cinasa de tipo silvestre se encuentra en conformación inactiva DFG-out, en la cual el aminoácido aspartato se orienta hacia el exterior del sitio activo. El tratamiento de un paciente con LMC con Axitinib dio como resultado una disminución rápida de las células **T315** positivas en médula ósea.[24]

1.3 Justificación

Mediante la aplicación sistemática de técnicas computacionales como el acoplamiento y dinámica molecular es posible estudiar la interacción de especies de interés biológico como diversos tipos de receptores (proteínas o macromoléculas) y ligandos como los compuestos propuestos en este proyecto. Este tipo de estudios químico-computacionales pueden proporcionar en primera instancia, la identificación de residuos de aminoácidos de la enzima que interactúan químicamente con los ligandos, su estabilidad a través de tiempo en la cavidad de la proteína y la información fisicoquímica detallada sobre las interacciones presentes, estas propiedades son de gran interés científico, ya que permiten proponer el mecanismo de interacción de los ligandos y su posible capacidad inhibitoria.

En el grupo de trabajo se han sintetizado recientemente una familia de moléculas heterocíclicas que resultan de interés químico y biológico, ya que su estructura base es el ciclohepta[*b*]pirrol, un sistema heterocíclico fusionado

análogo al indol y al 1-azaazuleno con actividades biológicas conocidas, se piensa que los derivados insaturados podrían tener actividad biológica contra las tirosina cinasas un grupo amplio de enzimas que tienen participación en muchos procesos de señalización celular y que son de gran interés porque su sobreexpresión está relacionada a diversos procesos cancerosos.

De tal manera que, en este proyecto de investigación se plantea la posibilidad de explorar la posible actividad inhibitoria de los derivados insaturados del ciclohepta[*b*]pirrol en presencia de enzimas de la familia tirosina cinasas BCR-ABL1 empleando técnicas computacionales como acoplamiento molecular, dinámica molecular y determinación de la energía libre de unión.

I.4 Hipótesis

Se sabe que la familia de las proteínas tirosina cinasas participan en muchos procesos de señalización celular y que también se han asociado a diferentes procesos cancerosos, además, pueden servir como blancos de posibles sustancias químicamente activas. Por otra parte, los compuestos derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol se consideran análogos del indol y/o azaazuleno cuya capacidad de inhibir la actividad catalítica de esta enzima es conocida, consideramos que las moléculas con base 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol podrían presentar actividad biológica frente a las proteínas tirosina cinasas, mediante técnicas químico-computacionales es posible determinar su interacción lo cual acerca el promisorio uso de esta familia de compuestos a posibles aplicaciones bioquímicas.

I.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Estudiar mediante técnicas químico-computacionales, el acoplamiento y la dinámica molecular de las interacciones de compuestos derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol frente a tirosina cinasas BCR-ABL1 de tipo silvestre y transformada **T315I**, que permitan predecir su capacidad y/o mecanismo de inhibición frente a estas enzimas.

1.5.2 Objetivos específicos

- a) Construir los modelos moleculares tridimensionales de los compuestos **1** al **9**, derivados de 1,6-dihidrociclohepta[**b**]pirrol y determinar su estructura de menor energía.
- b) Realizar un estudio de acoplamiento molecular de los compuestos **1** al **9** para determinar el sitio de interacción con las proteínas tirosina cinasas BCR-ABL1 silvestre y transformada T315I y predecir su posible actividad inhibitoria.
- c) Realizar las simulaciones de dinámica molecular de los compuestos **1** al **9** frente a tirosina cinasas BCR-ABL1 silvestre y transformada T315I y determinar la estabilidad de dichos compuestos a través del tiempo en el sitio activo de la enzima.
- d) Realizar la determinación de la energía libre de unión (ΔG) de los complejos entre los compuestos **1** al **9** y tirosina cinasas BCR-ABL1 silvestre y transformada T315I e identificar a los compuestos con mayor afinidad.
- e) Realizar un análisis de descomposición de energía de los complejos entre los compuestos **1** al **9** y tirosina cinasas BCR-ABL1 silvestre y transformada T315I, que permitan identificar las interacciones con los residuos de aminoácidos que son determinantes en el mecanismo de interacción.

Capítulo II

Metodología computacional

II.1 Marco teórico.

II.1.1 Acoplamiento Molecular (Molecular Docking).

La metodología de acoplamiento molecular explora el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio de unión de una proteína diana. El acoplamiento molecular tiene dos componentes: a) docking o proceso de búsqueda de la conformación y orientación de las moléculas, y b) scoring, que consiste en asignar un valor o puntaje que mida la interacción entre las dos estructuras.[25]

Los programas de acoplamiento molecular siguen un algoritmo de búsqueda que debe generar un número óptimo de configuraciones que incluyan el modo de enlace determinado experimentalmente.[26] Un algoritmo de búsqueda riguroso dilucidaría exhaustivamente todos los modos de unión posibles entre el ligando y el receptor. Se explorarán los seis grados de libertad traslacional y rotacional junto con los grados de libertad conformacionales internos del ligando. Considerando la flexibilidad de las moléculas, el número de posibles conformaciones puede ser muy elevado. De igual manera, si la cavidad del sitio receptor es grande y/o flexible, es más complicado encontrar la posición y orientación que tendrá la molécula pequeña dentro del receptor.

La generación de una amplia gama de modos de enlace no es efectiva sin un modelo para clasificar cada conformación que sea precisa y eficiente. La función de puntuación debe poder distinguir los modos de enlace experimentales de todos los otros modos explorados a través del algoritmo de búsqueda. La función de puntuación de afinidad servirá para clasificar las posturas candidatas como la suma de las energías electrostática y van der Waals. Las fuerzas de interacción específicas en sistemas biológicos apuntan hacia

complementariedades entre la forma y la electrostática de las superficies del sitio de unión y el ligando o sustrato.[27]

De las dos etapas, la segunda es la más difícil de calcular con precisión de forma rápida. Es por esto que en la actualidad el acoplamiento molecular es especialmente útil para proponer modelos de unión, pero aún no son muy confiables para calcular con precisión la energía de interacción. Esto se debe a la gran cantidad de aproximaciones que se hacen para calcular la energía de interacción de forma rápida. Por ejemplo, no se considera en detalle la flexibilidad y solvatación de la diana molecular. Para solucionar este problema los modelos obtenidos por acoplamiento molecular se someten a otros cálculos más refinados que se calculan con niveles de teoría elevados.[28, 29]

II. 1.2 Dinámica molecular (Molecular Dynamics, MD)

Una apreciación fundamental de cómo funcionan las proteínas requiere, una comprensión de la conexión entre la estructura tridimensional (obtenida con creciente rapidez por cristalografía de rayos X y RMN) y la dinámica molecular, que es mucho más difícil de explorar experimentalmente.[30] Las simulaciones de dinámica molecular proporcionan vínculos entre la estructura y la dinámica al permitir la exploración del paisaje energético conformacional accesible a las proteínas,[31] además, permite simular los movimientos de un sistema de partículas. Los elementos esenciales para una simulación de dinámica molecular son un conocimiento del potencial de interacción de las partículas (a partir del cual se pueden calcular las fuerzas) y de las ecuaciones de movimiento que rigen la dinámica de las partículas. Las ecuaciones de movimiento newtonianas clásicas son adecuadas para muchos sistemas, incluidas las biomoléculas.

Dos atributos de las simulaciones de dinámica molecular desempeñan un papel esencial en su desarrollo y en una amplia gama de aplicaciones. Por un lado, proporcionan movimientos de partículas individuales en función del tiempo para que se puedan sondear mucho más fácilmente que los experimentos para responder preguntas detalladas sobre las propiedades de un sistema. Por otra parte, aunque el potencial utilizado en una simulación es aproximado, está completamente bajo el control del usuario, de modo que al eliminar o alterar

contribuciones específicas se puede examinar su papel en la determinación de una propiedad determinada.

Las simulaciones de dinámica molecular comienzan con un conocimiento de la energía del sistema en función de las coordenadas atómicas. La superficie de energía potencial determina las estabildades relativas de las diferentes estructuras estables o metaestables posibles. Las fuerzas que actúan sobre los átomos del sistema, que están relacionadas con las primeras derivadas del potencial con respecto a las posiciones de los átomos, pueden usarse para calcular el comportamiento dinámico del sistema resolviendo las ecuaciones de movimiento de Newton para los átomos como una función de tiempo.

Las funciones de energía utilizadas para las proteínas están generalmente compuestas por términos de enlace que representan longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos de torsión, y términos de no enlace que consisten en interacciones de Van der Waals y contribuciones electrostáticas. Una expresión ampliamente utilizada se muestra en la ecuación (1):

$$E(\mathbf{R}) = \frac{1}{2} \sum_{bonds} K_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\substack{bond \\ angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{torsional} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \\ + \sum_{nb\ pairs} \left(\frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_1 q_2}{Dr} \right) \quad (1)$$

En donde la energía (E), es una función del conjunto de coordenadas cartesianas (R), que especifica las posiciones de todos los átomos, a partir de las cuales se calculan las coordenadas internas para longitudes de enlace (b), ángulos de enlace (θ), ángulos diedros (ϕ) y distancias entre partículas (r). El primer término de la ecuación representa desplazamientos instantáneos de la longitud de enlace ideal (b_0), por el potencial de la ley de Hooke. El segundo término de la ecuación representa a la energía asociada con la alteración de ángulos de enlace. En el tercer termino se considera las rotaciones sobre enlaces y el término final representa las interacciones no enlazantes mediadas por las cargas (q_1 y q_2).

II. 1.3 Energía libre de unión y análisis de descomposición de energía por residuo.

El cálculo de la energía libre de unión, es un rubro del diseño de fármacos de gran importancia, en ese aspecto se han desarrollado diferentes metodologías

computacionales para determinar la energía libre de unión entre complejos proteína-ligando y proteína-proteína, además al paso de los años se han mejorado y hecho más eficientes para obtener estimaciones con mayor exactitud. [32-35]

Los métodos más utilizados son MM/PBSA (*Molecular Mechanics/Poisson Boltzman Surface Area*) y MM/GBSA (*Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*),[36] en ambos métodos se asume que las conformaciones no unidas tanto del ligando como de la proteína, son equivalentes a las muestreadas en el complejo, por lo que no es necesario muestrearlas de forma separada, por lo que son menos costosos computacionalmente.[37] Para desarrollar este método, en primera instancia se necesita llevar a cabo una simulación de dinámica molecular con solvente explícito, posteriormente eliminar todas las moléculas de solvente e iones de las conformaciones proteína-ligando seleccionadas de la trayectoria y utilizar el modelo de solvente implícito de PBSA o GBSA para calcular la energía de solvatación. Finalmente puede calcularse el cambio de entropía conformacional de las conformaciones seleccionadas, sin embargo, habitualmente es ignorado ya que su cálculo implica un alto costo computacional. La energía libre de unión obtenida de estos métodos puede determinarse mediante la ecuación (2):

$$\Delta G_{\text{union}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S \quad (2)$$

En donde ΔE_{MM} es el cambio de energía de mecánica molecular en fase gas, ΔG_{solv} es la energía de solvatación y $T\Delta S$ la entropía conformacional.

II.1.4 Perfil de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET).

En el desarrollo de fármacos, es muy importante conocer las características fisicoquímicas, farmacocinéticas y farmacológicas de compuestos con actividad biológica debido a que esto ayuda a optimizar las características de los candidatos a fármacos. Es decir, idealmente un fármaco debería ser absorbido adecuadamente en el cuerpo, distribuido a los diferentes órganos y tejidos, metabolizado de tal manera que no se pierda la actividad biológica deseada o se produzcan metabolitos indeseables, además, de que sean fácilmente eliminables del organismo y no produzcan algún tipo de toxicidad a nuestro cuerpo.[38] Desde

hace algunas décadas, con el desarrollo de la química combinatoria y el desarrollo de bibliotecas virtuales con miles de moléculas de interés, se ha tenido la necesidad de implementar nuevos métodos. Gracias a la constante evolución de la capacidad computacional se han desarrollado programas capaces de determinar in silico estas propiedades en menor tiempo, sirviendo como tamizaje de aquellas moléculas que se consideren presentan un perfil adecuado y puedan ser optimizadas.[39] En los últimos año se han desarrollado herramientas de acceso abierto o comercial, entre las herramientas de acceso abierto más utilizadas se encuentran SwissADME,[40] pkCSM,[41] admetSAR2.0,[42] ADMETlab2.0,[43] entre otros. Estas herramientas se basan en técnicas como regresión lineal múltiple (MLR), clasificación basada en QSAR, técnicas de ML (Machine Learning), aprendizaje profundo (Deep Learning), Redes neuronales convolucionales (CNN), etc.

Estas herramientas pueden determinar una lista amplia de propiedades, sin embargo, las determinaciones más comunes para las propiedades fisicoquímicas son el peso molecular (WM), el número de átomos (nA), número de aceptores de puentes de hidrógeno (HBA), numero de donadores de puentes de hidrógeno (HBD), número de enlaces rotables (nRB), lipofilicidad (log P), solubilidad (log S). En cuanto a las reglas de química medicinal se pueden determinar Lipinski o regla de los 5, Ghose, Veber, Triángulo dorado. Y para el perfil ADMET, puede predecirse, la permeabilidad de las células Caco2 (CacoP), la permeación a la barrera hematoencefálica (BBB), absorción intestinal humana (HIA), inhibidores y sustratos de citocromos (CYP I/S), inhibidores y sustratos de la proteína G (Pgp I/S), volumen de distribución (VD), aclaramiento (CL), hepatotoxicidad (HepTox), toxicidad de Ames (AT), entre otras. Finalmente debido a que los servidores consideran diferentes bases de datos y diferentes herramientas para sus modelos, se sugiere emplear diferentes herramientas in silico y realizar una comparativa de las propiedades.[44]

II.2. Detalles computacionales.

II.2.1 Preparación de los ligandos.

En primera instancia se realizó el modelado molecular tridimensional de los nueve ligandos derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y el ligando de referencia Axitinib, empleando el programa Spartan 20,[45] posteriormente se obtuvo su estado de protonación a un pH de 7.4 con el programa Avogadro[46] y finalmente se les realizó un cálculo de optimización de geometría por DFT a un nivel de teoría B3LYP/6-311G⁺⁺(d,p) empleando la suite Gaussian16,[47] una vez obtenida las estructuras optimizadas, el mínimo global se validó explorando la superficie de energía potencial (SEP), encontrando para todos los ligandos frecuencias vibracionales positivas.

II.2.2 Acoplamiento molecular.

Para el desarrollo de este proyecto se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular, las cuales se llevaron a cabo empleando el programa Autodock4.2 (AD4).[48] Se consideró el receptor rígido y un acoplamiento de tipo ciego (global) para explorar toda la superficie de la proteína y determinar los posibles sitios de interacción de los ligandos.

Se obtuvieron de la base de datos de Protein Data Bank[49] las estructuras co-cristalizadas de las proteínas ABL1 dominio cinasa de tipo silvestre (**4WA9**) y transformada **T315I** (**4TWP**) con el ligando de referencia Axitinib (**AXI**), con resoluciones de 2.2 y 2.4 Å respectivamente, ambas proteínas están formadas por dos cadenas polipeptídicas idénticas, se realizó una comparativa de las cadenas A y B, eligiendo la cadena B ya que es la que presenta menos segmentos ausentes de aminoácidos, posteriormente utilizando el programa PDBFixer,[50] se obtienen los estados de protonación a un pH de 7.4 y además se corrigen los errores de los receptores agregando los aminoácidos faltantes en las cadenas polipeptídicas.

Para el protocolo empleado se usó el programa AutoDockTools (ADT)[48] en donde, para los ligandos se identifican y se seleccionan los enlaces rotables y para las proteínas se adicionan los hidrógenos polares, cargas de Kollman y se asignan

el tipo de átomo AD4 ya que la preparación del receptor implica asegurar que sus átomos se ajusten a los tipos de átomos de Autodock4.2. Posteriormente se eligió como método de búsqueda el algoritmo genético Lamarckiano con un mallado de 126 X 126 X 126 y un espaciado de 0.375 Å.

De los acoplamientos obtenidos a través de Discovery Studio Visualizer se determinaron las interacciones más importantes de los ligandos con los residuos de aminoácidos de las proteínas y la energía libre de unión.

Para validar el protocolo de acoplamiento molecular empleados, se realizó el re-acoplamiento del ligando de referencia **AXI** con ambas proteínas **4WA9** y **4TWP**; las coordenadas de **AXI** del complejo de menor energía re-acoplado, se compara con las coordenadas de **AXI** de la estructura cristalina, llevando a cabo un cálculo de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés), entre los átomos pesados. Para realizar este cálculo se utilizó el programa PyMOL.[51]

11.2.3 Dinámica molecular (Molecular Dynamics, MD)

Los complejos proteína-ligando con la mejor energía libre de unión (ΔG) obtenidos del acoplamiento molecular ciego fueron seleccionados para la realización de las simulaciones de dinámica molecular utilizando el programa NAMD3[52] y así determinar su estabilidad a través del tiempo.

En primer lugar, los ligandos se parametrizaron en el módulo *Ligand Reader and Modeler*[53] del servidor CHARMM-GUI,[54] posteriormente los complejos fueron preparados utilizando el módulo *Solution Builder*,[55] se eligió una celda ortorrómbica periódica con un tamaño de 95 X 95 X 95 Å, solvatada con el modelo de agua TIP3P,[56] posteriormente, los complejos fueron neutralizados agregando contraiones y se simularon condiciones fisiológicas agregando 0.15 M de NaCl.

Todas las simulaciones fueron llevadas a cabo utilizando el campo de fuerza CHARMM36[57] y el método PME (Particle Mesh Ewald)[58] para modelar las interacciones de largo alcance con un radio de corte de 12 Å para las interacciones no enlazantes y una temperatura de 310 K.

Las simulaciones de MD se llevaron a cabo en cuatro etapas: **1)** se realizó un cálculo de minimización de energía para relajar los sistemas y evitar los contactos desfavorables, utilizando el algoritmo de gradiente conjugado[59]

durante 100,000 pasos de iteración. 2) Los sistemas fueron sometidos a calentamiento durante 500 μs , desde 0 a 310 K a intervalos de 1 K, posteriormente se mantuvieron a 310 K durante 500 μs , se utilizó el ensamble NVT empleando el modelo dinámico de Langevin.[60] 3) Se realizó un equilibrado de los sistemas durante 5 ns con un tiempo de paso de 1 fs , empleando un ensamble NPT considerando 310 K de temperatura y 1.013 bar de presión constantes, empleando el pistón de Langevin método Nosé-Hoover para los modelos de termostato y baróstato.[61, 62] 4) Finalmente, las simulaciones de producción fueron llevadas a cabo durante un periodo de 200 ns con las mismas condiciones de temperatura y presión y un tiempo de paso de integración de 2 fs .

Una vez obtenidas las simulaciones de dinámica molecular se analizaron las trayectorias y se calcularon las RMSD, RMSF y los puentes de hidrógeno formados durante los últimos 100 ns de producción, empleando el programa VMD.[63]

11.2.4 Cálculo de energía libre de unión y análisis de descomposición de energía por residuo.

Los resultados finales de energía libre de unión y el análisis de descomposición de energía por residuo de aminoácidos fue obtenida del promedio de la exploración de 500 snapshots (geometrías) de los últimos 100 ns de la etapa de producción de dinámica molecular.

Las energías libres de unión de los ligandos acoplados a las proteínas fueron calculadas empleando el método de punto final MM/PBSA (*Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area*).[64] Para el cálculo de la energía no polar de solvatación y el área de la superficie accesible al solvente se utilizó el plugin CaFe[65] de VMD. Por otra parte, para el cálculo de la energía polar de solvatación se utilizó el programa APBS,[66] con valores de 1 y 80 para las constantes dieléctricas interna y externa respectivamente. La parte entrópica es despreciada debido al alto costo computacional y que no es del todo confiable.

Finalmente, para el análisis de descomposición de energía por residuo se empleó la herramienta gmx_MMPBSA[67] del programa GROMACS,[68] considerando un punto de corte de 5 Å alrededor de la posición de los ligandos de cada complejo que permite identificar los residuos que tienen mayor contribución energética durante la unión proteína-ligando.

11.2.5 Perfil de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET)

Los ligandos propuestos se exportaron en formato SMILE para utilizarlos como entrada para el servidor web ADMETlab2.0[43] (<https://admetmesh.scbdd.com>) en donde se emplean protocolos computacionales sistemáticos basados en el marco MGA (Multi-task Graph Attention) que permiten determinar las propiedades fisicoquímicas de los compuestos así como su perfil de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad.

Capítulo III

Resultados

III.1 Acoplamiento molecular

III.1.1 Validación del protocolo de acoplamiento molecular.

Para el desarrollo de este proyecto, se realizó en primera instancia un acoplamiento molecular de nueve derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y el ligando de referencia **AXI** frente a tirosina cinasas BCR-ABL1 de tipo silvestre (**4WA9**) con conformación DFG-out y de tipo transformada **T315I** (**4TWP**) con conformación DFG-in.

Por una parte, para la validación del protocolo de acoplamiento molecular descrito en la sección anterior, se realizó el re-acoplamiento del ligando de referencia **AXI** para compararlo con la pose obtenida del cristal realizando un cálculo de RMSD, como se observa en la **Figura 4** se obtuvieron valores de RMSD de 0.956 y 0.410 Å para la proteína silvestre (**a**) y transformada **T315I** (**b**) respectivamente. Estos resultados se consideran satisfactorios ya que el valor de RMSD es < 2.0 Å.[69] ya que el protocolo empleado ha sido capaz de reproducir de buena manera la pose experimental.

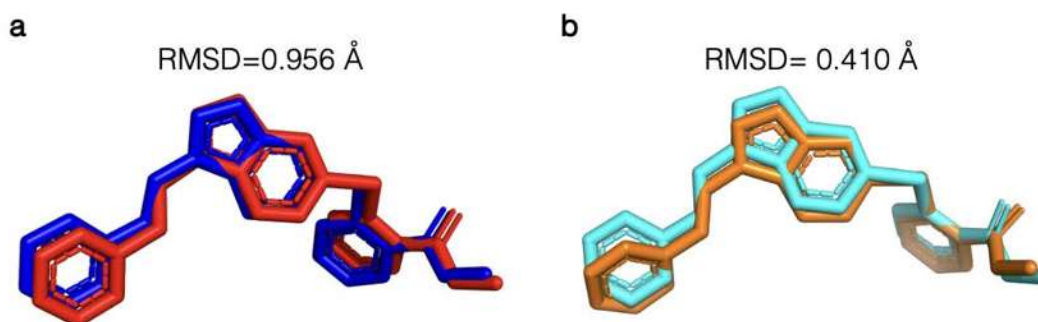


Figura 4. Representación de las poses de **AXI** en el cálculo de RMSD. **a**) la referencia experimental se muestra en color rojo y la calculada en azul para la proteína silvestre y **b**) la referencia experimental se muestra en color cian y la calculada en color naranja para la proteína transformada **T315I**.

III. 1.2 Análisis de la energía libre de unión y de la constante de inhibición (K_i)

Una vez validado el protocolo se realizaron los acoplamientos de los nueve ligandos derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol, obteniéndose las energías de unión y las constantes de inhibición (K_i) de las poses mejores puntuadas para cada ligando, cabe señalar que K_i es un parámetro importante para medir la capacidad de inhibición de los ligandos y entre más pequeña sea esta, dicha capacidad es mayor. Para visualizar el comportamiento general de K_i , se realizó el cálculo el pK_i a partir de la formula:

$$pK_i = -\log_{10}(K_i) \quad (3)$$

En la **Tabla 1** se muestran de forma resumida los valores de la pose de mejor energía de unión de cada uno de los ligandos. Se observa que los ligandos **2** y **3** presentan la mejor energía libre de unión (ΔG) con -10.84 y -10.49 kcal/mol respectivamente para la proteína silvestre, con una K_i de 11.34 nM para **2** y 20.44 nM para **3**. En el caso de la proteína transformada **T315I** se observa que de manera similar los ligandos **2** y **3** presentan los mejores ΔG de unión con -11.03 y -10.13 kcal/mol respectivamente con una K_i de 8.28 nM para **2** y 37.85 nM para **3**. Es importante mencionar que el resto de los ligandos presentan ΔG de unión aceptables y muy cercanas entre sí en ambas proteínas. La tendencia de los ΔG de unión para la proteína silvestre es **2 < 3 < 7 < 1 < 4 < 6 < 5 < 8 < 9**, mientras que para la proteína transformada T315I es **2 < 3 < 6 < 4 < 7 < 1 < 5 < 9 < 8**.

Para el caso del ligando de referencia **AXI** los valores calculados de ΔG de unión son de -11.8 kcal/mol y una K_i de 2.24 nM para la proteína silvestre, mientras que los valores de ΔG de unión y K_i para la proteína transformada **T315I** son de -11.9 kcal/mol y 1.91 nM respectivamente, los valores experimentales reportados para AXI son una K_i de 3.8 nM y un ΔG de unión de -11.49 kcal/mol para la proteína silvestre, mientras que para la transformada **T315I** una K_i de 0.1 nM y un ΔG de unión de -13.64 kcal/mol.

Tabla 1. Resultados de energía libre de unión (ΔG), K_i y pK_i de los complejos de derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y tirosina cinasas BCR-ABL1 de tipo silvestre y transformada T315I.

Ligando	Silvestre			Transformada T315I		
	ΔG (kcal/mol)	K_i (nM)	pK_i	ΔG (kcal/mol)	K_i (nM)	pK_i
AXI _{EXP}	-11.49	3.80	8.42	-13.64	0.10	10.0
AXI _{CALC}	-11.80	2.24	8.65	-11.90	1.91	8.72
1	-9.90	55.60	7.25	-9.34	141.50	6.85
2	-10.84	11.34	7.95	-11.03	8.28	8.08
3	-10.49	20.44	7.69	-10.13	37.85	7.42
4	-9.85	60.09	7.22	-9.56	98.50	7.01
5	-8.81	347.24	6.46	-8.90	301.47	6.52
6	-9.44	120.55	6.92	-9.78	67.26	7.17
7	-9.92	53.23	7.27	-9.54	102.12	6.99
8	-8.68	435.32	6.36	-7.69	2310.00	5.64
9	-8.36	740.50	6.13	-8.26	884.85	6.05

Para favorecer la visualización los valores obtenidos del acoplamiento molecular, en la **Figura 5**, se representan en forma gráfica el ΔG de unión y el pK_i .

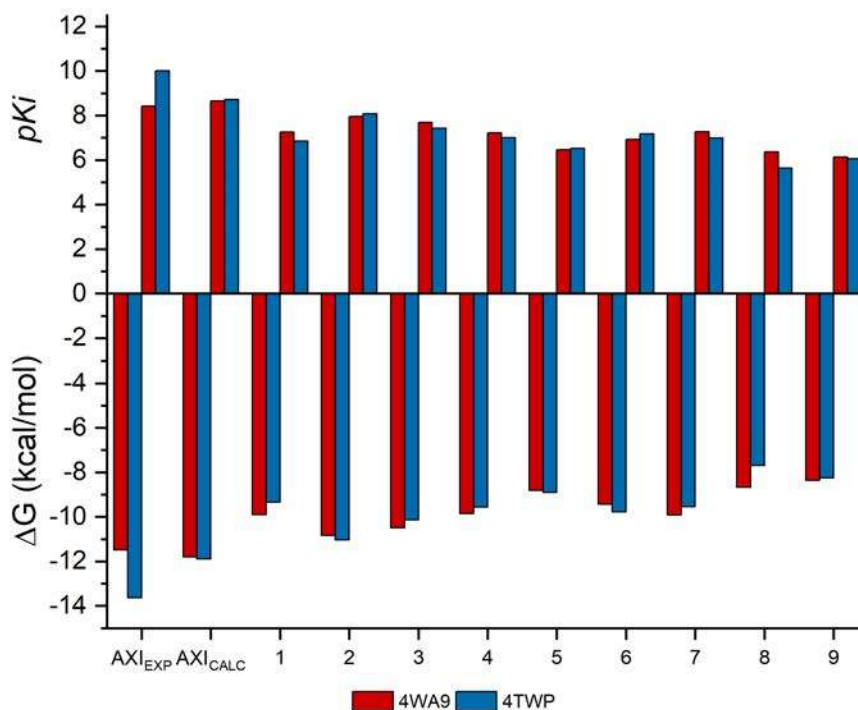


Figura 5. Energía libre de unión (ΔG) y pK_i de los complejos de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y la proteína silvestre (4WA9) en color rojo y transformada T315I (4TWP) en color azul.

Los resultados de K_i de los ligandos propuestos comparados con los reportados para el ligando de referencia AXI[24] son menores, sin embargo, se encuentran en el orden nM que son considerados como buenos inhibidores, por lo tanto, los resultados obtenidos preliminarmente son prometedores, además de que se puede observar que tanto para la proteína silvestre y transformada T315I el ΔG de unión de los ligandos es muy cercana y podríamos decir que su afinidad es similar en ambas proteínas.

III. 1.3 Interacciones de los complejos proteína-ligando.

En base al análisis de los resultados los ligandos realizó una comparativa de las poses obtenidas contra AXI obtenido de la estructura cristalográfica para ambas proteínas, se sabe que las proteínas tirosina cinasas poseen una región de activación, la cual es importante para regular la actividad de la cinasa, este se forma por residuos DFG (ASP, PHE, GLY) y residuos APE (ALA, PHE, GLU), la región DFG puede adoptar dos conformaciones, DFG-in asociada a la “forma activa” de la proteína, en la cual el ASP está orientado hacia el interior del sitio activo lo que le permite coordinar iones magnesio indispensables para la hidrólisis del ATP y DFG-out asociada a la “forma inactiva” de la proteína con el ASP orientado hacia fuera del sitio activo por lo que los iones magnesio no pueden coordinarse dentro del sitio activo.

En la **Figura 6** se observa la pose de los nueve ligandos propuestos y se resaltan los residuos de aminoácidos que forman parte de la región DFG (ASP381, PHE382 y GLY383) en la cual se observa claramente las conformaciones DFG-in y DFG-out, al igual que los residuos THR315 de la proteína silvestre e ILE315 de la proteína transformada, este último involucrado en la resistencia de la mayoría de los fármacos aprobados para el tratamiento de LMC. Se observó que los nueve ligandos se acoplan de una manera muy similar a la presentada por el ligando de referencia AXI en el sitio de unión del ATP para ambas enzimas, lo cual es prometedor ya que la mutación T315I parece no afectar al modo de unión de los ligandos propuestos.

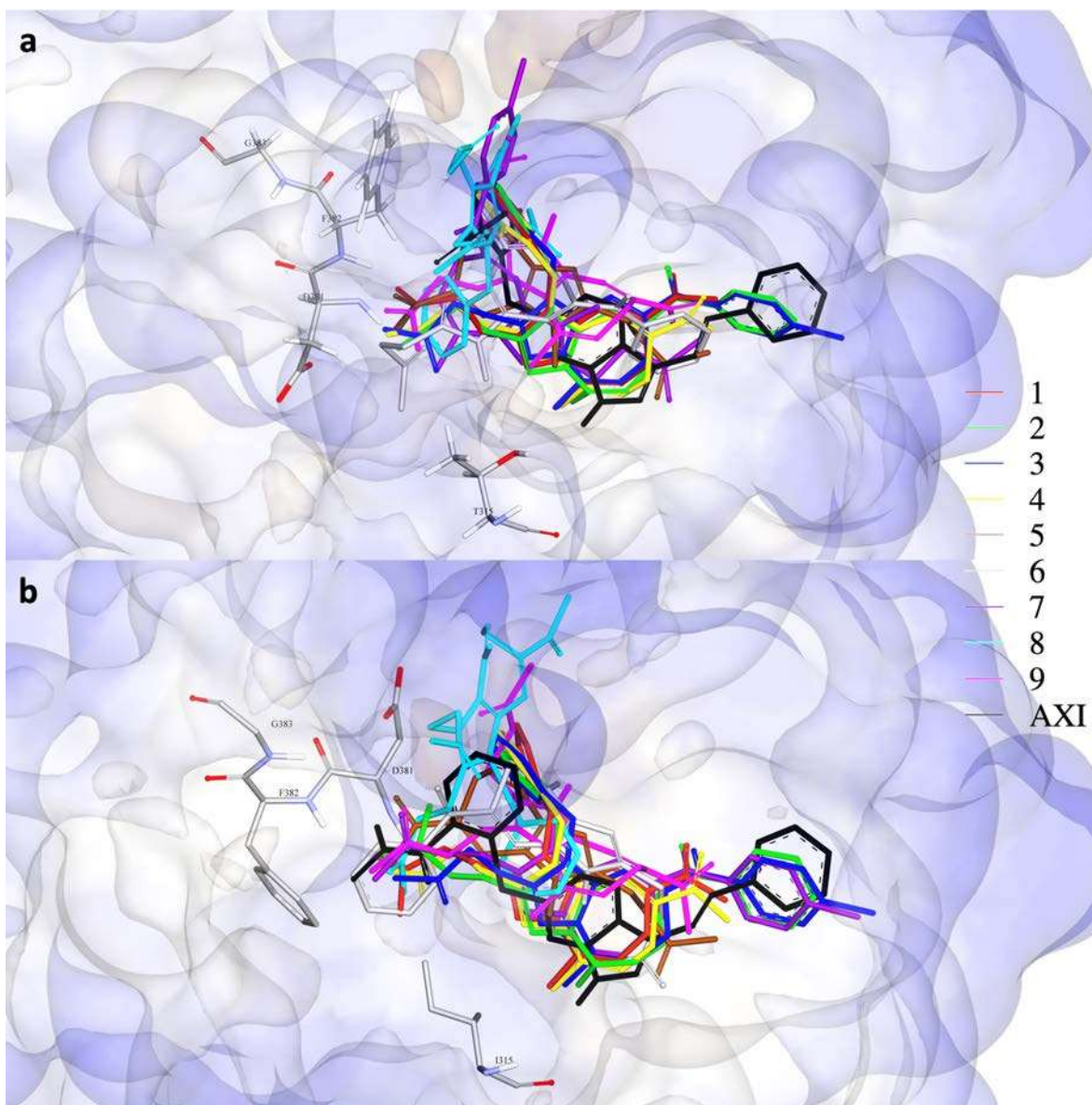


Figura 6. Modo de unión de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol con mejor ΔG . **a)** proteína silvestre en conformación DFG-out y la presencia del residuo de aminoácido THR315. **b)** proteína transformada, conformación DFG-in y la presencia del residuo de aminoácido ILE15.

Los ΔG de unión obtenidos anteriormente para los ligandos se correlacionan directamente con las interacciones que se encuentran presentes en los complejos proteína-ligando, en la **Figura 7** se observan para el caso de **AXI** cuatro interacciones por puente de hidrógeno con los residuos TYR253, LYS271, GLU316, MET318 y varias interacciones hidrofóbicas de las cuales una es con PHE382 de

la región DFG de la proteína silvestre, para el caso de la proteína transformada **T315I** presenta cinco interacciones por puente de hidrógeno, dos de ellas con el residuo TYR253, y una con los residuos LYS271, GLU316, MET318 y varias interacciones de tipo hidrofóbico. Podemos observar que las interacciones que se identificaron del acoplamiento molecular, corresponden a las reportadas experimentalmente.

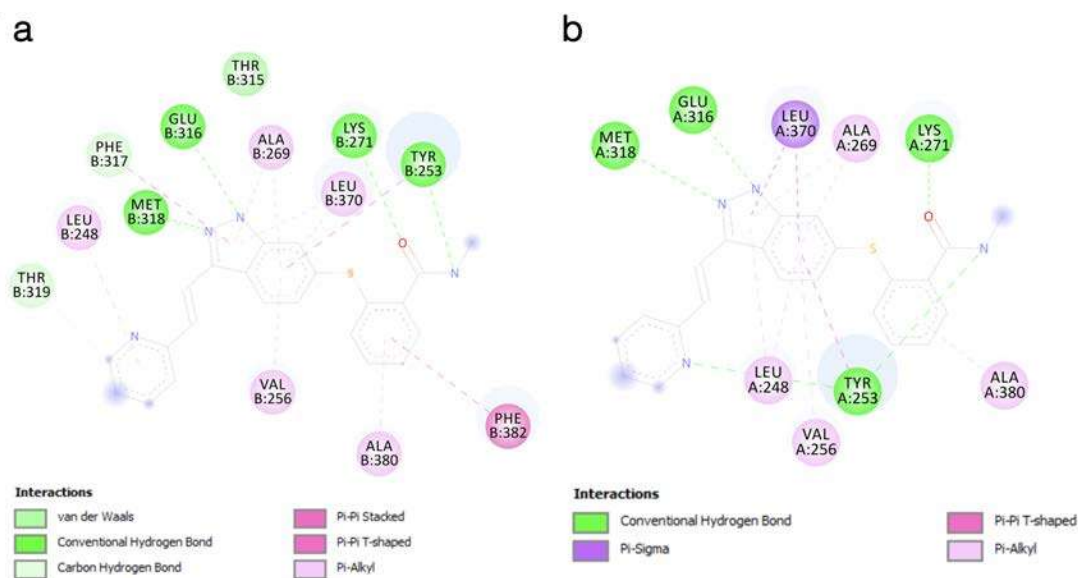


Figura 7. Mapa de interacciones de AXI con a) proteína silvestre y b) proteína transformada T315I.

En la **Figura 8** se muestran las interacciones que presentan los nueve ligandos propuestos con la proteína silvestre, en donde observamos que **1** muestra dos interacciones por puente de hidrógeno con los residuos TYR253 y LYS271, **2** presenta dos interacciones por puente de hidrógeno con TYR253 y ASP381 de la región DFG y varias interacciones hidrofóbicas de las que destaca una con PHE382 de la región DFG, **3** muestra dos interacciones por puente de hidrógeno con TYR253 y ASP381 de la región DFG y diversas interacciones hidrofóbicas, **4** presenta una interacción por puente de hidrógeno con ASP381 de la región DFG y una interacción de tipo halógeno con TYR253, además de las interacciones hidrofóbicas, para **5** dos interacciones por puente de hidrógeno con LYS271, MET318 y algunas interacciones hidrofóbicas, **6** una interacción por puente de hidrógeno con ASP381 DFG y varias hidrofóbicas destacando una con PHE382 DFG, **7** posee dos interacciones por puente de hidrógeno con TYR253, LYS271 y varias de tipo hidrofóbico, el ligando **8** muestra una interacción por puente de

hidrógeno con el residuo GLU255, una tipo puente de hidrógeno no convencional con GLY251 y algunas hidrofóbicas, principalmente una con PHE382 DFG, en este caso se presenta también una interacción no favorable con TYR253 y puede ser debido a que la proteína es considerada rígida en este acoplamiento, finalmente **9** presenta una interacción por puente de hidrógeno con LYS271 y varias de tipo hidrofóbico.

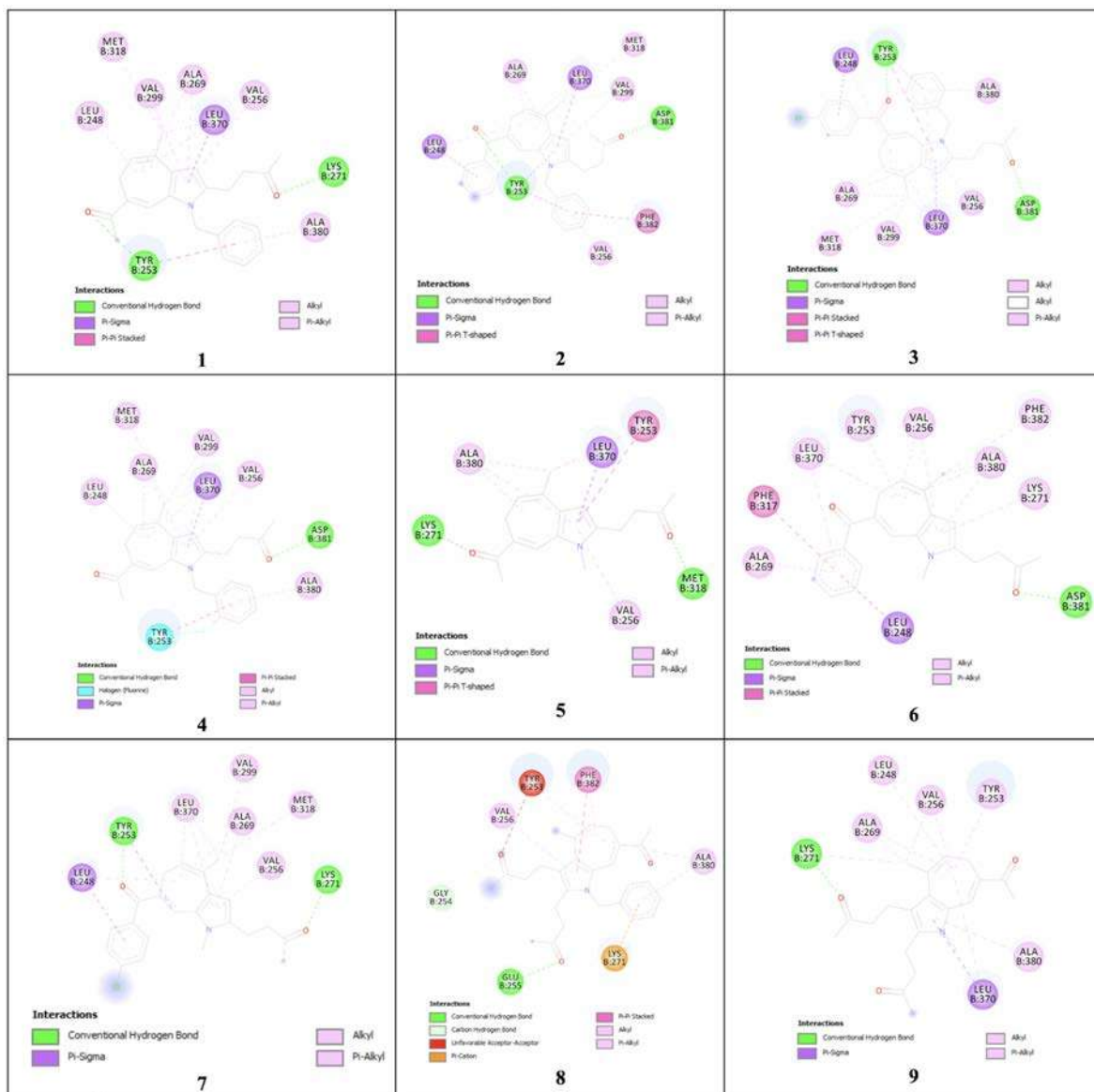


Figura 8. Mapa de interacciones de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol en complejo con tirosina cinasa BCR-ABL1 silvestre.

Para el caso de la proteína transformada **T315I**, se puede observar en la **Figura 9** las interacciones que presentan los nueve ligandos con esta proteína, en primera instancia observamos que **1** forma un puente de hidrógeno con el residuo PHE382 DFG, una interacción tipo puente de hidrógeno no convencional con GLY321 y varias de tipo hidrofóbico destacando una con ILE315, **2** presenta varias interacciones de tipo hidrofóbico, entre ellas una con ILE315 y ninguna por puente de hidrógeno; **3** muestra varias interacciones hidrofóbicas de las cuales es importante mencionar las formadas con ILE315 y ASP381 de la región DFG y ninguna por puente de hidrógeno, **4** presenta solo interacciones hidrofóbicas de las cuales una se forma con ILE315, **5** forma dos interacciones por puente de hidrógeno con LYS271, MET318 y además presenta una interacción desfavorable con ASP381 DFG y algunas de tipo hidrofóbico, **6** forma dos interacciones por puente de hidrógeno con LYS271 y MET318, y dentro de las hidrofóbicas se destaca una con ILE315, para el ligando **7** se presenta una interacción por puente de hidrógeno con LYS271 y se destaca una hidrofóbica con ILE315, **8** muestra una tipo puente de hidrógeno con LYS271, una de tipo electrostático con ASP381 de la región DFG, una interacción no favorable con GLU286 y algunas de tipo hidrofóbico. Finalmente, el ligando **9** forma una interacción por puente de hidrógeno con LYS271, dos de tipo puente de hidrógeno no convencional con GLY321 y ARG267, y dentro de las hidrofóbicas se destaca una con ILE315.

Es importante mencionar que la mayoría de ligandos propuestos forman considerables interacciones de tipo hidrofóbico con ambas proteínas. Principalmente para la proteína transformada **T315I** en donde los ligandos **2**, **3** y **4** no forman ningún puente de hidrógeno indicando que su afinidad a la proteína es gobernada enteramente por las interacciones de tipo hidrofóbico. Además, de forma general los ligandos forman puentes de hidrógeno con TYR253, LYS271, MET318 y ASP381 para la proteína silvestre, mientras que para la proteína transformada **T315I** forman puente de hidrogeno preferentemente con LYS271, MET318 y PHE382. Estos resultados son significativos porque estos residuos de aminoácidos forman parte del loop G, el aminoácido lisina que es conservada, la región de bisagra y DFG, que desempeñan un papel importante en la unión de ATP; por tanto, inhibirlos podría impedir la transferencia de grupos fosfato. [\[70, 71\]](#)

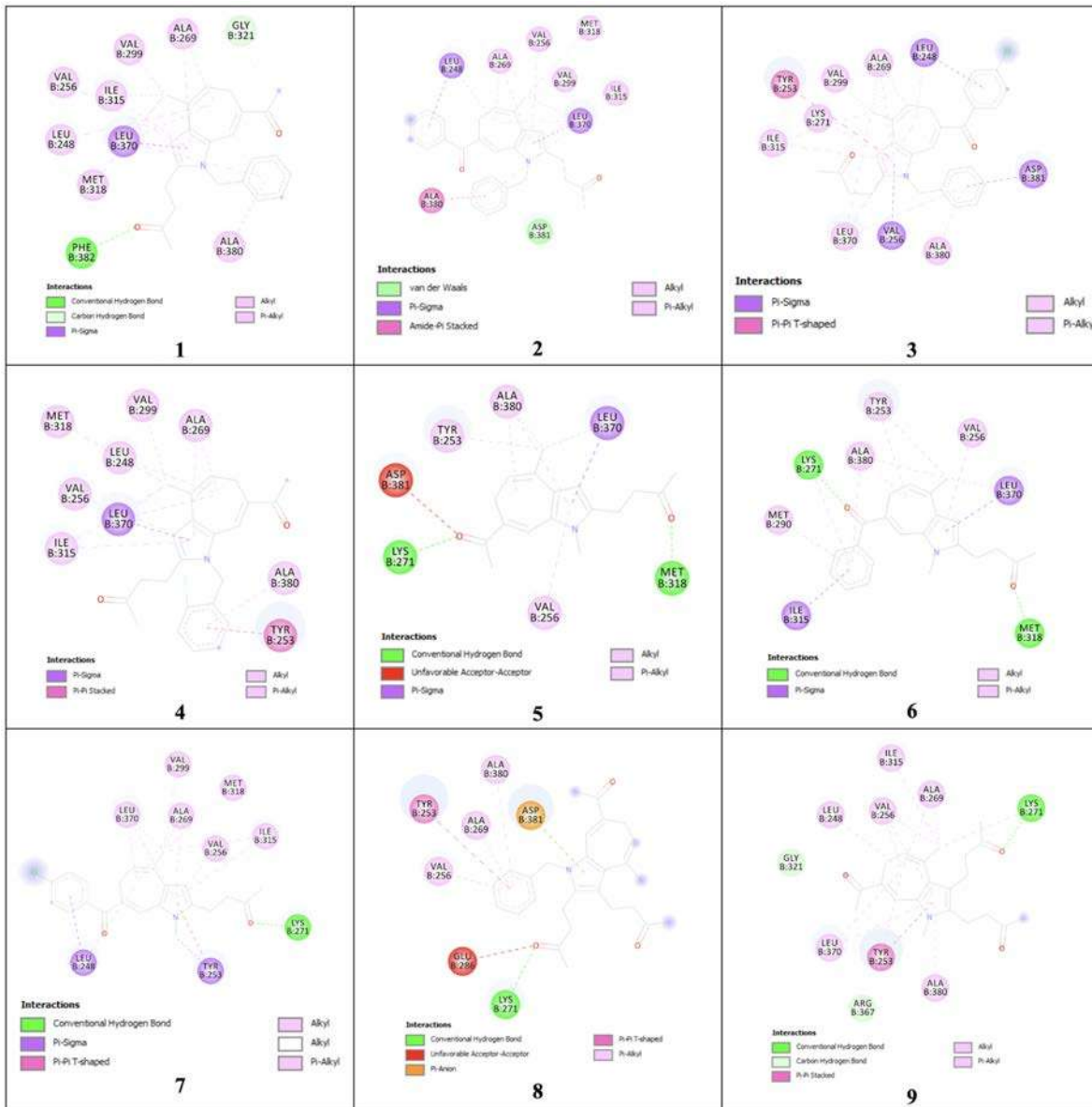


Figura 9. Mapa de interacciones de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol en complejo con tirosina cinasa BCR-ABL1 transformada T315I.

III.2. Dinámica molecular.

III.2.1 Análisis de la estabilidad de los complejos proteína-ligando.

Una vez que se encontró que el sitio de unión del ATP fue el de mayor afinidad para los ligandos y se observó que interactuaban favorablemente con residuos de aminoácidos clave de la proteína silvestre y transformada T315I, se

realizaron simulaciones de dinámica molecular por un periodo de 200 *ns*, con la finalidad de determinar la estabilidad de los complejos proteína-ligando y observar si durante este periodo de tiempo los ligandos permanecen estables dentro del sitio de unión o difunden. A partir de estas simulaciones, la estabilidad de los complejos proteína-ligando se determinó calculando la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) del esqueleto principal de las proteínas y de los ligandos con respecto a la proteína.

En la **Figura 10**, se observa la RMSD del carbono alfa (C_{α}) de la proteína silvestre en complejo con cada uno de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y el ligando de referencia **AXI**, de manera general se observa que la proteína no es perturbada de manera sustancial por los ligandos, por lo que no presentó fluctuaciones significativas, mostrando valores promedio de RMSD por debajo de 3 Å como se muestra en la **Tabla 2**.

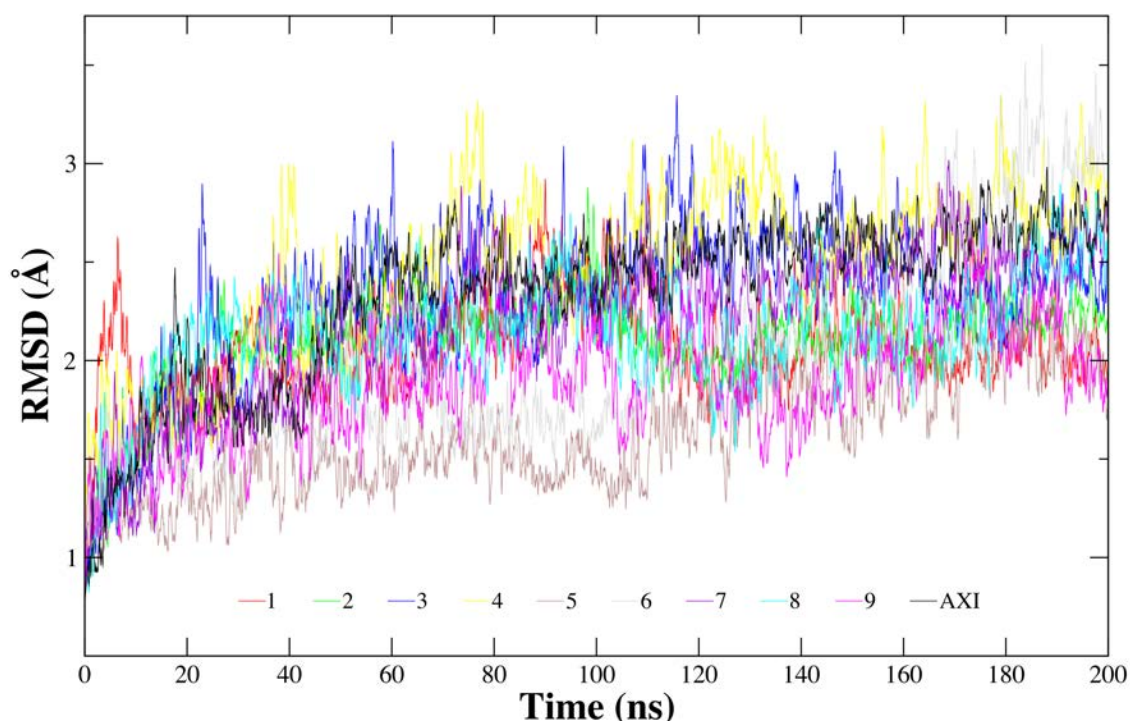


Figura 10. RMSD del C_{α} de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre en complejo con los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y el ligando de referencia AXI.

Se observa que la proteína silvestre en complejo con el ligando de referencia **AXI** presenta un valor promedio de RMSD de 2.33 Å. Y en complejo con los ligandos **3**, **4** y **6** presenta las mayores fluctuaciones con valores promedio de

RMSD de 2.32, 2.46 y 2.00 Å respectivamente. Los valores promedio aceptables son considerados inferiores a 3 Å.

Tabla 2. RMSD promedio y máxima de las fluctuaciones del Ca de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre en complejo con los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol y el ligando de referencia AXI. RMSD promedio y máxima de las fluctuaciones de los ligandos con respecto a la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre

Ligando	Ca		Lig fit prot	
	Ȳ (Å)	MAX(A)	Ȳ(A)	MAX(A)
AXI	2.33	3.11	1.53	4.33
1	2.07	3.08	1.97	6.11
2	2.09	3.01	6.36	10.52
3	2.32	3.47	2.92	7.03
4	2.46	3.50	3.38	5.79
5	1.63	2.87	6.39	11.41
6	2.00	3.71	3.51	5.54
7	2.20	3.16	2.91	5.18
8	2.13	3.05	2.30	5.89
9	1.91	2.87	4.92	8.45

Por otra parte, las **Figuras 11** y **12** muestran la estabilidad de los ligandos en el sitio de activo de la proteína, según los valores promedio de RMSD durante los 200 *ns* de simulación, el valor más bajo de los ligandos propuestos lo presenta **1** con 1,97 Å y la tendencia de estabilidad para los ligandos en la proteína de tipo silvestre es: **AXI > 1 > 8 > 7 > 3 > 4 > 6 > 9 > 2 > 5** como se puede observar en la **Tabla 2**. En la **Figura 11** se muestran los ligandos que presentan las menores fluctuaciones con valores promedio de RMSD inferiores a 3.5 Å. En particular, los ligandos **2**, **5** y **9** mostraron las mayores fluctuaciones observadas durante el tiempo de simulación como podemos ver en la **Figura 12**. Analizando las trayectorias de los complejos proteína-ligando, se observa que en aproximadamente 40 *ns*, estas fluctuaciones son causadas por un reacomodo de la pose inicial de los ligandos. Este aumento de RMSD se debe a que la conformación inicial de dichos ligandos es con respecto a los resultados del acoplamiento molecular, de tal manera que los ligandos estaban unidos en la misma posición que lo hace **AXI** (como se muestra en la **Figura 6**). Sin embargo, este reacomodo no propicia que difundan del sitio de unión de ATP, como se observa en la **Figura 13**.

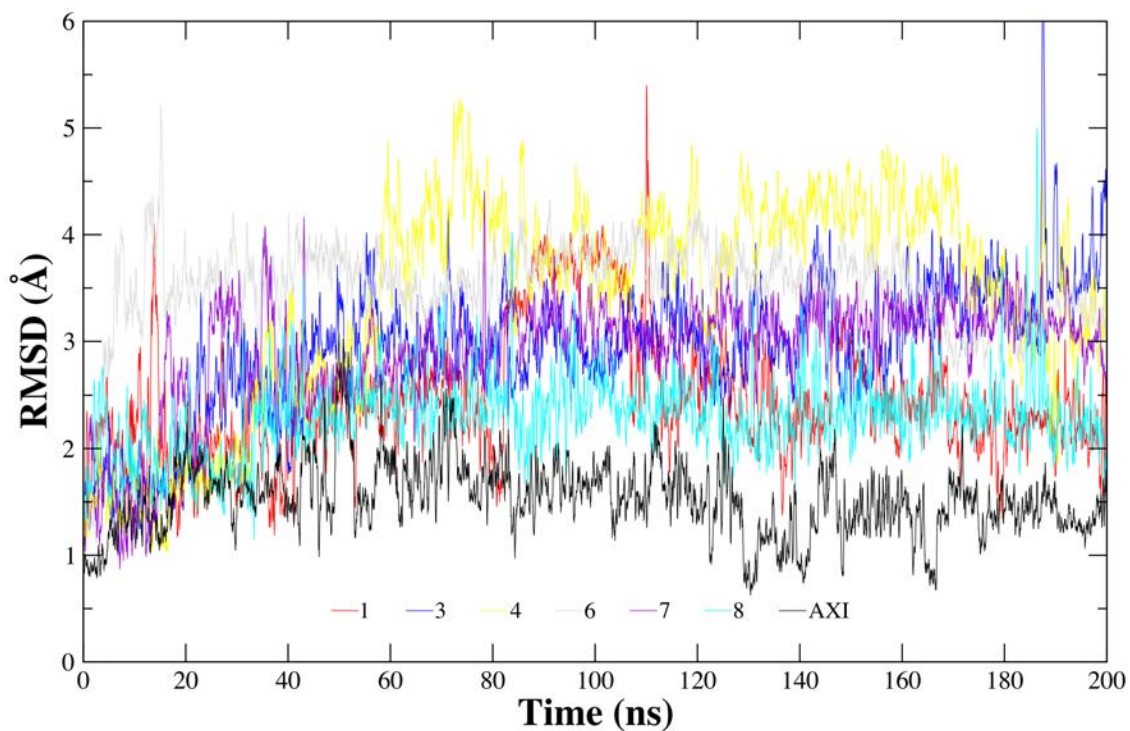


Figura 11. RMSD < 3.5 Å de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol con respecto a la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre.

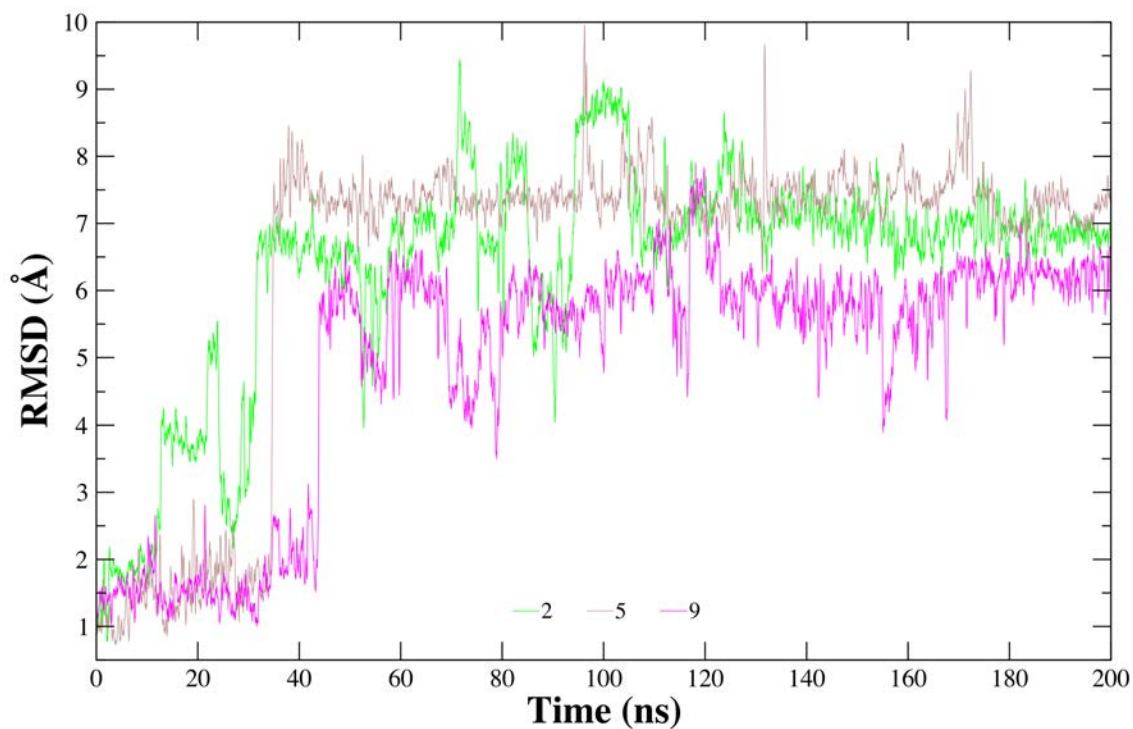


Figura 12. RMSD > 4.0 Å de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol con respecto a la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre.

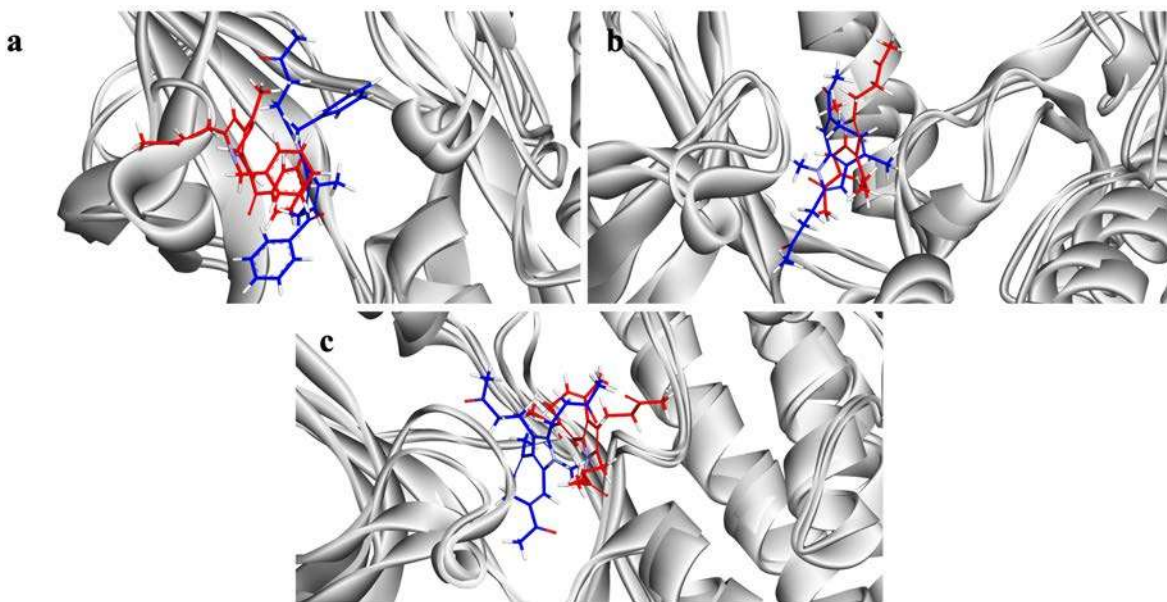


Figura 13. Superposición de a) 2, b) 5 y c) 9 en complejo con la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre. En color azul se presenta la pose inicial y en color rojo la pose final después de 200 *ns*.

Para el caso de la proteína transformada **T315I**, podemos observar en la **Figura 14** el comportamiento de la RMSD del Ca en los complejos con los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y **AXI**, los valores de RMSD se estabilizan de igual manera alrededor de 3 Å como se observa en la **Tabla 3**. Similarmente a la proteína silvestre, no se observan fluctuaciones significativas durante los 200 *ns* de simulación, lo que indica que la proteína es estable frente a los ligandos estudiados.

Se puede observar que la proteína transformada **T315I** en complejo con el ligando de referencia **AXI** muestra un valor promedio de RMSD de 1.78 Å. Está proteína en complejo con los ligandos **3** y **7** presenta las mayores fluctuaciones, con valores promedio de RMSD de 2.33 y 2.24 Å respectivamente, encontrándose todos los resultados dentro de los valores aceptables. En general se puede notar que la proteína transformada es ligeramente más estable que la proteína silvestre ya que los valores de RMSD presentados son menores.

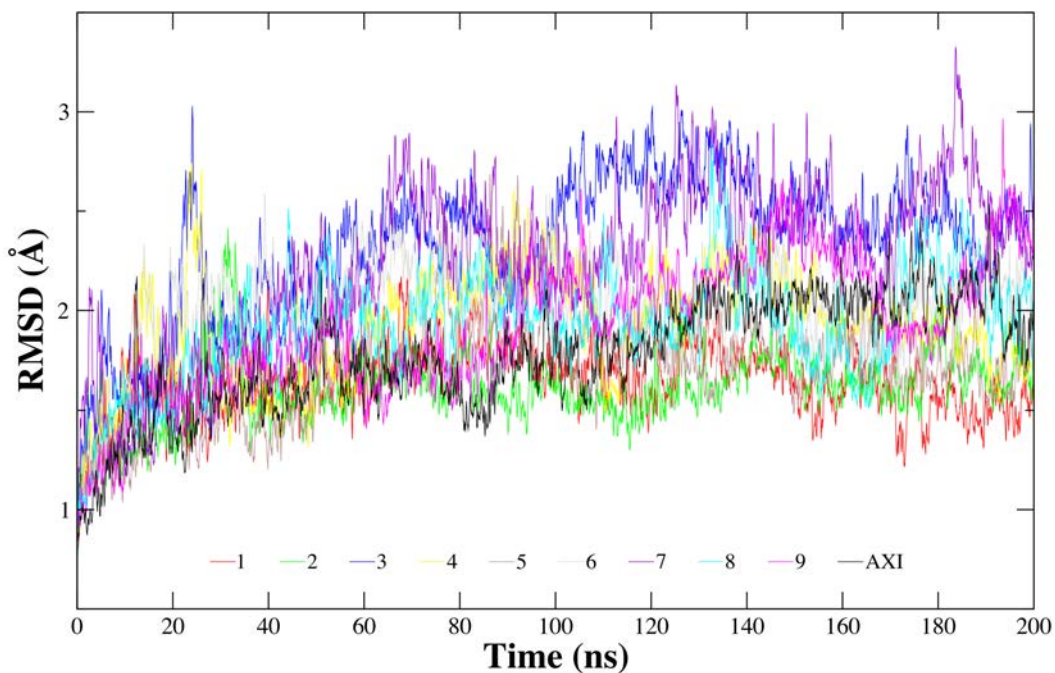


Figura 14. RMSD del Ca de la proteína cinasa BCR-ABL1 transformada T315I en complejo con los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol y el ligando de referencia AXI

Tabla 3. RMSD promedio y máxima de las fluctuaciones del Ca de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre en complejo con los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol y el ligando de referencia AXI. RMSD promedio y máxima de las fluctuaciones de los ligandos con respecto a la proteína cinasa BCR-ABL1 transformada T315I

Ligando	Ca		Lig fit prot	
	$\bar{Y}(A)$	MAX(A)	$\bar{Y}(A)$	MAX(A)
AXI	1.78	2.75	1.21	2.38
1	1.64	2.34	1.17	4.49
2	1.61	2.61	1.64	3.03
3	2.33	3.17	2.92	6.07
4	1.91	2.95	3.09	4.28
5	1.71	2.94	1.14	3.44
6	2.03	2.72	2.19	3.46
7	2.24	3.40	3.71	7.92
8	1.92	3.05	6.51	10.92
9	1.92	3.10	1.67	3.99

Por otro lado, las **Figuras 15 y 16** se ilustra la estabilidad de los ligandos en el sitio activo de la proteína transformada **T315I** a lo largo de las simulaciones, encontrando que el ligando **5** tiene un valor menor (1.14 \AA) de RMSD que el ligando de referencia **AXI** (1.21 \AA) y siguiendo la tendencia de estabilidad: $5 > 1 > \text{AXI} > 2 > 9 > 6 > 3 > 4 > 7 > 8$ como se muestra en la **Tabla 3**. En la **Figura 15** se pueden observar los ligandos que presentan valores promedio de RMSD inferiores a 3 \AA , entre ellos, **3** y **9** son los ligandos que presentaron las mayores fluctuaciones, estabilizándose en el sitio de unión después de 100 ns .

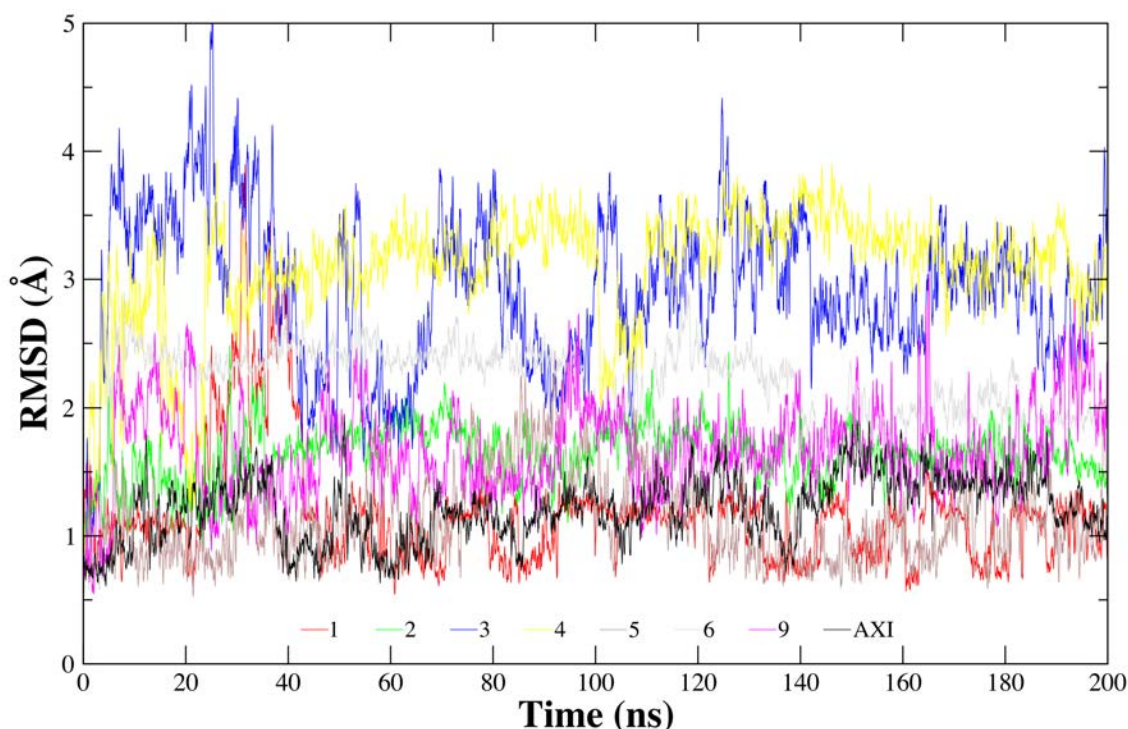


Figura 15. RMSD $< 3.0 \text{ \AA}$ de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol con respecto a la proteína cinasa BCR-ABL1 transformada **T315I**.

Por otro lado, observamos en la **Figura 16** los ligandos **7** y **8** con valores RMSD promedio de $3,75$ y $6,50 \text{ \AA}$ respectivamente, al analizar sus trayectorias se observó que el incremento de su RMSD se debe a que dichos ligandos experimentan un reacomodo en su pose de unión con respecto a la pose inicial de acoplamiento como se muestra en la **Figura 17**. Vale la pena mencionar que **7** y **8** no difunden del sitio de unión de ATP.

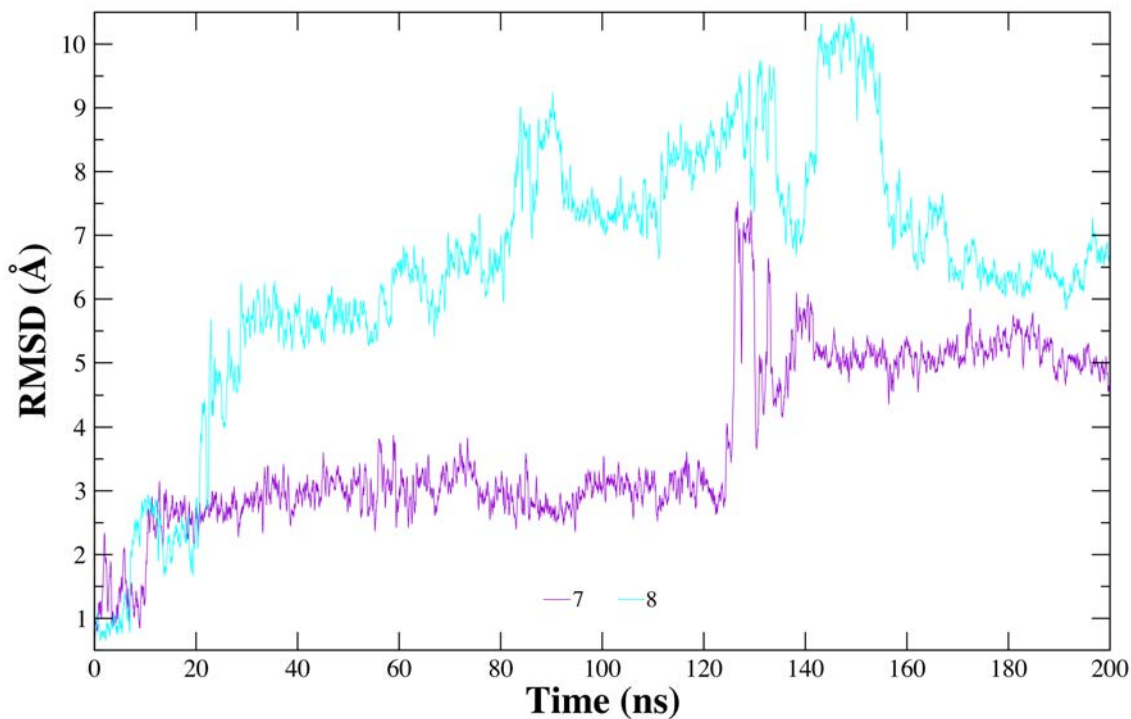


Figura 16. RMSD > 3.5 Å de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol con respecto a la proteína cinasa BCR-ABL1 transformada T315I.

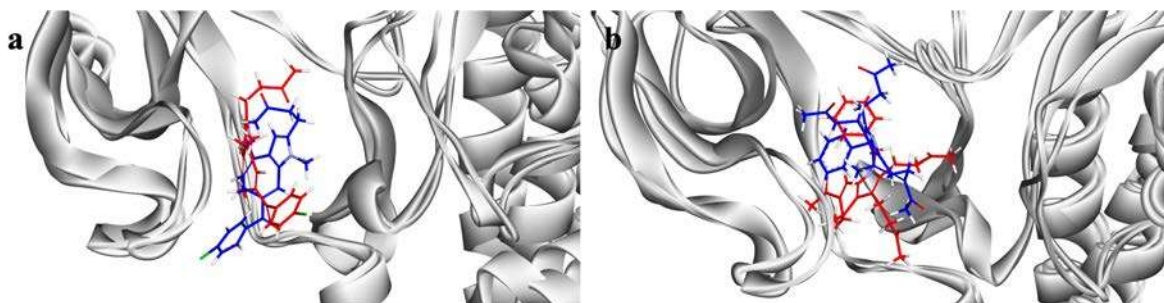


Figura 17. Superposición de a) 7 y b) 8 en complejo con la proteína cinasa BCR-ABL1 transformada T315I. En color azul se presenta la pose inicial y en color rojo la pose final después de 200 ns

III.2.2 Análisis de puentes de hidrógeno.

Para este análisis se calculó el porcentaje de residencia de los puentes de hidrógeno formados en los últimos 100 ns, que se consideró la porción más estable de cada trayectoria obtenida a partir de simulaciones MD, para su determinación se aplicaron los criterios descritos por Jeffrey,^[72] para los cálculos se tomaron en

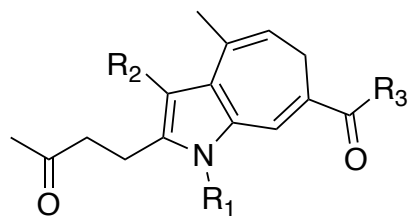
cuenta únicamente los puentes de hidrógeno considerados moderados a fuertes, cuyos parámetros geométricos son ángulos de 130°- 180° y distancias donante-aceptor de 2,5 - 3,2 Å, en aras de la simplicidad, solo se discutirán los puentes de hidrógeno con ocupaciones mayores que 8%.

Para visualizar los átomos de los ligandos que forman los puentes de hidrógeno con los residuos de aminoácidos, se esquematiza en la **Figura 18** el núcleo base 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y los sustituyentes. La numeración de los átomos de oxígeno se tomó la dada por default del visualizador utilizado, en donde O1 pertenece al sustituyente botan-2-ona del pirrol, O2 pertenece al sustituyente R₃ y O3 pertenece al sustituyente R₂.

En primer lugar, como se muestra en la **Tabla 4**, es importante señalar que los únicos ligandos que forman puentes de hidrógeno estables con la proteína de tipo salvaje son **4** y **6**, el 79% del tiempo forman un puente de hidrógeno con la cadena principal de MET318, además, **4** presenta un puente de hidrógeno adicional con GLY254 (18.96%). Vale la pena mencionar que MET318 es un residuo de aminoácido importante en la región bisagra para la unión de ATP y el reconocimiento del inhibidor **AXI**.

El ligando **2** carece de puentes de hidrógeno con residencias significativas. **1** formó un puente de hidrógeno con GLU255 (8.16%), **3** forma tres puentes de hidrógeno, uno con la cadena principal de TYR253 (36.02%) y dos con la cadena principal y lateral de ASN322 (22%), **5** presenta dos puentes de hidrógeno con la cadena principal de GLY249 (8.26%) Y MET318 (23.86%), **7** presenta dos puentes de hidrógeno con la cadena principal y lateral de ASN322 con 15.60 y 13.30% respectivamente, **8** presenta un puente de hidrógeno con la cadena lateral de ARG367 (27.82%) y finalmente **9** forma un puente de hidrógeno con la cadena lateral de ASN368 (22.44%). Los ligandos exhibieron interacciones de puente de hidrógeno con aminoácidos que son parte del loop G (GLY249, TYR253, GLY254 y GLU255), la región bisagra (MET318 y ASN322) y el loop A (ARG367 y ASN368).

Interesantemente, para la proteína transformada **T315I**, prácticamente todos los ligandos estudiados en este trabajo exhibieron mayores residencias de puentes de hidrógeno en comparativa con la proteína de tipo silvestre, con la excepción del ligando **3** que no formó puentes de hidrógeno con residencias significativas.



Sustituyentes

Ligando	R ₁	R ₂	R ₃
1		H	Me
2		H	
3		H	
4		H	Me
5	Me	H	Me
6	Me	H	
7	Me	H	
8			Me
9	Me		Me

Figura 18. Núcleo base 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y sus sustituyentes.

Se observo que el ligando **1** formó un puente de hidrógeno estable con la cadena principal de ASP381 (91,76%), **2** presenta un puente de hidrógeno con la cadena lateral de LYS271 (51,32%), **4** con la cadena lateral de ASP381 (78,72%), **5** forma dos puentes de hidrógeno con la cadena principal de MET318 (93,14%) y ASP381 (64,82%), **6** presenta dos puentes de hidrógeno con la cadena principal de MET318 (81,40%) y ASP381 (86,38%), **7** muestra dos puentes de hidrógeno con ASN322, uno con la cadena principal (76,90%) y otro con la cadena lateral (68,46%), **8** presenta tres puentes de hidrógeno, uno con la cadena principal de MET318 (69,28%) y dos con la cadena principal y lateral de ASN322 con 11.38 y 12.08 % de residencia respectivamente. Finalmente **9** presenta interacciones por puente de hidrógeno con la cadena lateral de LYS271 (21.56%), la cadena lateral de ASN322 (15.50%) y la cadena principal de ASP381 (8.10%) Como se indicó anteriormente, cada una de estas interacciones forman parte de loops esenciales para el reconocimiento del sustrato y la actividad catalítica de estas cinasas.

A diferencia de la literatura consultada, no observamos la formación de puentes de hidrógeno entre los ligandos estudiados y el residuo de aminoácido THR315. Por ejemplo, se ha determinado que la estabilidad de imatinib en esta cinasa depende de su interacción con THR315.[73] Además, Melge et al. demostró que cuando este aminoácido es mutado por ILE315, se puede perder la capacidad de formar esta interacción debido a la modificación en el sitio de unión, en concomitancia de que ILE315 es más voluminoso, lo que puede presentar un impedimento de tipo estérico para la unión de moléculas con posible actividad biológica.[23]

Los resultados obtenidos indican que esta mutación no tiene ningún efecto negativo sobre el modo de unión de los ligandos propuestos, ya que es muy similar en ambas proteínas. Es importante destacar que la proteína mutante **T315I** es resistente a la mayoría de los ITK aprobados.[74, 75] Por lo que los resultados presentados son muy prometedores en cuanto a la posible actividad inhibitoria que pueden presentar estos derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol.

Tabla 4. Porcentaje de residencia de los puentes de hidrógeno formados entre los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y las proteínas cinasas BCR-ABL1 silvestre y transformada T315I.

Lig.	Silvestre			Transformada T315I		
	Donador	Aceptor	%	Donador	Aceptor	%
AXI	-	-	-	GLY254-Main-N-H	O	58.76
	LYS271-Side-N-H	O	13.26	LYS271-Side-N-H	O	8.04
	MET318-Main-N-H	N3	28.98	MET318-Main-N-H	N3	54.24
	-	-	-	N1-H	GLN252-Main-O	34.02
	N2-H	GLU316-Main-O	63.88	N2-H	GLU316-Main-O	97.10
1	GLU255-Main-N-H	O1	8.16	-	-	-
	-	-	-	ASP381-Main-N-H	O1	91.76
2	-	-	-	LYS271-Side-N-H	O1	51.32
3	TYR253-Side-OH	O2	36.02	-	-	-
	ASN322-Main-N-H	O2	21.80	-	-	-
	ASN322-Side-N-H	O2	21.70	-	-	-
4	GLY254-Main-N-H	O1	18.96	-	-	-
	MET318-Main-N-H	O2	78.76	-	-	-
	-	-	-	ASP381-Main-N-H	O1	78.72
5	GLY249-Main-N-H	O1	8.26	-	-	-
	MET318-Main-N-H	O1	23.86	MET318-Main-N-H	O1	93.14
	-	-	-	ASP381-Main-N-H	O2	64.82
6	MET318-Main-N-H	O2	78.58	MET318-Main-N-H	O1	81.40
	-	-	-	ASP381-Main-N-H	O2	86.38
7	ASN322-Main-N-H	O1	15.60	ASN322-Main-N-H	O2	76.90
	ASN322-Side-N-H	O1	13.30	ASN322-Side-N-H	O2	68.46
8	-	-	-	MET318-Main-N-H	O2	69.28
	-	-	-	ASN322-Main-N-H	O3	11.38
	-	-	-	ASN322-Side-N-H	O3	12.08
	ARG367-Side-N-H	O3	27.82			
9	-	-	-	LYS271-Side-N-H	O3	21.56
	-	-	-	ASN322-Side-N-H	O2	15.50
	ASN368-Side-N-H	O2	22.44	-	-	-
	-	-	-	ASP381-Main-N-H	O1	8.10

III.2.3 Análisis de energía libre de unión (ΔG).

Una vez determinada la estabilidad de los complejos proteína-ligando y las interacciones que presentan los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol en las trayectorias en un periodo de tiempo, se realizó una estimación de la energía libre de unión ΔG para que en base de los resultados obtenidos poder determinar la afinidad que presentan los ligandos frente a ambas cinasas. Se empleo MM/PBSA como método para su determinación ya que es ampliamente utilizado, confiable y cuyo costo computacional no es tan demandante. Para el cálculo se analizaron 500 snapshots (geometrías) extraídas de los últimos 100 *ns* de las trayectorias (la parte más estable) para evaluar el ΔG ya que se ha reportado que es la cantidad suficiente de geometrías para una estimación promedio aceptable.

La energía libre de unión (ΔG) de los complejos entre la proteína silvestre y los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol, además, de las contribuciones de sus diversos componentes se presentan en la **Tabla 5**. Para este caso se observó que seis de los ligandos propuestos tienen energías libres de unión más bajas que el valor calculado para el ligando de referencia **AXI** (-10.59 kcal/mol), es importante mencionar que entre más bajo es el ΔG mayor es la estabilidad que presentara el complejo. El ligando **1** presenta un ΔG de -10.59 kcal/mol, **2** (-13.28 kcal/mol), **3** (-18.28 kcal/mol), **4** (-15.25 kcal/mol), **5** (-9.52 kcal/mol), **6** (-10.98 kcal/mol), **7** es el que presenta la mejor energía libre de unión con -18.31 kcal/mol, **8** (-13.80 kcal/mol) y finalmente **9** (-10.25 kcal/mol). La estabilidad energética exhibió la siguiente tendencia: **7** > **3** > **4** > **8** > **2** > **6** > **AXI** > **9** > **5** > **1**.

Por otra parte, para la proteína transformada **T315I**, se observa que siete de los ligandos propuestos tienen energías de unión más bajas que el valor calculado para **AXI** (-11.42 kcal/mol) como se muestra en la **Tabla 6**. Así, **1** muestra un ΔG de -12.92 kcal/mol, **2** (-18.77 kcal/mol), **3** (-14.30 kcal/mol), **4** (-11.87 kcal/mol), **5** (-9.52 kcal/mol), **6** (-16.92 kcal/mol), **7** (-19.82 kcal/mol), **8** (-15.44 kcal/mol) y **9** (-5.93 kcal/mol). La tendencia en la estabilidad energética calculada de los ligandos es: **7** > **2** > **6** > **8** > **3** > **1** > **4** > **AXI** > **5** > **9**. Por lo tanto, pensamos que estos ligandos podrían servir como inhibidores duales para las cinasas silvestre/transformada **T315I**.

Tabla 5. Energía libre de unión (ΔG) y contribución de sus componentes individuales en kcal/mol de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol en complejo con la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre.

Ligandos	ΔE_{elec}	ΔE_{vdw}	ΔE_{PB}	ΔE_{SA}	$\Delta G_{unión}$
AXI	-28.39	-44.98	68.52	-5.75	-10.59
1	-12.84	-38.75	48.03	-5.44	-9.01
2	-4.41	-32.03	27.79	-4.63	-13.28
3	-13.08	-42.55	43.17	-5.81	-18.28
4	-15.54	-44.05	50.23	-5.88	-15.25
5	-6.91	-28.23	29.72	-4.10	-9.52
6	-7.50	-43.03	45.12	-5.57	-10.98
7	-19.64	-38.68	45.78	-5.77	-18.31
8	-16.31	-36.16	43.48	-4.80	-13.80
9	-19.15	-31.04	44.63	-4.68	-10.25

Tabla 6. Energía libre de unión (ΔG) y sus componentes individuales en kcal/mol de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol en complejo con la proteína cinasa BCR-ABL1 transformada T315I.

Ligandos	ΔE_{elec}	ΔE_{vdw}	ΔE_{PB}	ΔE_{SA}	$\Delta G_{unión}$
AXI	-30.23	-47.43	71.73	-5.50	-11.42
1	-11.02	-45.88	49.58	-5.60	-12.92
2	-17.88	-50.52	55.85	-6.21	-18.77
3	-2.51	-51.34	45.81	-6.25	-14.30
4	-8.86	-43.30	45.96	-5.67	-11.87
5	-11.59	-39.26	45.01	-5.00	-10.85
6	-12.63	-49.73	51.11	-5.67	-16.92
7	-16.32	-38.69	40.39	-5.19	-19.82
8	-15.24	-40.35	46.10	-5.95	-15.44
9	-16.99	-32.75	49.10	-5.29	-5.93

Según los resultados obtenidos se puede notar que las energías libres de unión tienen una naturaleza mayormente hidrofóbica de acuerdo con la contribución de ΔE_{vdw} al $\Delta G_{\text{unión}}$ como podemos observar en las **Tablas 5 y 6**, esto puede ser debido a la presencia de anillos aromáticos en la estructura de los ligandos propuestos, lo que confiere la capacidad de formar interacciones vdW hidrofóbicas, por ejemplo, apilamiento π - π , π -alquilo, etc. Se sabe que estas interacciones juegan un papel clave en la estabilización de los inhibidores de las tirosina cinasas en las diferentes regiones del sitio catalítico, de acuerdo con otros ligandos que presentan estas interacciones.[76] De acuerdo con esto, los ligandos **5 y 9** no tienen anillos aromáticos como sustituyentes en sus estructuras unidos a su núcleo base. Pensamos que es por esta razón que presentan menor afinidad por ambas proteínas, mientras que el resto de ligandos con al menos un anillo aromático como sustituyente tienen mejores energías libres de unión y son más estables en sinergia con los enlaces de hidrógeno ya descritos.

III.2.4 Análisis de descomposición de energía por residuo de aminoácido.

Para analizar la contribución de los aminoácidos que forman interacciones con los ligandos, calculamos la descomposición energética por residuo. Se obtuvo la contribución de energía de los aminoácidos dentro de un radio de 5 Å con respecto a las posiciones de los ligandos, para la tirosina cinasa BCR-ABL1 de tipo silvestre y transformada **T315I**. En particular, observamos la importancia de las interacciones hidrofóbicas para la energía libre de unión ya que muestran valores de 1 a 4 kcal/mol para casi todos los ligandos, por ejemplo, los residuos de aminoácidos TYR253, PHE317 y PHE 382 contribuyen energéticamente a través de interacciones π - π y π -alquilo. Además, los residuos LEU248, VAL256 y LEU370 presentaron interacciones π -alquilo y alquílicas. En esta sección se presenta únicamente el análisis de descomposición de energía, de los dos ligandos con la mejor energía libre de unión presentada para ambas proteínas, así como la representación gráfica de sus interacciones. La representación gráfica de las interacciones presentadas para el resto de los ligandos, se pueden consultar en las figuras del Anexo 1.

Tabla 7. Descomposición de energía por residuo para los aminoácidos seleccionados de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre.

Aminoácidos	Contribución Energética (kcal/mol)									
	AXI	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LEU248	-1.44	-0.71	-1.48	-2.38	-3.14	-0.34	-1.92	-2.50	0.00	-0.12
GLY249	-0.29	-0.03	-1.32	-1.58	-2.06	0.00	-0.16	-1.15	0.00	-0.04
TYR253	-1.74	-2.47	-0.05	-4.52	-0.63	-3.63	-0.96	-3.33	-4.89	-3.54
GLY254	-0.03	0.00	0.00	-0.26	0.00	0.00	0.00	-0.43	-0.11	-0.34
VAL256	-1.61	-1.55	-1.16	-2.16	-2.34	-0.49	-1.40	-1.70	-0.66	-0.23
ALA269	-0.82	-0.52	-0.44	-1.10	-0.74	-0.13	-1.00	-1.40	-0.14	-0.02
LYS271	-1.52	0.15	-1.34	-0.19	-0.16	-0.80	1.03	0.42	1.53	-0.21
GLU286	-0.09	2.48	0.47	-0.88	-0.04	0.27	-0.34	-0.84	-0.01	0.03
VAL299	0.11	-1.01	-0.13	-1.41	-0.57	-0.11	-0.33	-0.96	-0.05	-0.06
THR315	-0.95	-0.74	-0.23	-0.43	-0.12	-0.03	-1.91	-0.95	-0.02	0.00
GLU316	-4.85	0.25	0.03	-1.20	1.07	0.37	-2.21	-0.96	0.00	0.17
PHE317	-2.37	-0.39	-0.74	-1.84	-2.11	-0.24	-2.51	-1.44	0.00	-0.02
MET318	-1.89	-0.69	-0.81	-1.42	-2.11	-0.04	-2.07	-1.75	0.00	-0.03
GLY321	-1.34	-0.15	-0.75	-1.85	-0.11	-0.07	-0.78	-1.14	0.00	0.05
ASN322	-0.49	-0.27	-1.10	-0.92	-0.27	-0.51	-0.17	-1.16	-0.36	-0.72
ARG367	-0.09	-0.49	1.04	-1.38	-0.34	-0.10	0.08	-1.06	-1.05	2.96
ASN368	-0.64	-0.29	-0.13	-1.35	-0.31	-0.95	-0.21	-1.39	-0.95	-3.80
LEU370	-1.75	-1.40	-1.15	-2.13	-1.94	-0.53	-1.59	-3.05	-0.44	-0.35
ALA380	-0.07	-2.20	-0.35	-1.83	-0.50	-0.57	-0.95	-1.59	-0.29	-0.59
PHE382	-2.07	-1.91	-0.41	-2.05	-2.53	-2.74	-0.97	-2.46	-2.37	-1.29

Para el caso de la proteína silvestre, observamos en la **Tabla 7** y **Figura 19b** que las interacciones más importantes para **3** son de tipo π - π , observadas entre el anillo de benceno del sustituyente R₁ y TYR253 y PHE382 aportando -4.52 y -2.05.

kcal/mol, respectivamente. Además, identificamos otras interacciones π -alquilo con LEU248 (-2,38 kcal/mol), VAL256 (-2.16 kcal/mol), ALA269 (-1.10 kcal/mol), PHE317 (-1.84 kcal/mol) y LEU370 (- 2.13 kcal/mol), así como enlaces de hidrógeno con TYR253 y ASN322 (-0.92 kcal/mol).

Por otra parte, el ligando **7**, se muestran interacciones π - π entre el anillo de pirrol del núcleo base y TYR253, además, de otra interacción entre el anillo de benceno del sustituyente R₃ con PHE382, donde su contribución energética es de -3.33 y -2.46 kcal/mol, respectivamente. También presento interacciones de tipo π -alquilo con LEU370 (-3,05 kcal/mol) y ALA380 (-1,59 kcal/mol), tipo alquílicas con LEU248 (-2,50 kcal/mol), VAL256 (-1,70 kcal/mol) y MET318 (-1,75 kcal/mol) y un enlace de hidrógeno con ASN322 (-1,16 kcal/mol). Estas interacciones las podemos observar en las **Figuras 19a** y **Tabla 7**.

Por otro lado, en la **Tabla 8** se resume el análisis de descomposición por residuo para la cinasa BCR-ABL1 transformada **T315I**. Observamos que las interacciones hidrofóbicas π - π y π -alquilo y los enlaces de hidrógeno contribuyeron significativamente a los ligandos con la energía libre de unión más baja, como se muestra en las **Figuras 19c** y **19d**. Para el caso **2**, LYS271 forma un enlace de hidrógeno recurrente (-3,65 kcal/mol). Además, encontramos interacciones de tipo π - π entre TYR253 y el anillo de benceno del sustituyente R₁ (-2,23 kcal/mol) y PHE317 con el anillo de benceno del sustituyente R₃ (-1,93 kcal/mol). Además, muestran interacciones π -alquilo con LEU248 (-1,86 kcal/mol), VAL256 (-1,88 kcal/mol), ALA269 (-1,47 kcal/mol), ILE315 (-1,47 kcal/mol) y LEU370 (-2,21 kcal/mol), y tipo alquílicas con MET318 (-1,44 kcal/mol).

Para el caso de **7**, encontramos interacciones π - π entre TYR253 y el anillo de benceno del sustituyente R₃ (-3,53 kcal/mol), tipo π -alquilo entre VAL256 (-2,19 kcal/mol) y ALA269 (-1,30 kcal/mol), tipo alquílicas con LEU248 (-2,60 kcal/mol), ILE315 (-1,77 kcal/mol), MET318 (-1,38 kcal/mol) y LEU370 (-1,19 kcal/mol) y un enlace de hidrógeno con ASN322 (-2,19 kcal/mol). El resto de los ligandos se muestran en las figuras del anexo 1.

Vale la pena mencionar que, a partir de nuestros resultados, observamos que ILE315 participa en la estabilización de ligandos de casi todos los compuestos propuestos, contribuyendo con más de 1 kcal/mol a la energía de unión promoviendo interacciones hidrofóbicas por lo que ratificamos que esta mutación

puntual no afecta negativamente al modo de unión de los ligandos, sino por el contrario se ve favorecido.

Tabla 8. Descomposición de energía por residuo para los aminoácidos seleccionados de la proteína cinasa BCR-ABL1 transformada T315I.

Aminoácidos	Contribución Energética (kcal/mol)									
	AXI	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LEU248	-1.34	-1.19	-1.86	-1.90	-1.13	-0.56	-0.87	-2.60	-1.88	-1.10
TYR253	-4.28	-1.92	-2.23	-1.92	-0.27	-2.19	-2.11	-3.53	-1.72	0.03
GLY254	-1.61	0.00	0.00	-0.53	0.00	0.00	0.00	-1.01	-0.11	-0.06
VAL256	-2.07	-1.22	-1.88	-1.27	-1.50	-1.36	-1.45	-2.19	-1.15	-0.99
ALA269	-1.07	-1.08	-1.47	-1.16	-1.22	-0.65	-0.59	-1.30	-0.45	-0.21
LYS271	-2.28	1.69	-3.65	-0.93	2.71	-0.25	-0.45	-0.73	0.56	-6.48
GLU286	0.81	-1.06	1.32	-0.95	-1.90	0.18	-0.89	-0.89	0.16	2.60
MET290	-0.04	-0.51	-0.48	-0.90	-0.42	-0.59	-1.16	-0.93	-0.06	-0.36
VAL299	0.05	-1.24	-0.48	-0.80	-1.10	-0.48	-0.72	-0.71	-0.34	-0.52
ILE315	-0.73	-1.39	-1.47	-1.12	-1.19	-1.37	-1.37	-1.77	-0.40	-0.68
GLU316	-5.73	-0.28	-0.65	-0.87	-0.42	-2.35	-2.99	-1.08	0.45	0.32
PHE317	-2.65	-1.37	-1.93	-1.33	-1.48	-1.86	-1.73	-1.31	0.00	-0.20
MET318	-1.97	-1.69	-1.44	-1.62	-1.44	-2.24	-2.28	-1.38	0.00	-0.34
GLY321	-1.29	-1.04	-0.94	-0.77	-0.86	0.06	0.07	-0.60	0.00	-0.25
ASN322	-0.43	-1.05	-0.31	-0.56	-0.65	-0.05	-0.06	-1.19	-0.97	-0.45
ASN368	-0.23	-0.28	-0.49	-0.39	-0.41	-0.22	-0.19	-1.14	-1.03	-1.99
LEU370	-1.92	-2.21	-2.21	-1.68	-2.34	-1.24	-1.47	-2.19	-2.30	-2.00
ALA380	-0.44	-2.88	-0.88	-0.97	-2.36	-2.01	-3.29	-1.67	-0.25	-2.25
ASP381	4.46	-1.32	-0.99	-1.02	-1.42	-1.11	-1.25	-1.26	5.18	5.61
PHE382	-0.12	-0.28	-0.36	-1.25	-0.29	-0.62	-1.98	-1.02	-0.15	-0.58

Tal como se muestra en la **Figura 19**, podemos observar claramente que las interacciones hidrofóbicas (π - π , π -alquilo y alquílicas) son responsables de la estabilización energética de los ligandos propuestos en el sitio de unión del ATP, además, para la proteína transformada el residuo ILE315 (marcado en rojo color) mostró interacciones hidrofóbicas, en contraste, la presencia del residuo THR315 (marcado en color naranja) en la proteína silvestre, no contribuye a tales interacciones debido a su naturaleza polar, estos hallazgos concuerdan con el análisis de descomposición de energía.

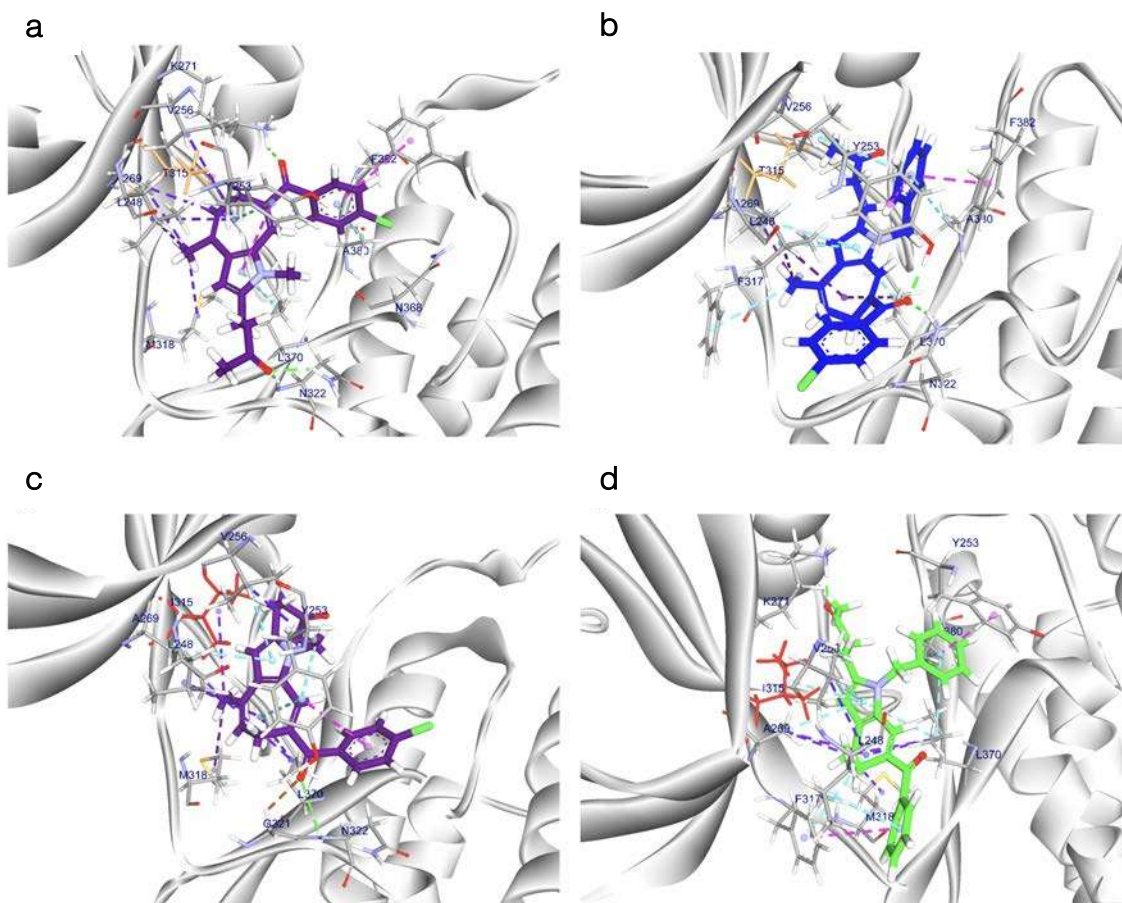


Figura 19. Interacciones formadas durante las simulaciones MD de los complejos más estables **a)** 7-silvestre, **b)** 3-silvestre, **c)** 7-transformada y **d)** 2-transformada. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315 y en rojo ILE315.

III.3. Predicción del perfil de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET).

Debido a la importancia que representa conocer la farmacocinética de compuestos con potencial actividad biológica, se realizó la predicción de las propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y el perfil ADMET para tener una visión general de cómo podría ser el comportamiento de los ligandos propuestos en un organismo vivo, estos resultados fueron obtenidos del servidor web ADMETLab2.0.

En la **Tabla 9** se observan las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y del ligando de referencia **AXI**, las reglas para interpretar estos valores se observan al final de la tabla, así como las abreviaturas de los parámetros medidos. En primer lugar, se observa que solo **5** y **9** presentan los valores óptimos de hidrosolubilidad (**log S**), según la regla que se muestra al final de la **Tabla 9**, con -2.80 y -2.90 respectivamente considerándose solubles, sin embargo, para el resto de los compuestos propuestos y el compuesto de referencia **AXI** presentan valores que los catalogan como moderadamente solubles. Para el caso de la liposolubilidad (**log P**), los compuestos **5** y **9** presentan los valores óptimos con 2.10 y 1.83 respectivamente, el resto de los compuestos son ligeramente más liposolubles lo que concuerda perfectamente con su estructura química al poseer más sustituyentes aromáticos, para complementar este parámetro de liposolubilidad se consideró su determinación a pH de 7.4 (**log D**) y se observa que **5** y **9** siguen teniendo los valores óptimos con 2.38 y 2.26 respectivamente, interesantemente los valores para el resto de los compuestos mejoran tendiendo hacia valores óptimos. Además, utilizando la regla de Lipinski un parámetro importante en química medicinal para identificar compuestos con mejores características farmacológicas, se observó que todos los compuestos son aceptados para dicha regla, aunado a la regla del triángulo dorado (Golden triangle) la cual indica que pueden tener un mejor perfil de absorción, excreción y eficiencia el ligando, no presenta ninguna violación por lo que todos los compuestos son aceptados. Finalmente, los compuestos no presentaron violaciones en PAINS (*Pan Assay Interference Compounds*) lo que los descarta como falsos positivos. Los resultados obtenidos son prometedores para los compuestos propuestos como posibles inhibidores de la tirosina cinasa BCR-ABL1 silvestre y transformada **T315I**.

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol y el compuesto de referencia AXI.

Compuesto	Propiedades fisicoquímicas										Química medicinal	
	MW	HBA	HBD	TPSA	nRot	log S	log P	log D	SAscore	Lipinski	Golden Triangle	PAINS
1	347.19	3	0	39.07	6	-4.35	3.53	3.32	2.97	0, Aceptado	0, Aceptado	0
2	409.2	3	0	39.07	7	-5.68	4.93	4.18	2.84	0, Aceptado	0, Aceptado	0
3	443.17	3	0	39.07	7	-6.28	5.65	4.43	2.88	1, Aceptado	0, Aceptado	0
4	365.18	3	0	39.07	6	-4.39	3.62	3.35	3.08	0, Aceptado	0, Aceptado	0
5	271.16	3	0	39.07	4	-2.80	2.10	2.38	3.38	0, Aceptado	0, Aceptado	0
6	333.17	3	0	39.07	5	-4.70	3.55	3.31	3.03	0, Aceptado	0, Aceptado	0
7	367.13	3	0	39.07	5	-5.53	4.44	3.77	3.06	0, Aceptado	0, Aceptado	0
8	417.23	4	0	56.14	9	-4.26	3.07	3.12	3.17	0, Aceptado	0, Aceptado	0
9	341.20	4	0	56.14	7	-2.90	1.83	2.26	3.46	0, Aceptado	0, Aceptado	0
AXI	386.12	5	2	70.67	6	-4.25	3.83	3.58	2.69	0, Aceptado	0, Aceptado	0
Regla	100~600	0~12	0~7	0~140	0~11	-4.0-0.5	0-3.0	1.0-3.0	≤ 6	< 2 violaciones	0 violaciones	0 alertas

Abreviaturas: MW= Molecular weight (g/mol); HBA = Number of hydrogen bond acceptors; HBD= Number of hydrogen bond donors; TPSA=Topological polar surface area (\AA^2); nRot = Number of rotatable bonds; log S = The logarithm of aqueous solubility value; log P = The logarithm of the n-octanol/water distribution coefficient; log D = The logarithm of the n-octanol/water distribution coefficients at pH=7.4; SAscore = Synthetic accessibility score; PAINS = Pan Assay Interference Compounds.

En la **Tabla 10** se muestran las predicciones para el perfil ADMET de los derivados de 1,6-dihiciclohepta[*b*]pirrol y el compuesto de referencia **AXI**, las reglas para interpretar los valores obtenidos se muestran al final de la tabla, así como las abreviaturas de los parámetros medidos.

Para evaluar la absorción se consideraron tres parámetros: la permeabilidad **Caco-2** el cual indica si un compuesto tendrá buena absorción intestinal, **HIA+** que proporciona información acerca de la probabilidad de que los compuestos se absorban < 30% y **Pgp subs** que indica la probabilidad de que los compuestos propuestos sean sustrato de la Pgp y por lo tanto no sean absorbidos. Los resultados mostraron que todos los compuestos presentan un buen perfil de absorción es decir si es factible su absorción (**Caco-2**), se absorben en cantidades > 30% (**HIA+**) y no son sustratos de Pgp que impida su absorción (**Pgp subs**).

En el rubro de la distribución, se obtuvo la predicción del volumen de distribución (**VD**) que tendrían los compuestos en el organismo, los resultados para este parámetro mostraron que todos presentan un valor adecuado y la probabilidad de atravesar la barrera hematoencefálica (**BBB**) en el cual se observa que los compuestos **2** y **3** presentan la mayor probabilidad de atravesarla, mientras que **1**, **4**, **6**, **7**, **8** y **AXI** tienen una probabilidad intermedia y finalmente **5** y **9** tienen escasa probabilidad de atravesarla.

Por otro lado, en relación al metabolismo se sabe que los citocromos son los encargados de metabolizar a la mayoría de los medicamentos en humanos, siendo los más destacados las isoformas 1A2, 3A4, 2C9, 2C19 y 2D6 de los cuales 3A4 es el de mayor importancia, la inducción o inhibición de los citocromos puede tener un efecto positivo o negativo sobre los fármacos dependiendo de los metabolitos producidos. De los resultados obtenidos se tiene que para **CYP1A2** el compuesto **8** y para **CYP2C19** el compuesto **9** son los únicos que tienen la menor probabilidad de ser inhibidores, mientras que para **CYP2C9**, **CYP2D6** y **CYP3A4** los compuestos **5** y **9** presentan la menor probabilidad de inhibirlos. El ligando de referencia **AXI** muestra una menor probabilidad de inhibir únicamente al **CYP2D6**.

En otro aspecto, de los valores obtenidos para la tasa de aclaramiento (**CL**) que permite predecir la excreción de los compuestos propuestos, se nota que **1**, **4**, **5** y **AXI** presentan valores óptimos de excreción, mientras que **2**, **3**, **6**, **7**, **8** y **9** tienen la probabilidad de presentar una tasa de aclaramiento baja.

Tabla 10. Predicciones ADMET de los compuestos derivados de 1,6-dihidrociclohepta[2]pirrol y el compuesto de referencia AXI.

Compuesto	Absorción			Distribución			Metabolismo						Excreción			Toxicidad		
	Caco-2	HIA+	Pgp subs	BBB+	VD	CYP1A2 inh	CYP2C19 inh	CYP2C9 inh	CYP2D6 inh	CYP3A4 inh	CL	Ames	H-HT	ROAT				
1	-4.91	0.02	0.00	0.37	0.85	0.65	0.94	0.95	0.91	0.80	6.85	0.04	0.82	0.05				
2	-5.11	0.01	0.00	0.15	0.48	0.63	0.93	0.96	0.77	0.87	4.29	0.32	0.77	0.05				
3	-5.18	0.01	0.00	0.11	0.47	0.65	0.92	0.96	0.90	0.81	3.52	0.25	0.75	0.07				
4	-4.98	0.01	0.00	0.44	0.74	0.64	0.91	0.94	0.83	0.78	6.31	0.04	0.94	0.05				
5	-4.68	0.04	0.01	0.90	1.31	0.85	0.67	0.45	0.23	0.15	5.96	0.03	0.83	0.03				
6	-4.77	0.02	0.01	0.64	0.80	0.92	0.94	0.88	0.60	0.61	3.65	0.44	0.79	0.05				
7	-4.79	0.01	0.01	0.53	0.82	0.91	0.92	0.92	0.92	0.66	2.88	0.30	0.77	0.05				
8	-5.49	0.05	0.01	0.38	0.95	0.40	0.89	0.94	0.83	0.75	4.44	0.03	0.90	0.04				
9	-4.90	0.16	0.07	0.84	1.20	0.72	0.37	0.45	0.27	0.18	4.32	0.02	0.90	0.03				
AXI	-5.04	0.01	0.02	0.60	1.22	0.97	0.97	0.95	0.15	0.86	5.50	0.76	0.95	0.05				
Regla	> -5.15	Prob. 0-1	Prob. 0-1	Prob. 0-1	0.04-20	Prob. 0-1	Prob. 0-1	Prob. 0-1	Prob. 0-1	Prob. 0-1	≥ 5	Prob. 0-1	Prob. 0-1	Prob. 0-1				

Abreviaturas: Caco-2 permeability; HIA+ = Human Intestinal Absorption < 30 %; Pgp subs = P-glycoprotein substrate; BBB+ = Blood-Brain Barrier permeability; VD = Volume Distribution (L/kg); CL = Clearance of a drug (ml/min/kg); Ames = Ames test for mutagenicity; H-HT = Human Hepatotoxicity; ROAT: Rat Oral Acute Toxicity

Finalmente, para la valoración de la toxicidad se consideraron las predicciones para la prueba de **Ames** que nos indica la probabilidad de que un compuesto sea mutagénico, se observa que a diferencia del medicamento **AXI** que tiene alta probabilidad de ser mutagénico, todos los compuestos propuestos tienen una baja probabilidad de presentar este efecto indeseado, desafortunadamente, al igual que **AXI** existe la probabilidad de ser hepatotóxicos (**H-HT**), favorablemente **2, 3 y 7**, son los compuestos que presentan la menor probabilidad de presentar este efecto secundario. Sin embargo, según la determinación de toxicidad aguda en mamíferos (**ROAT**) todas las moléculas presentan una probabilidad baja de ser tóxicos.

CONCLUSIONES

Los experimentos de acoplamiento molecular y las simulaciones de dinámica molecular de los derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol contra las proteínas tirosina cinasa T315I BCR-ABL1 de tipo silvestre y transformada confirmaron que todos los ligandos considerados en este trabajo, se unen de manera estable en el sitio de reconocimiento del ATP. Sólo los ligandos **4** y **6** formaron interacciones por puente de hidrógeno estables (> 50% de residencia) con la proteína de tipo silvestre, mientras que para los ligandos restantes las interacciones formadas mostraron una baja residencia. Interesantemente, la mayoría de los ligandos tienen una mayor afinidad por la proteína transformada **T315I**, formando interacciones por puente de hidrógeno estables con una residencia mayor al 50% del tiempo de simulación en casi todos los casos examinados.

En sinergia con las interacciones de puente de hidrógeno, el comportamiento hidrófobo inferido por los sustituyentes aromáticos de los ligandos ayuda a estabilizarlos en el sitio de unión del ATP ya que la mutación del aminoácido THR315 por ILE315 en la proteína transformada, favorece a la formación de interacciones hidrofóbicas, estos hallazgos muestran buena concordancia con la estimación de la energía libre de unión y el análisis de descomposición de energía por residuo, en donde claramente se observa la importante contribución energética de los residuos de aminoácidos que forman este tipo de interacciones. Los resultados son prometedores ya que esta mutación generalmente confiere resistencia a la mayoría de los TKIs actualmente aprobados.

Según nuestros hallazgos, el ligando **7** tiene la mayor afinidad energética tanto por la proteína de tipo silvestre como por la transformada **T315I**, superando al ligando de referencia axitinib en ambos casos.

En general todos los compuestos presentan adecuadas propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad, sin embargo, existe la posibilidad de presentar hepatotoxicidad, afortunadamente el ligando **7** presenta una probabilidad menor de presentar este efecto indeseado.

Por tanto, compuestos como los propuestos en este estudio podrían tener un notable efecto inhibitor sobre estas proteínas de la LMC en futuras investigaciones experimentales. La información obtenida en este estudio es valiosa para diseñar estructuras nuevas y prometedoras de derivados de 1,6-dihidrociclohepta[b]pirrol en búsqueda de nuevos candidatos para el tratamiento de este tipo de cáncer.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Ooms F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry* 2000, 7: 141-158
- 2 Tong JC. Applications of Computer-Aided Drug Design. In: Grover A ed. *Drug Design: Principles and Applications* Singapore: Springer Singapore 2017: 1-7
- 3 Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research* 2015, 38: 1686-1701
- 4 Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews* 2014, 66: 334-395
- 5 Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2000, 103: 211-225
- 6 Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2010, 141: 1117-1134
- 7 Tsygankov AY. Non-receptor protein tyrosine kinases. 2003, 8: 595-635
- 8 Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 2005, 5: 172-183
- 9 Deininger MWN, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. *BCR-ABL* Tyrosine Kinase Activity Regulates the Expression of Multiple Genes Implicated in the Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Research* 2000, 60: 2049-2055
- 10 Druker BJ. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 2002, 21: 8541-8546
- 11 Al-Obeidi FA, Lam KS. Development of inhibitors for protein tyrosine kinases. *Oncogene* 2000, 19: 5690-5701
- 12 Valentin-Escalera J, García-Dueñas AK, Solorio-Alvarado CR, Contreras-Celedón C, Cortés-García CJ, Chacón-García L. A Novel Pseudo-Three-Component Synthetic Strategy for the Synthesis of 1,6-Dihydroazaazulenes via Cyclization of Pyrrolyl-enones. *Synlett* 2021, 32: 1461-1464
- 13 Fang R, Zhou L, Tu P-C, Kirillov AM, Yang L. Computational study on gold-catalyzed cascade reactions of 1, 4-diynes and pyrroles: mechanism,

regioselectivity, role of catalyst, and effects of substituent and solvent. *Organometallics* 2018, 37: 1927-1936

14 Hamada N, Yoshida Y, Oishi S, Ohno H. Gold-Catalyzed Cascade Reaction of Skipped Diynes for the Construction of a Cyclohepta [b] pyrrole Scaffold. *Organic letters* 2017, 19: 3875-3878

15 Kaushik NK, Kaushik N, Attri P, Kumar N, Kim CH, Verma AK, Choi EH. Biomedical Importance of Indoles. *Molecules* 2013, 18: 6620-6662

16 Rajagopalan R. Azulene and azaazulene systems for imaging, monitoring and therapy. ed.: Google Patents 2016

17 Sharma V, Kumar P, Pathak D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 2010, 47: 491-502

18 Lee O, Chen C-H, Hung C-Y, Chang Y-L, Chen T-S. Azaazulene compounds. ed.: Google Patents 2013

19 Treasurywala A, Palameta B, Bogri T, Bagli J. Cyclohepta [b] pyrrole derivatives. ed.: Google Patents 1982

20 Mo S, Kronic A, Santarsiero BD, Franzblau SG, Orjala J. Hapalindole-related alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Phytochemistry* 2010, 71: 2116-2123

21 Huettner CS, Zhang P, Van Etten RA, Tenen DG. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nature Genetics* 2000, 24: 57-60

22 Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, O'Hare T, et al. Ponatinib in Refractory Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *New England Journal of Medicine* 2012, 367: 2075-2088

23 Melge AR, Kumar LG, K P, Nair SV, K M, C GM. Predictive models for designing potent tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia for understanding its molecular mechanism of resistance by molecular docking and dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2019, 37: 4747-4766

24 Pemovska T, Johnson E, Kontro M, Repasky GA, Chen J, Wells P, Cronin CN, et al. Axitinib effectively inhibits BCR-ABL1(T315I) with a distinct binding conformation. *Nature* 2015, 519: 102-105

25 Mukesh B, Rakesh K. Molecular docking: a review. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* 2011, 2: 1746-1751

-
- 26 Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW. A review of protein-small molecule docking methods. *Journal of computer-aided molecular design* 2002, 16: 151-166
- 27 Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophysical reviews* 2017, 9: 91-102
- 28 Saldívar-González F, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación química* 2017, 28: 51-58
- 29 Verdonk ML, Taylor RD, Chessari G, Murray CW. Illustration of Current Challenges in Molecular Docking. *Structure-Based Drug Discovery: Springer* 2007: 201-221
- 30 Klepeis JL, Lindorff-Larsen K, Dror RO, Shaw DE. Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function. *Current Opinion in Structural Biology* 2009, 19: 120-127
- 31 Karplus M, Kuriyan J. Molecular dynamics and protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102: 6679
- 32 Gapsys V, Michielssens S, Peters JH, Groot BLd, Leonov H. Calculation of binding free energies. *Molecular Modeling of Proteins: Springer* 2015: 173-209
- 33 Chodera JD, Mobley DL, Shirts MR, Dixon RW, Branson K, Pande VSJCoisb. Alchemical free energy methods for drug discovery: progress and challenges. 2011, 21: 150-160
- 34 Ding X, Zhang BJTjopcl. DeepBAR: a fast and exact method for binding free energy computation. 2021, 12: 2509-2515
- 35 Fu H, Gumbart JC, Chen H, Shao X, Cai W, Chipot CJJoci, modeling. BFEE: A user-friendly graphical interface facilitating absolute binding free-energy calculations. 2018, 58: 556-560
- 36 Genheden S, Ryde UJEoodd. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. 2015, 10: 449-461
- 37 Wang E, Sun H, Wang J, Wang Z, Liu H, Zhang JZ, Hou TJCr. End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: strategies and applications in drug design. 2019, 119: 9478-9508
- 38 Van De Waterbeemd H, Gifford EJNrDd. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? 2003, 2: 192-204
-

-
- 39 Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH. The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2002, 7: 109-116
- 40 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 2017, 7: 42717
- 41 Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 58: 4066-4072
- 42 Yang H, Lou C, Sun L, Li J, Cai Y, Wang Z, Li W, et al. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics* 2018, 35: 1067-1069
- 43 Xiong G, Wu Z, Yi J, Fu L, Yang Z, Hsieh C, Yin M, et al. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research* 2021, 49: W5-W14
- 44 Kar S, Leszczynski J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2020, 15: 1473-1487
- 45 Spartan'20. 20.1.3 ed.: Wavefunction, Inc., Q-CHEM 2020
- 46 Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 2012, 4: 17
- 47 Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, et al. *Gaussian 16 Rev. C.01*. ed. Wallingford, CT 2016
- 48 Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009, 30: 2785-2791
- 49 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, et al. The protein data bank. 2000, 28: 235-242
- 50 Eastman P. PDBFixer, 2019. ed.
- 51 DeLano WLJCNPC. Pymol: An open-source molecular graphics tool. 2002, 40: 82-92
- 52 Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro JV, Bernardi RC, Buch R, et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys* 2020, 153: 044130
-

-
- 53 Kim S, Lee J, Jo S, Brooks CL, 3rd, Lee HS, Im W. CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *J Comput Chem* 2017, 38: 1879-1886
- 54 Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* 2008, 29: 1859-1865
- 55 Lee J, Cheng X, Swails JM, Yeom MS, Eastman PK, Lemkul JA, Wei S, et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput* 2016, 12: 405-413
- 56 Mark P, Nilsson L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A* 2001, 105: 9954-9960
- 57 Huang J, MacKerell Jr AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. 2013, 34: 2135-2145
- 58 Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* 1995, 103: 8577-8593
- 59 Fletcher R, Reeves CM. Function minimization by conjugate gradients. *The Computer Journal* 1964, 7: 149-154
- 60 Bussi G, Parrinello M. Accurate sampling using Langevin dynamics. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2007, 75: 056707
- 61 Feller SE, Zhang Y, Pastor RW, Brooks BR. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics* 1995, 103: 4613-4621
- 62 Martyna GJ, Tobias DJ, Klein ML. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics* 1994, 101: 4177-4189
- 63 Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996, 14: 33-38, 27-38
- 64 Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov* 2015, 10: 449-461
- 65 Liu H, Hou T. CaFE: a tool for binding affinity prediction using end-point free energy methods. *Bioinformatics* 2016, 32: 2216-2218
- 66 Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, Brookes DH, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci* 2018, 27: 112-128
-

-
- 67 Valdés-Tresanco MS, Valdés-Tresanco ME, Valiente PA, Moreno E. gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2021, 17: 6281-6291
- 68 Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. 2005, 26: 1701-1718
- 69 Cole JC, Murray CW, Nissink JWM, Taylor RD, Taylor R. Comparing protein–ligand docking programs is difficult. 2005, 60: 325-332
- 70 Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Ten Eyck LF. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. 2006, 103: 17783-17788
- 71 Peng Y-H, Shiao H-Y, Tu C-H, Liu P-M, Hsu JT-A, Amancha PK, Wu J-S, et al. Protein Kinase Inhibitor Design by Targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) Motif: The Role of the DFG Motif in the Design of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56: 3889-3903
- 72 Jeffrey GA, Jeffrey GA. An introduction to hydrogen bonding. Oxford university press New York 1997
- 73 Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, et al. Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571)1. *Cancer Research* 2002, 62: 4236-4243
- 74 Amarante-Mendes GP, Rana A, Datoguia TS, Hamerschlak N, Brumatti G. BCR-ABL1 Tyrosine Kinase Complex Signaling Transduction: Challenges to Overcome Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. 2022, 14: 215
- 75 Yang K, Fu L-w. Mechanisms of resistance to BCR–ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2015, 93: 277-292
- 76 Zhu Y, Alqahtani S, Hu X. Aromatic Rings as Molecular Determinants for the Molecular Recognition of Protein Kinase Inhibitors. 2021, 26: 1776
-

ANEXO I

En esta sección podemos observar la representación gráfica de las interacciones presentadas por los ligandos que no se mostraron en la sección principal por motivos de clarificación. En las **Figuras A1.1 a A1.8** se muestran las interacciones presentadas por los ligandos derivados de 1,6-dihidrociclohepta[*b*]pirrol y la proteína tirosina cinasa BCR-ABL1 silvestre y en las **Figuras A1.9 a A1.16** las interacciones presentadas con la proteína tirosina cinasa BCR-ABL1 transformada **T315I**.

Se observa claramente para el resto de los ligandos, que las interacciones formadas de tipo hidrofóbico (π - π , π -alquilo y alquílicas) son responsables de la estabilización energética de los ligandos en el sitio de unión del ATP ya que se forman con residuos de aminoácidos clave de diferentes regiones del sitio de unión, como se ha mencionado anteriormente en concordancia con el análisis de energía por residuo que se presentó en las **Tablas 7 y 8**.

Además, es importante destacar que los ligandos en complejo con la proteína transformada el residuo ILE315 (marcado en rojo color) mostró interacciones hidrofóbicas, en contraste, la presencia del residuo THR315 (marcado en color naranja) en la proteína silvestre, no contribuye a tales interacciones debido a su naturaleza polar.

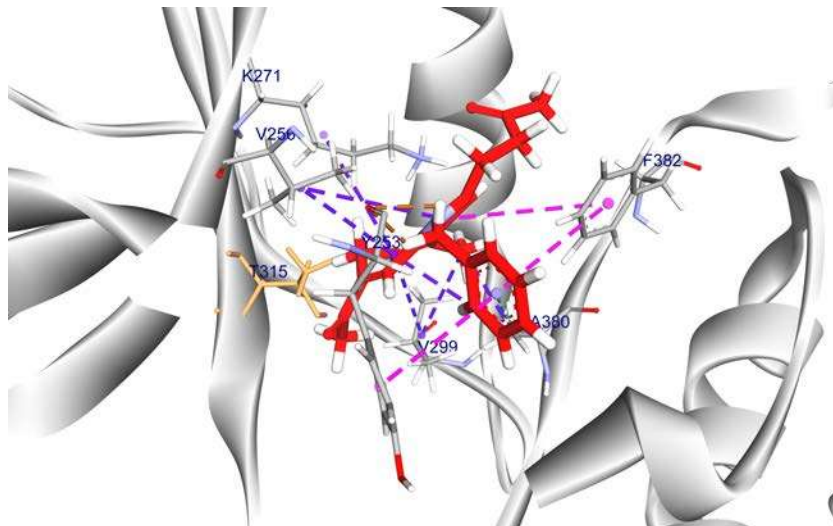


Figura A1.1. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **1**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315

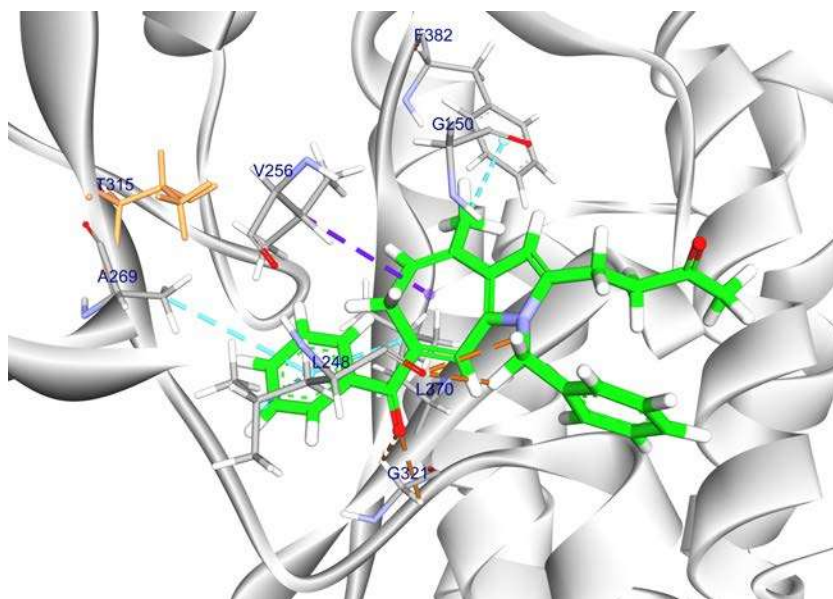


Figura A1.2. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **2**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315.

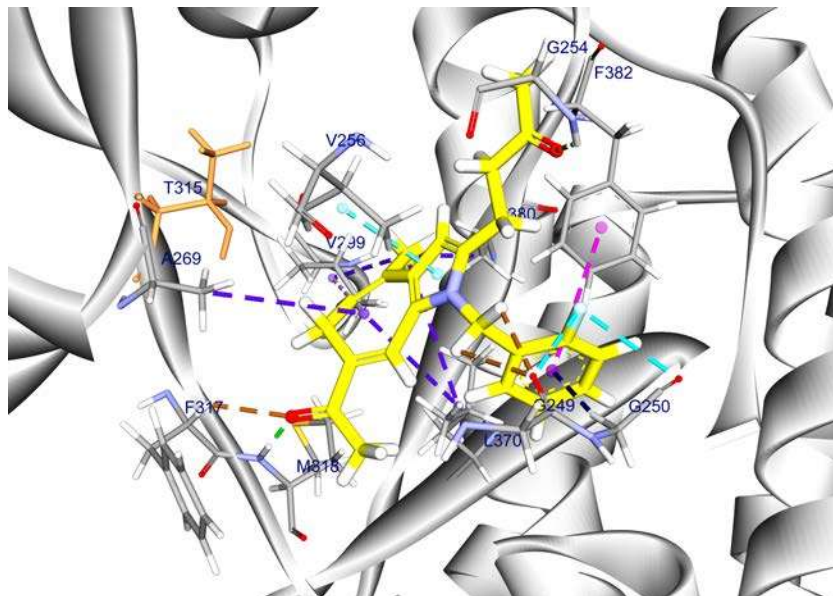


Figura A1.3. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **4**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315.

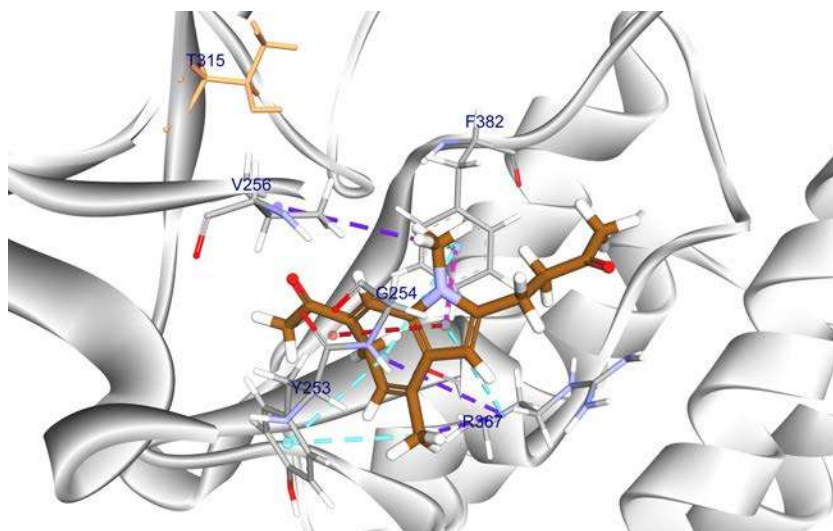


Figura A1.4. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **5**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315.

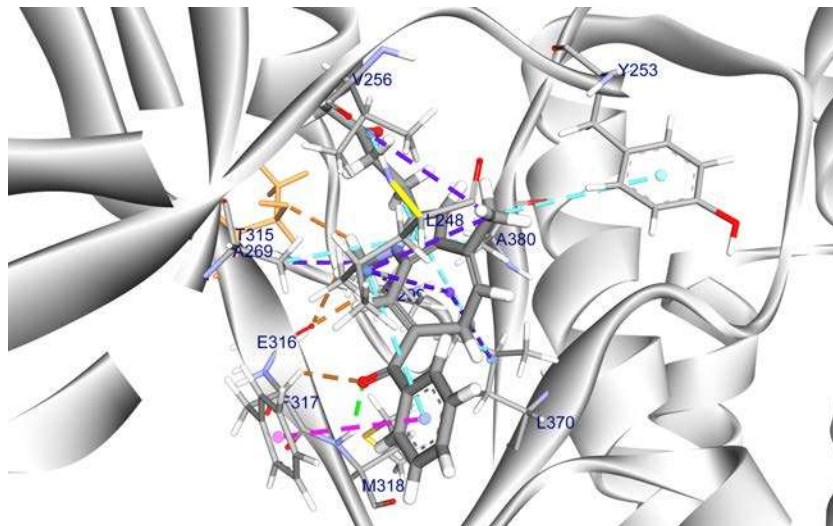


Figura A1.5. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **6**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315.

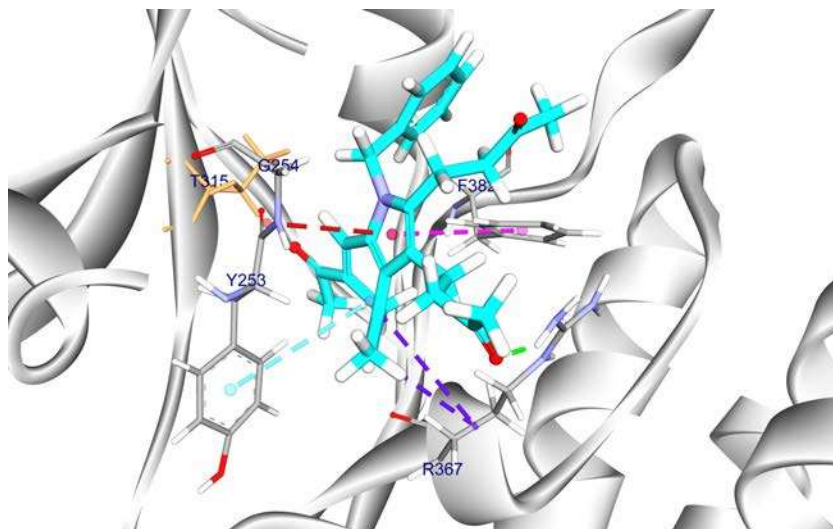


Figura A1.6. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **8**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315.

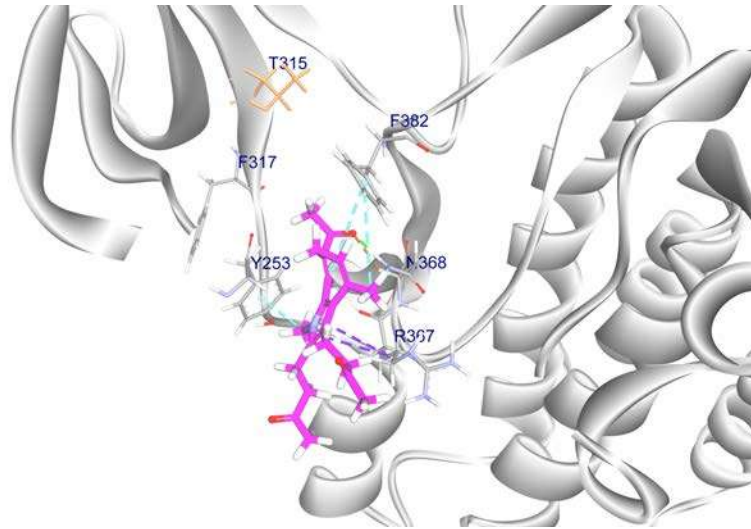


Figura A1.7 Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **9**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, purpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315.

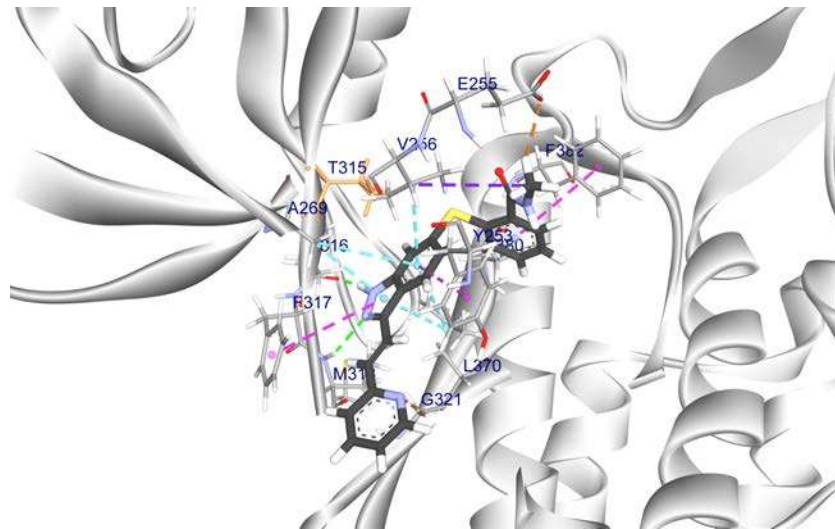


Figura A1.8. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 silvestre y el ligando **AXI**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, purpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En naranja se muestra el residuo de aminoácido THR315.

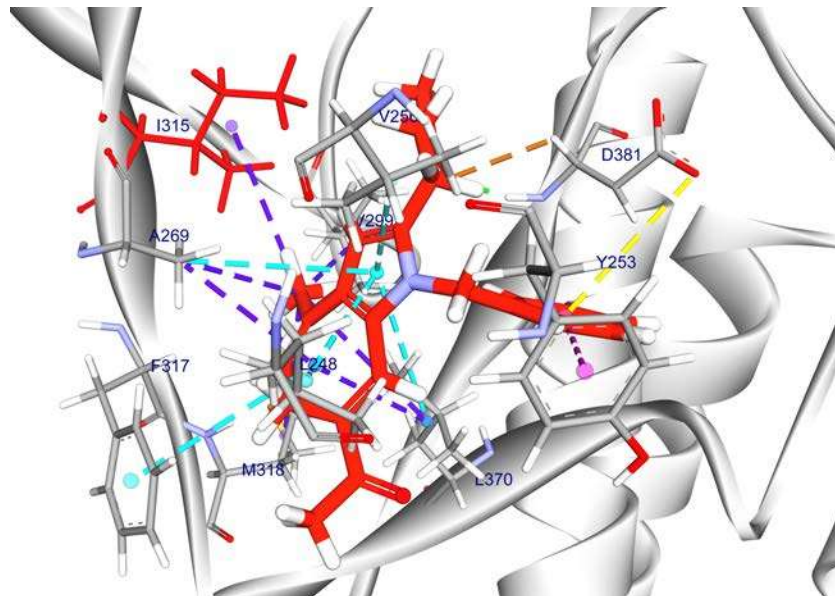


Figura A1.9. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **1**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

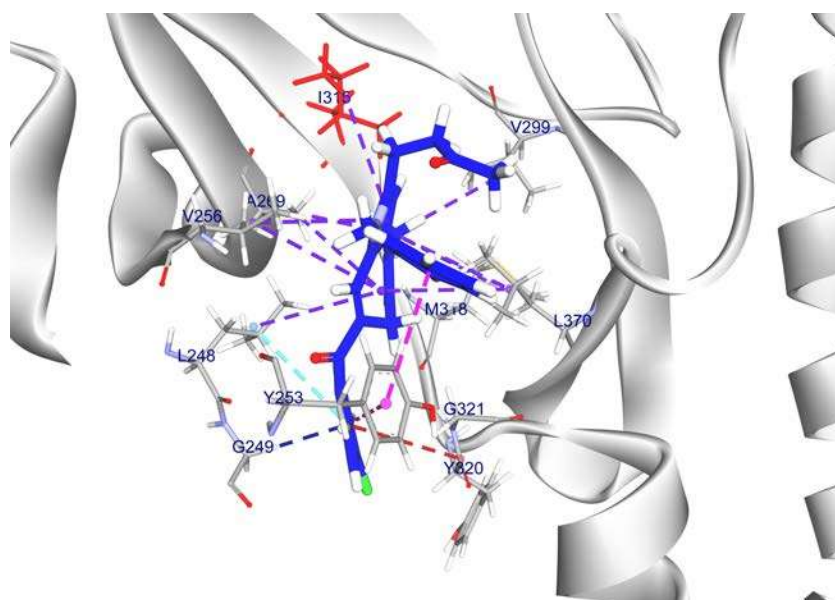


Figura A1.10. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **3**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

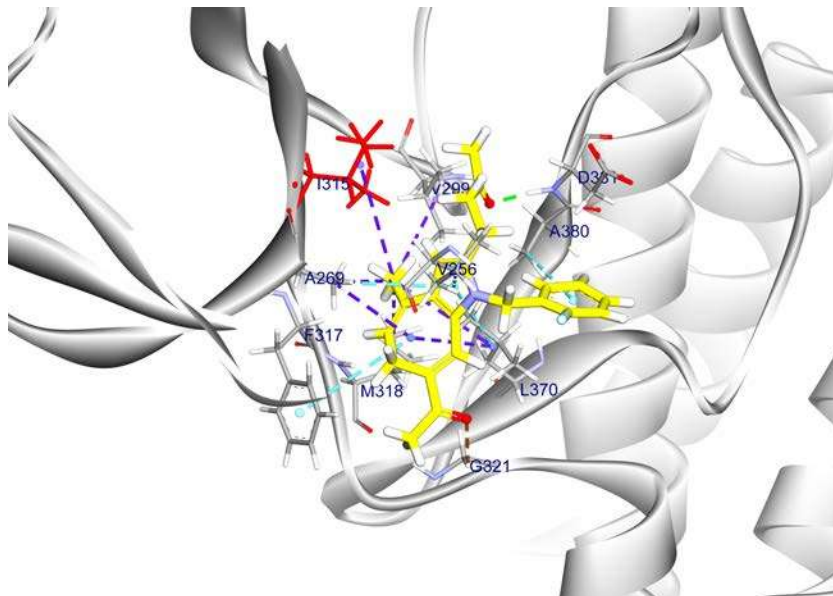


Figura A1.11. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **4**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

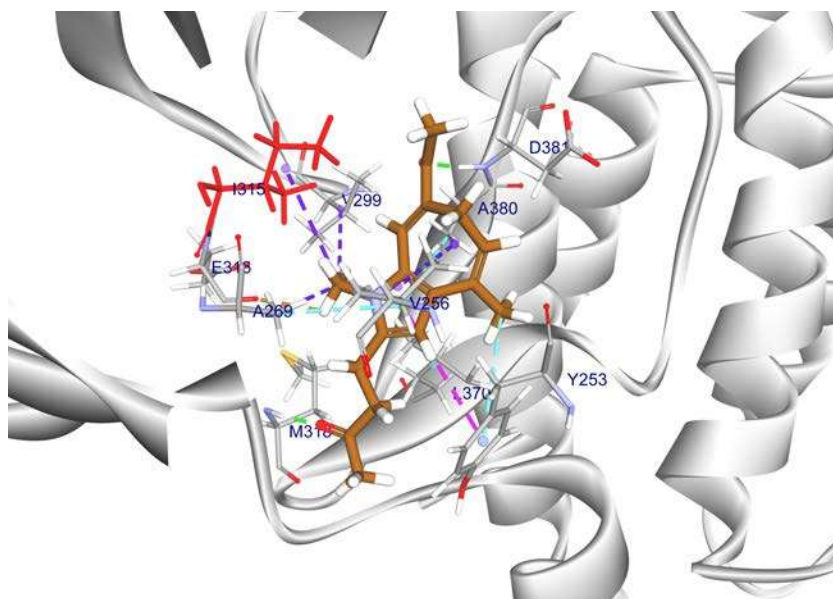


Figura A1.12. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **5**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

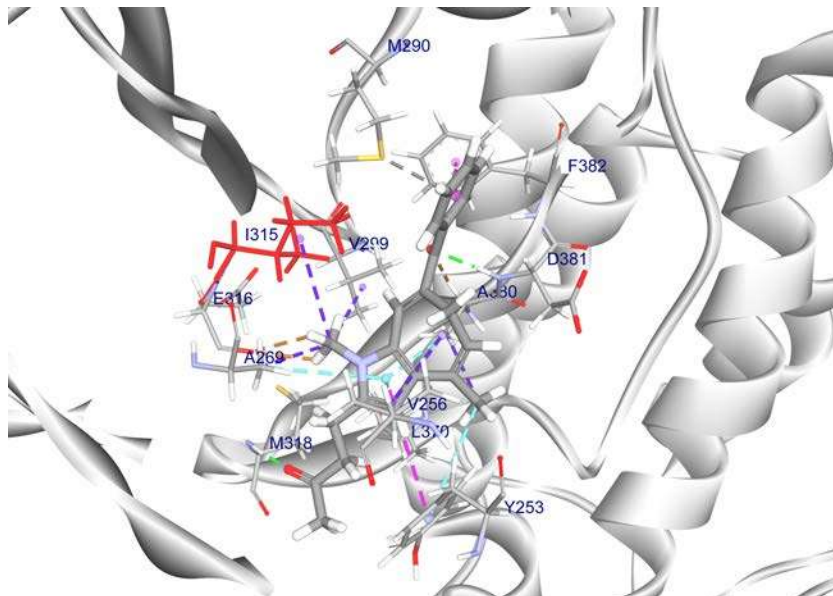


Figura A1.13. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **6**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

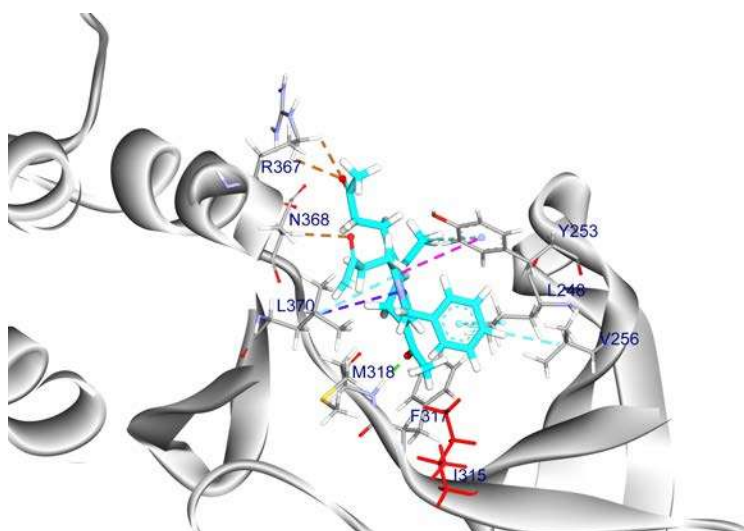


Figura A1.14. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **8**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

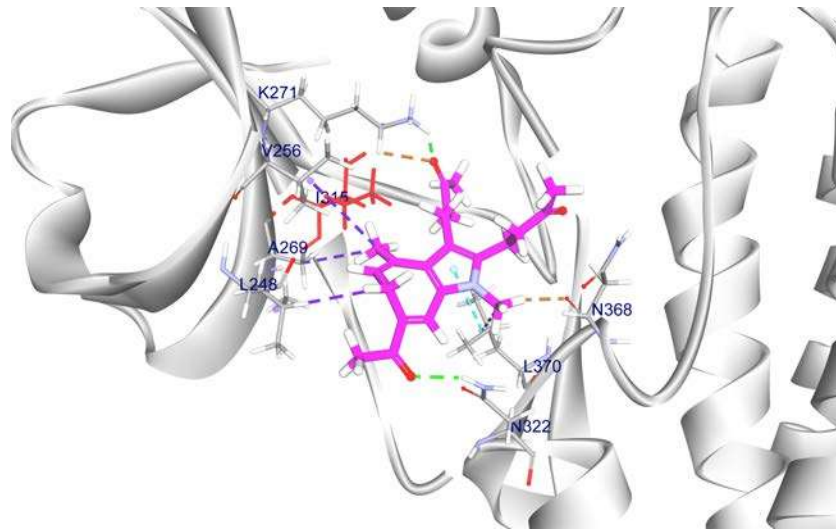


Figura A1.15. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **9**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

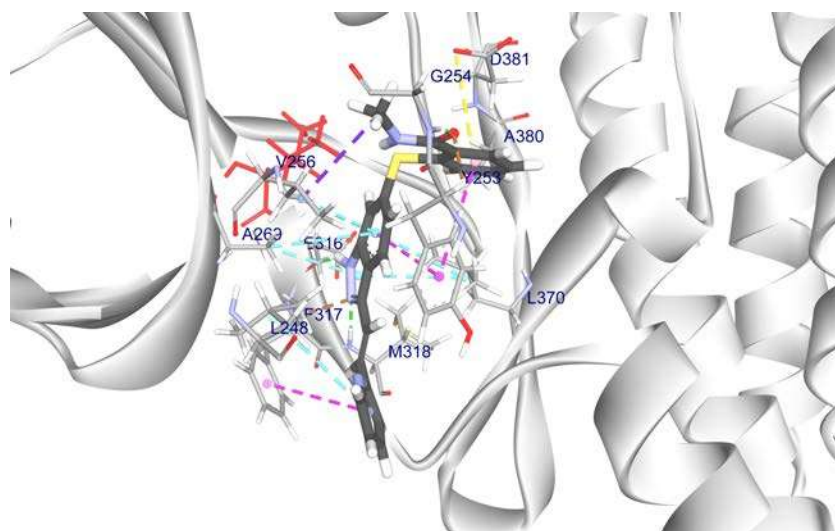


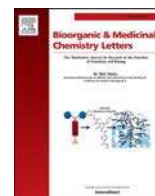
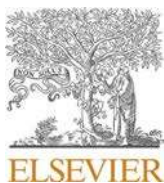
Figura A1.16. Interacciones formadas durante las simulaciones MD del complejo de la proteína cinasa BCR-ABL1 mutante **T315I** y el ligando **AXI**. Esquema de colores: verde-puentes de hidrógeno, rosa-interacciones π - π , cian-interacciones π -alquílicas, púrpura-interacciones alquílicas y café-puentes de hidrógeno no convencionales. En rojo se muestra el residuo de aminoácido ILE315.

ANEXO II

ARTICULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO

Nahide, P. D., Alba-Betancourt, C., Chávez-Rivera, R., Romo-Rodríguez, P., Solís-Hernández, M., Segura-Quezada, L. A., ... & Solorio-Alvarado, C. R. (2022). Novel 2-aryl-4-aryloxyquinoline-based fungistatics for *Mucor circinelloides*. Biological evaluation of activity, QSAR and docking study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *63*, 128649.

Solís-Hernández, M. D. J., Palomares-Báez, J. P., Herrera-Bucio, R., Chacón-García, L., & Navarro-Santos, P. (2023). Derivates of 1, 6-dihydroazaazulenes as inhibitors of tyrosine kinases BCR-ABL1 wild type and mutant T315I: a molecular dynamics approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-12.



Novel 2-aryl-4-aryloxyquinoline-based fungistatics for *Mucor circinelloides*. Biological evaluation of activity, QSAR and docking study

Pradip D. Nahide^a, Clara Alba-Betancourt^b, Rubén Chávez-Rivera^d, Pamela Romo-Rodríguez^c, Manuel Solís-Hernández^e, Luis A. Segura-Quezada^a, Karina R. Torres-Carbajal^a, Rocío Gámez-Montaño^a, Martha A. Deveze-Álvarez^b, Marco A. Ramírez-Morales^b, Angel J. Alonso-Castro^b, Juan R. Zapata-Morales^b, Alan J. Ruiz-Padilla^b, Claudia L. Mendoza-Macías^b, Victor Meza-Carmen^e, Carlos J. Cortés-García^e, Alma R. Corrales-Escobosa^a, Rosa E. Núñez-Anita^{d,f}, Rafael Ortíz-Alvarado^{d,*}, Luis Chacón-García^{e,*}, César R. Solorio-Alvarado^{a,*}

^a Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Noria Alta S/N, 36050 Guanajuato, Gto., Mexico

^b Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Farmacia, Noria Alta S/N, 36050 Guanajuato, Gto., Mexico

^c Tecnológico Nacional de México/I.T. de Pabellón de Arteaga, Departamento de Ciencias Básicas, Pabellón de Arteaga, Ags, Mexico

^d Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología, Tzintzuntzan 173, Col. Matamoros, Morelia, Mich., Mexico

^e Laboratorio de Diseño Molecular, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58033 Morelia, Michoacán, Mexico

^f Centro de Estudios Multidisciplinario en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia- Zinapécuaro S/N. CP588893 Tarímbaro Michoacán México

ARTICLE INFO

Keywords:

Fungistatic activity
Mucor circinelloides
Mucormycosis
2-aryl-4-aryloxyquinolines
QSAR study

ABSTRACT

Zygomycetes are ubiquitous saprophytes in natural environments which transform organic matter. Some zygomycetes of gender *Mucor* have attracted interest in health sector. Due to its ability as opportunistic microorganisms infecting immuno-compromised people and to the few available pharmacological treatments, the mucormycosis is receiving worldwide attention. Concerning to the pharmacological treatments, some triazole-based compounds such as fluconazole are extensively used. Nevertheless, we focused in the quinolines since they are broadly used models for the design and development of new synthetic antifungal agents. In this study, the fungistatic activity on *M. circinelloides* of various 2-aryl-4-aryloxyquinoline-based compounds was discovered, and in some cases, it resulted better than reference compound fluconazole. These quinoline derivatives were synthesized via the C_{sp}²-O bond formation using diaryliodonium(III) salts chemistry. A QSAR study was carried out to quantitatively correlate the chemical structure of the tested compounds with their biological activity. Also, a docking study to identify a plausible action target of our more active quinolines was carried out. The results highlighted an increased activity with the fluorine- and nitro-containing derivatives. In light of the few mucormycosis pharmacological treatments, herein we present some non-described molecules with excellent in vitro activities and potential use in the mucormycosis treatment.

Zygomycetes are ubiquitous saprophytes in natural environments that contribute to the transformation of organic matter.¹ In recent years, zygomycetes have attracted interest in different fields such as health sector.^{2,3} Some members of the zygomycetes have been described worldwide as emergent opportunistic pathogens in humans,⁴ especially

those with diabetes mellitus,⁵ leucemia⁶ or severe traumatic injuries.⁷ This type of fungi can cause the deadly infection known as mucormycosis. Some of the reported mucormycosis etiologic agents species include *Apsidia trapeziformis*, *Cunninghamella spp*, *Mucor spp*, *Rhizomucor spp* and *Rhizopus spp*.⁸⁻¹⁰

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rafael.ortiz@umich.mx (R. Ortíz-Alvarado), lchacon@umich.mx (L. Chacón-García), csolorio@ugto.mx (C.R. Solorio-Alvarado).

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128649>

Received 16 September 2021; Received in revised form 2 February 2022; Accepted 25 February 2022

Available online 1 March 2022

0960-894X/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In aspects related to zygomycetes pathogenicity, the yeast-hyphae dimorphism of some *Mucor* species is considered the main and most relevant studied aspect regarding the biological cycle of the fungi. Depending on the environmental conditions in which dimorphic species of *Mucor* are cultivated, the germination of spores produces vegetative cells of hyphae (mycelium) or spherical budding cells (yeasts).^{11,12} The production of mycelium or yeast cells can occur under aerobic or anaerobic conditions, according to the carbon source and/or the addition to the medium of morphogenetic compounds. Mycelial cells are able to grow adopting an oxidative or fermentative metabolism, depending on the cultivation conditions, whereas the production of yeast cells obligatorily requires the presence of hexoses. In this case the cells adopt a fermentative metabolism producing high levels of ethanol after growth under different conditions, such as anaerobiosis or growth in aerobiosis in the presence of morphogenetic compounds, such as dibutyl cyclic AMP, certain amino acids and phenethyl alcohol (PEA).¹³

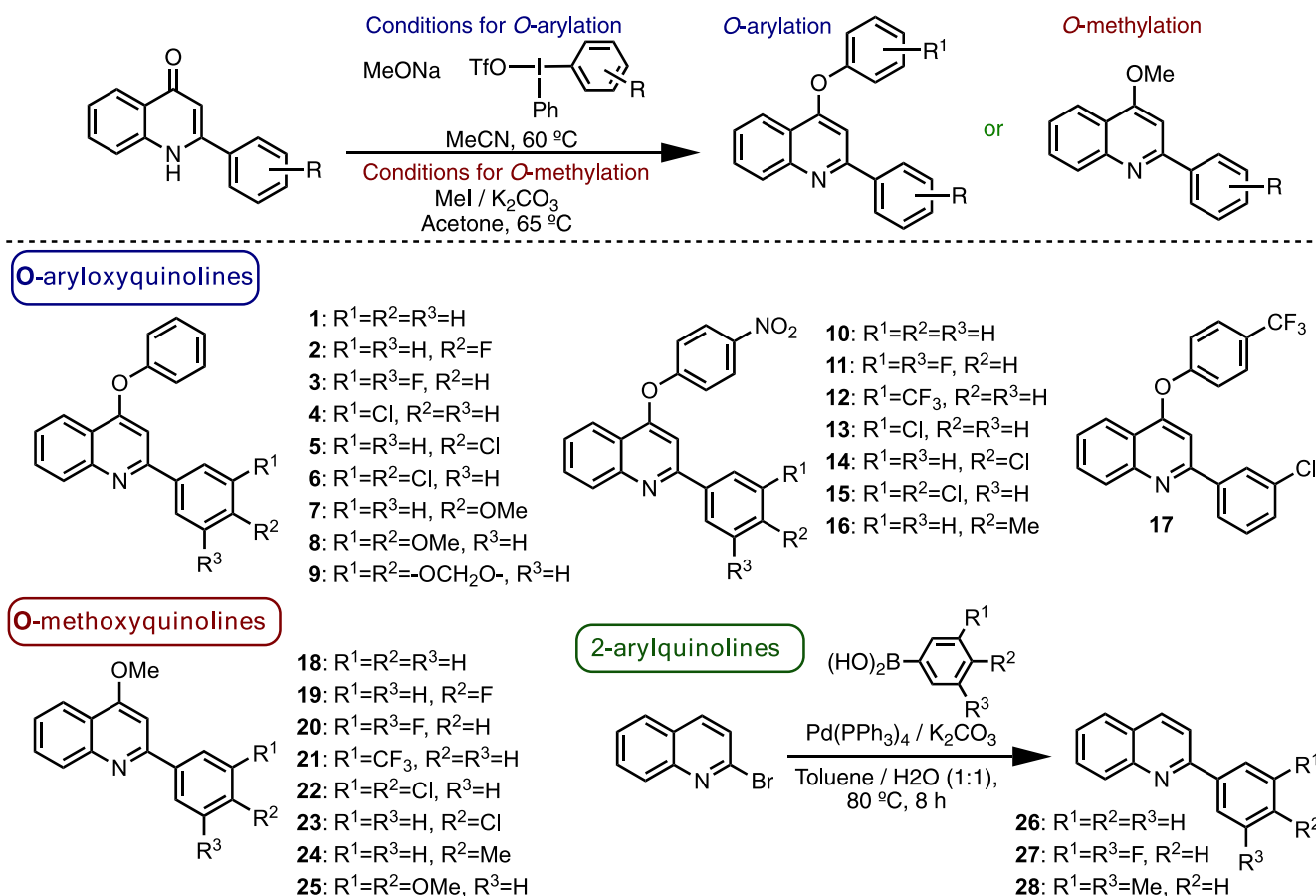
Growth conditions are key for *M. circinelloides*, as differing conditions determine the fate of asexual spores, which develop either as mycelia or yeast cells; this process, depends mostly on the availability of oxygen and carbon sources.^{14,15} Morphological changes are also related to fungal pathogenesis and disease development, in such a way *M. circinelloides* can become a human opportunistic pathogen associated to its mycelia morphology.^{16,17} The lethal phenotype in humans is associated in part with the limited availability of antifungal therapies targeted against mucorales, for example, some clinical strains of *M. circinelloides* have been described as resistant to amphotericin, fluconazole and posaconazole, which are the primary antifungal compounds utilized in mucormycosis therapy.¹⁸

In this context there is an urgent need for developing new antifungal and fungistatic drugs, to provide novel therapeutic options. Accordingly,

quinine a quinoline alkaloid isolated from the bark of the Cinchona tree in 1820, used in the treatment of malaria, played a historical role in the development of quinoline alkaloids as therapeutics.¹⁹ These quinoline based-compounds have been isolated and identified from natural sources (plants, animals, and microorganisms),²⁰ and many studies have documented their antitumor,²¹ antimalarial,²² antibacterial,²³ antifungal,²⁴ antiviral,²⁵ antiparasitic and insecticidal,²⁶ anti-inflammatory,²⁷ antiplatelet and other activities.²⁸ The most successful drug-based on quinoline scaffold is chloroquine, which was specifically developed as antimalarial agent.²⁹ On the other hand, consequent with the importance of the antifungal activity of the quinoline and 4-quinolone moieties these nuclei have been used as a scaffold for drug development for more than two centuries.³⁰ At the present, numerous quinoline-based compounds and drugs have been developed, designed to target all stages of fungal life-cycle.³¹ In fact, quinolines still serve as inexhaustible models for design and development of new semisynthetic or synthetic quinoline/quinolone antimicrobial agents. Specifically, we inspired from the reports on different 2-aryl-4-aryloxyquinolines development which showed several and promising biological activities,³² in such a way that we considered their synthesis to evaluate them as potential antifungals.

In the present study, the biological activity of different 2-aryl-4-aryloxy- and 2-aryl-4-methoxyquinolines were assayed, the results conducted us to the discovery of the fungistatic activity on two different strains of *M. circinelloides* of several of the tested compounds. Finally, QSAR and docking studies for assayed compounds provided an explanation of the structure-activity relationship as well as a plausible action target of the synthesized quinolines, evidencing the potential use of this type of compounds in the plausible treatment of mucormycosis.

Regarding the organic synthesis, the 2-aryl-4-aryloxy- and 2-aryl-4-



Scheme 1. Synthesized quinoline compounds. Two types of quinolines were synthesized, O-arylated quinolines (1–17) and O-methylated quinolines (18–25).

methoxyquinolines structures are delineated in [scheme 1](#) and synthesis was carried out using the following methods: Method A: Synthesis of 4-aryloxyquinolines A group of seventeen 2-aryl-4-aryloxyquinolones were synthesized by using a modified procedure of our previous report.³³ The starting materials correspond to their respective 2-aryl-4-quinolones which were prepared according to our optimized reaction

conditions. Then, synthesis of compounds **1-17** started by reacting the 2-aryl-4-quinolone derivatives with sodium methoxide in acetonitrile at 60 °C. This reaction generates a *N*-centered- in resonance with the corresponding *C*-centered-quinoline anion which *in situ* reacts with different diaryliodonium(III) salts giving rise to the formation of the O-C_{sp}² bond by transferring the more electron-poor aryl. In such a way

Table 1

In vitro percentage of spore germination for the wild-type R7B and mutant M5 strains of *Mucor circinelloides* at 100 µg/mL of the compounds **1** to **28**.^a

		% of germination			% of germination					
Comp	R	Ar	R7B	M5	Comp	R	Ar	R7B	M5	
1			97.4 ± 0.6	97.9 ± 2.5	15			83.9 ± 1.5	85.9 ± 2.8	
2			39.8 ± 1.4	38.6 ± 1.3	16			98.1 ± 1.4	98.1 ± 0.7	
3			6.7 ± 1.2	4.5 ± 1.7	17			42.2 ± 2.7	38.3 ± 1.2	
4			89.1 ± 1.4	85.6 ± 2.6	18			97.8 ± 0.6	95.8 ± 1.5	
5			36.1 ± 1.8	32.3 ± 1.6	19			17.1 ± 0.2	20.6 ± 0.5	
6			60.8 ± 2.7	57.8 ± 3.4	20			32.8 ± 2.4	29.7 ± 1.2	
7			94.3 ± 3.6	92.1 ± 0.7	21				88.9 ± 1.8	89.7 ± 1.2
8			98.1 ± 1.4	98.2 ± 0.8	22				96.1 ± 1.2	93.7 ± 0.8
9			28.2 ± 1.3	29.5 ± 1.2	23				98.1 ± 1.2	97.3 ± 0.6
10			98.1 ± 1.4	98.2 ± 1.6	24			81.9 ± 0.5	84.9 ± 2.6	
11			7.9 ± 0.5	11.2 ± 0.4	25			97.1 ± 1.4	96.2 ± 1.8	
12			32.8 ± 2.4	29.7 ± 1.2	26			98.1 ± 1.4	98.2 ± 0.8	
13			32.7 ± 1.9	21.9 ± 1.1	27				57.5 ± 1.3	59.5 ± 1.2
14			81.7 ± 1.4	82.9 ± 1.6	28				84.9 ± 1.3	87.6 ± 2.6

^a The more active compounds are highlighted in grey shade.

highly functionalized 4-aryloxyquinolines were obtained in a mild and operationally simple protocol, involving conventional heating. Method B: Synthesis of 4-methoxyquinolines A series of eight compounds containing a methoxy group in the fourth position were easily synthesized. Starting from the previously described 2-aryl-4-quinolones, the regioselective methylation of the oxygen proceeded smoothly by treatment with potassium carbonate and iodomethane in acetone at 65 °C. In this way 2-aryl-4-methoxyquinolines **18-25** were obtained in good yields (Scheme 1). Method C: Synthesis of 2-arylquinolines. A small group of 2-arylquinolines were synthesized via a Suzuki cross-coupling reaction. Thereby, starting from 2-bromoquinoline, the palladium-catalyzed cross coupling reaction with phenylboronic acid, 3,5-dimethylphenylboronic acid and 3,5-difluorophenylboronic acid respectively in a (1:1) mixture of toluene-water at 80 °C, led to the formation of the compounds **26-28** in modest yields after eight hours of reaction (Scheme 1).

Concerning the biological studies, the spore germination of *Mucor circinelloides* was the key part of this study. Accordingly, the spores as the infective form of the fungus were initially screened to identify the percentage of germination, thereby, the growth inhibition degree on two different strains which was determined after incubation with the synthesized quinolines. Due to the fact that germination represents the beginning of the invasive stage of *M. circinelloides*, the inhibition of this process by the synthesized compounds is interesting to observe. The first studied strain was the wild-type R7B and the second one was the M5 strain which is a mutant in the *adh1* gene and exhibits higher virulence compared with R7B.³⁴ In this first set of assays, all of the compounds **1-28** were tested at 100 µg/mL concentration in order to identify the more active compounds (Table 1).

Thus, the first group of assayed quinolines (**1-9**) containing a 4-phenoxy substituent displayed poor activity (c.a. 94% to 98% germination) for both strains when electron-neutral or electron-rich aryls (**1, 7 and 8**) were present at C-2 of the quinoline. Nevertheless, the quinoline with the heterocycle 1,3-benzodioxole (**9**) showed modestly good activity (c. a. 28% germination). For the chlorine-containing quinoline derivatives, low (**4**) to modest (**5 and 6**) activity was observed (36% to 89% germination). However, the fluorine-containing quinolines, displayed a remarkable substitution-dependent activity. If the fluorine was present at the 4-position of quinoline (**2**) we had only modest activity (39% germination), but if the fluorine was present at the 3, 5-positions (**3**) a very high activity was obtained and just 6.7% of germination for R7B strain was observed while a 4.5% of germination for the M5 strain. This difference in the activity for both strains may be due to the higher virulence of the M5 strain.

The following set of assayed quinolines (**10-16**) containing a 4-nitrophenoxy group behaved similarly. The quinolines with an electron-neutral (**10**) or electron-rich (**16**) aryl in the position 2 of the core, exhibited low biological activity and almost all the spores germinated (>98%). The chlorine-containing quinolines with the chlorine atom at 4 or 3, 4 (**14 and 15**) gave a poor activity (c.a. 81 to 83% germination), however if the chlorine is at the 3-position (**13**) a modestly good activity is observed (32% germination). For these compounds, the substitution-dependent activity is also present. Interestingly, this previous result was also obtained for the trifluoromethyl group at the 3-position (**12**). As expected, the 3, 5-difluoro-containing quinoline (**11**) displayed the best activity and only the 7.9% and 11.2% of germination was allowed for the R7B and M5 strains respectively.

Another group of 2-arylquinolines with a 4-methoxy group (**18-25**) was assayed. In this case, a dramatic decreasing in the biological activity was in general observed (**18, 21-25**) with exception of those fluorine-containing which displayed modest (**20**) (32% germination) to good activity (**19**) (c.a. 17% germination). In this case the 3, 5-difluoro pattern did not provide the best activity, instead, the fluorine in 4-position resulted in the best activity for this set of 4-methoxy compounds.

At this point of our assays, the analysis of the obtained results preliminarily indicated three important structure-activity characteristics: 1) the 3, 5-difluoro substitution in the aryl at C-2 position of the

quinoline core, is absolutely necessary to get good biological activity (germination < 8%) for 4-aryloxy derivatives, 2) the presence of a 4-aryloxy group may increase the biological activity, based upon the fact almost all of the 4-methoxy derivatives with exception of those fluorine-containing, resulted inactive; and 3) the electron-neutral or electron-rich substituted aryls in C-2 of the quinoline drastically diminish the biological activity of the compound.

Considering the previous preliminary conclusions, we decided to carry out additional assays using 2-arylquinolines without any substituent in the fourth position of the core but containing a phenyl (**26**), or a 3, 5-difluorophenyl (**27**) or a 3, 5-dimethylphenyl substituent in C-2 of the quinoline. As previously observed, the electron-neutral (**26**) and electron-rich (**28**) derivatives resulted almost inactive (c.a. 84 to 98% germination). For the case of the 3, 5-difluoro derivative (**27**) a modest biological activity was observed (57.5% germination). These obtained results confirmed our preliminary second and third conclusions (Table 1).

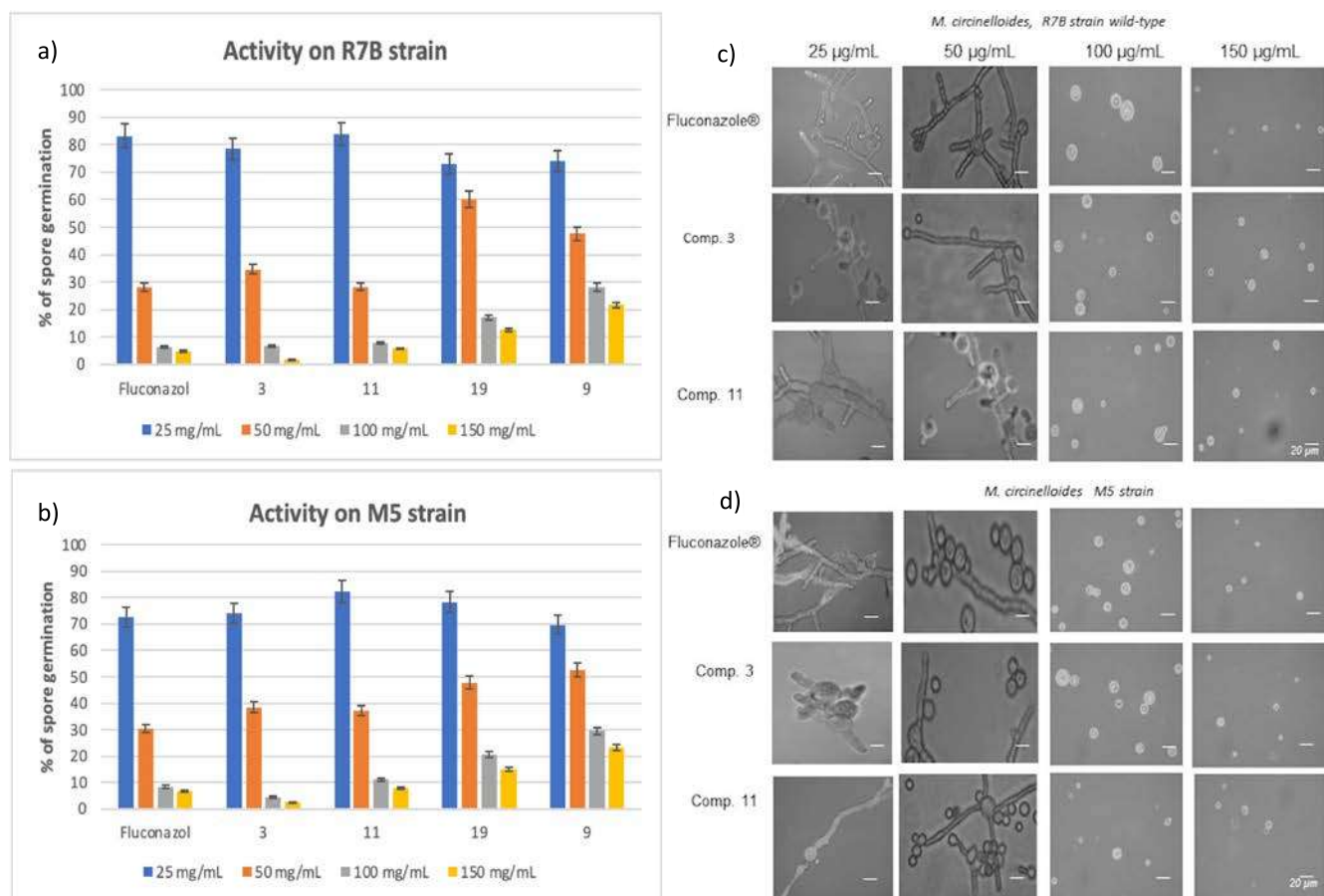
To complete these initial biological assays of activity, an inoculum of the tested cultures from compounds **3, 9, 11 and 19** as well as from the fluconazole culture, was randomly taken and seeded in a fresh YPG media in absence of any compound. After its cultivation for 12 hours under standard conditions, we observed the spore germination and growth of the fungus in all the five cultures. This experiment indicated that fluconazole as well as our quinoline derivatives displayed fungistatic activity on both strains.

With previous results at hand, we chose the aforementioned compounds **3, 9, 11 and 19** as the more representative active and we proceeded to test them at different concentrations to determine if at lower or higher concentration a better or same of fungistatic activity could be observed (Scheme 2). Accordingly, additional concentrations of 150, 50 and 25 µg/mL were explored for these quinolines (Table 1).

According to the Table 2, for these additional assays the compounds **3 and 11** were the more active at concentrations higher than 25 µg/mL. Also, commercially available fluconazole was used as a known reference antimycotic compound. Screening of the compounds **3, 11, 19 and 9** at 25 µg/mL concentration, all resulted with poor activity (c.a. 70% to 83% germination) for both strains and a similar effect was observed with the same fluconazole concentration. The test at 50 µg/mL considerably increased the compounds activity. In these cases, a modest effect (c.a. 47% to 60% germination) for compounds **9 and 19**; to modestly good effect (c.a. 20% to 37% germination) was observed for quinolines **3 and 11**. Finally, the activity for this set of four compounds (**3, 11, 19 and 9**) showed good (c.a. 12% to 23% germination) to very good activity (c.a. 1.7% to 7.9% germination) when incubated at 150 µg/mL concentration on both strains.

Regarding the comparison against the fluconazole activity, two different behaviors can be identified. Concerning the activity on the M5 strain (Scheme 2b), the compound **3** remarkably displayed a consistent better activity in 100 and 150 µg/mL assayed concentrations and resulted a better fungistatic than fluconazole. The activity for R7B strain (Scheme 2a) was comparable in 100 µg/mL and 2.8-fold better in 150 µg/mL compared with fluconazole.

The obtained microscopic images for the different assayed concentrations of the compounds **3, 11** and fluconazole on the R7B strain (Scheme 2c) and the M5 strain (Scheme 2d) showed essentially full spore germination when incubated at 25 µg/mL. Herein a morphogenetic differentiation into hyphae was observed. On the other hand, significantly decreased spore germination in general was observed when the concentration was increased at 50 µg/mL. In this case few mycelia in mix with several spores which did not get the germination and differentiation into hyphae were observed; this indicates the fungistatic effect of the compounds (Scheme 2c and 2d). Finally, when the tests were carried out at 100 µg/mL and 150 µg/mL the complete absence of mycelia can be clearly appreciated, and only non-germinated spores were observed. Herein is important to highlight the increased number of observed spores for the more active compounds which indicate a higher



Scheme 2. Determination of the spore germination percentage on a) R7B and b) M5 strains for compounds **3**, **11**, **19**, and **9** at concentrations of 25, 50, 100 and 150 µg/mL. c) Microscopic observations of the R7B and d) M5 strains in the presence of fluconazole and the more active fungistatic compounds **3** and **11**.

Table 2

In vitro percentage of spore germination for the wild-type R7B and mutant M5 strains of *Mucor circinelloides* at 150, 50 and 25 µg/mL of the more active compounds **3**, **9**, **11** and **19**.

compound	25 µg/mL		50 µg/mL		100 µg/mL		150 µg/mL	
	R7B	M5	R7B	M5	R7B	M5	R7B	M5
3	78.5 ± 2.1	74.2 ± 2.9	34.7 ± 2.5	38.5 ± 2.9	6.7 ± 1.2	4.5 ± 1.7	1.7 ± 0.5	2.5 ± 0.6
11	83.9 ± 3.9	82.5 ± 3.2	28.3 ± 1.5	37.3 ± 1.9	7.9 ± 0.5	11.2 ± 0.4	5.8 ± 0.5	7.9 ± 0.5
19	73.1 ± 2.8	78.4 ± 2.8	60.3 ± 1.6	47.9 ± 2.7	17.1 ± 1.1	20.6 ± 0.5	12.6 ± 0.8	14.9 ± 0.8
9	74.2 ± 3.6	69.7 ± 3.8	47.6 ± 2.6	52.8 ± 2.8	28.2 ± 1.4	29.5 ± 1.2	21.6 ± 1.1	23.4 ± 1.2
Fluconazole	83.3 ± 4.4	72.6 ± 3.2	28.2 ± 1.6	30.4 ± 1.4	6.4 ± 0.5	8.4 ± 0.1	4.8 ± 0.4	6.7 ± 0.9

percentage of non-germination compared against those photos with few spores that indicate more germination, in consequence less-active compounds (Scheme 2c and 2d).

Fluconazole is fungistatic rather than fungicidal, in consequence its treatment provides the opportunity for developing acquired resistance in the presence of this antifungal,³⁵ for this reason, the search for other compounds with a quinoline scaffold for new antifungal activities is important and has been revised.³⁶ Herein, we present the compounds **3** and **11** as potential candidates and as alternative or iterative treatment to Fluconazole. This strategy could prevent totally or partially the plausible acquired resistance. Additionally, it is important to point that preparation of compounds **3** and **11** involves a less-expensive-reagent synthetic route.³⁷ HYPERLINK "SPS:refid::bib37"

To complete the activity scope of our synthesized quinoline-based antifungals, the fungistatic activity on different dermatophytes and opportunistic fungi was explored. We considered of the highest relevance to explore whether if our most active fungistatic 4-aryloxyquinoline **3**, resulted active exclusively against the R7B and M5 wild strains

of *Mucor circinelloides*, or if could act significantly against other related pathogenic dermatophytes and opportunistic fungi within relevant fungistatic activity. In such a way, several clinical isolated fungi species with different strains were assayed to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) using compound **3** in comparison to fluconazole (Table 3).

The fungistatic activity of the compound **3** against human-affecting pathogenic dermatophytes *Microsporum canis* and *Microsporum gypsum*, were assayed on five different strains. We found a MIC of 100 µg/mL with compound **3** and of 50 µg/mL with fluconazole. In this range of concentration was found the MIC of compound **3** for the M5 strain of *Mucor circinelloides*, while with fluconazole the MIC resulted higher than 150 µg/mL (Table 2), indicating a much better fungistatic activity of our 4-aryloxyquinoline **3**. Also, other pathogenic dermatophytes such as *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* as well as *Epidermophyton floccosum* resulted in poor spore germination in presence of compound **3**; in these cases, the MIC of compound **3** was 125 µg/mL for the dermatophytes in contrast to 75 µg/mL and 50 µg/mL of fluconazole

Table 3

Determination of the MIC for compound **3** compared with fluconazole in different species and strains of pathogenic clinical isolated dermatophytes and opportunistic fungi^a.

Species	Strain ^c	MIC ^b	
		Compound 3	Fluconazole
<i>Microsporum canis</i>	1	100 µg / mL	50 µg / mL
	2		
	3		
<i>Microsporum gypseum</i>	1	100 µg / mL	50 µg / mL
	2		
<i>Mucor circinelloides</i>	M5	100 µg / mL	> 150 µg / mL
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	125 µg / mL	75 µg / mL
	2		
	3		
<i>Trichophyton rubrum</i>	1	125 µg / mL	75 µg / mL
	2		
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	125 µg / mL	50 µg / mL
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	150 µg / mL	50 µg / mL
	2		
<i>Aspergillus niger</i>	1	150 µg / mL	50 µg / mL
<i>Mucor circinelloides</i>	R7B	150 µg / mL	150 µg / mL

^aWith exception of *Mucor circinelloides*, all of the fungi species are clinical isolated.

^bMIC represents the concentration which the spore germination is < 5%.

^cDifferent assayed strains of the clinical isolated species.

for *Trichophyton sp.* and *Epidermophyton sp.* respectively. Finally, the opportunistic fungi *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* were also affected by compound **3**, resulting in a MIC of 150 µg/mL while with fluconazole a MIC of 50 µg/mL was determined. Also, *Mucor circinelloides* R7B had a MIC of 150 µg/mL for both, compound **3** and fluconazole (Table 3). These results clearly indicated that our fungistatic 4-aryloxyquinoline **3** resulted active against all the assayed pathogenic and opportunistic fungi, however except for *Mucor circinelloides*, the fluconazole resulted more active than derivative **3**. It is important to highlight that in the case of *Mucor circinelloides*, the MIC for fluconazole is in the best case equal (for R7B strain) to derivative **3**, however for the M5 strain, fluconazole showed to be much less active. This interesting result open the possibility to continue exploring the rationalized chemical modification of compound **3** in order to get a more active fungistatic quinoline-based chemotype which could be potentially applied in the *Mucormycosis* treatment.

On the other hand, considering the antifungal effect could be related to a wide spectrum of cellular toxicity, we decided to show usefulness of compound **3** and **11** as fungistatics. Accordingly, we examined whether these compounds are cytotoxic for mammalian cells or not in comparison with fluconazole. The activity was explored in NIH-3T3 mouse fibroblasts at 0, 25, 50, 100, 150 and 200 µg/mL respectively and cultured by incubation for 48 h. Cell proliferation was evaluated by measuring the enzymatic activity of reductase by transforming 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) bromide into a coloured

Table 4

Evaluation of the cytotoxicity as % of cell viability for the fungistatics **3** and **11** compared against fluconazole in NIH-3 T3 mouse fibroblast.^a

compound	% of Cell Viability ^b				
	25 [µg/mL]	50 [µg/mL]	100 [µg/mL]	150 [µg/mL]	200 [µg/mL]
3	90.7 ± 9.2	53.3 ± 5.1	20.4 ± 8.4	15.0 ± 1.2	12.6 ± 1.2
11	94.5 ± 6.0	91.8 ± 5.8	84.0 ± 9.6	18.3 ± 2.4	15.5 ± 3.1
Fluconazole	98.2 ± 3.0	25.0 ± 2.9	18.8 ± 1.1	15.5 ± 1.5	15.7 ± 5.4

^a NIH-3 T3 mouse fibroblasts were cultivated in the absence of **3**, **11** or fluconazole as positive control obtaining a cell growth with cell viability of 93.8 ± 4.9%.

^b Colour code according to ISO 10993 as follow: green (non- cytotoxic), yellow (slightly cytotoxic) orange (moderately cytotoxic) and red (extremely cytotoxic).

reduced form (Table 4).³⁸

The biological assays results showed a non-cytotoxic compound **11** at 100 µg/mL (84% cell viability), a slightly cytotoxicity compound **3** at 50 µg/mL (53.3% cell viability) and an moderately toxic fluconazole at 25 µg/mL (25% cell viability). Therefore, these results show a greater cytocompatibility of the compounds **3** and **11** than fluconazole, which eventually will allow us to explore its use *in vivo* models. The cytotoxicity level was identified based on ISO 10993,³⁹ where the cytotoxicity classification based on the percentage of cell viability stands out as follow: non-cytotoxic (100-75%), slightly cytotoxic (74-50%), moderately cytotoxic (49-25%) and extremely cytotoxic (24-0%).

According to the obtained results, a quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis was carried out. Thus, we anticipated a promising couple of new fungistatic quinoline-based scaffolds (**3** and **11**) which displayed comparable (compound **11**) or better (compound **3**) biological activity than fluconazole. In consequence we considered that a structure-activity analysis is crucial to explain the behavior of the biological activity as result of the explored substitution-pattern in the quinoline core.

Although the biological activity for the tested compounds is evident, the active site of the described compounds is still unknown. From a SAR (Structure Activity Relationship) analysis, it was possible to conclude that the groups in the substituted phenyl group at C-2 position of the quinoline influence the activity of the compounds. In general, electro-attractor groups favors while electro-donors affect negatively. However, some compounds do not match this prediction. Therefore, in order to explain the relationship between the structure in the series of compounds and their activity in the percentage of germination, a study of structure-quantitative activity relationship (QSAR) was carried out. For this analysis, the method of genetic algorithms by artificial intelligence was used. Additionally, it was exclusively considered the analogous series of quinolines substituted with the phenoxy and 4-nitrophenoxy groups at C-4 of the quinoline. Thus, 1664 physicochemical descriptors were determined for compounds **1-17** and were subjected to evolution using Dragon and MobyDigs (TALETE srl.) software. Afterwards 50 models were obtained as “best”, multiple linear regression products with the highest statistical validation considering the lowest number of descriptors. From these, two mathematical models were selected that showed low correlation between the descriptors thus avoiding redundancy between them.

The models are described in equations (1) and (2) and the statistical

Table 5

Statistical parameters of the equations (1) and (2) (n = 17)

Equation	R	s	F _{calc} / F _{table}	Q2	SPRESS
42SPAN + 304Mor13v – 1410G2m + 318	0.876	0.127	9.571	0.790	1.649
32SPAN + 103Mor13e – 245Mor23p – 937G2m – 220	0.921	0.105	11.818	0.867	1.367

parameters are summarized in Table 5.

$$\%GERMINATION = 42SPAN + 304Mor13v - 1410G2m + 318 \quad (1)$$

$$\%GERMINATION = 32SPAN + 103Mor13e - 245Mor23p - 937G2m - 220 \quad (2)$$

The values of the molecular descriptors are shown in Table 6. SPAN, is a geometric descriptor related to the radius of the molecular sphere while the Mor13e, Mor13v and Mor23p descriptors are related to Sanderson's electronegativities, van der Waals atomic volumes and atomic polarizability. The G2m descriptor is related to molecular size, shape, symmetry, and distribution of atoms.

According to the QSAR results, it is evident that geometry plays an important role in the compounds activity so we then considered that the compounds conformation could affect the value of the descriptors and therefore of the activity. If true, information on possible interaction with the recipient would be obtained. Therefore, a conformational analysis using computational methods was performed using the Monte Carlo search method based on molecular mechanics and identifying the lowest energy conformer by means of single point energy calculation with a theory level of B3LYP/6-31G(d). Two main conformers were found: *I* and *II* with respect to the benzene ring of quinoline (Figure 1). A very low energy difference was found between the two conformers, which is not significant enough to observe both at room temperature, but it may be important from the point of view of molecular recognition with its receptor because of the well-known topology of interaction of ligands with their molecular targets. A molecular superposition analysis for all synthesized quinolines showed the conformational similarity between the *syn*- and *anti*-groups (*I*- and *II*-conformers, see figure 1) of compounds and it is worth mentioning that, except for compound 9, all of them have preference over the *anti*-geometry with energy difference ranging from 0.25 to 3.25 kcal/mol. This result is interesting because compound 9 is the only one with electron-donating substitutes at C-2 of quinoline and is also active despite having electron-donating substituents.

Although no correlation was found between the difference in energy of the two conformers and the biological activity; the descriptors obtained from both conformers were, as expected, different in magnitude. Their values were incorporated into equations (1) and (2). A high correlation was found between calculated and experimental activity when treating the *I*-conformer, contrary to the *II*-conformer (Figure 1).

From the results summarized in Table 6 as well as from the high correlation found between the experimental data and those calculated from equations (1) and (2) (Figure 2a and 2b), both QSAR models

explain the biological activity as a function of their geometric and physicochemical properties (Sanderson's electronegativities, van der Waals atomic volumes and atomic polarizability) for the *I*-conformer exclusively while for the *II*-conformer no correlation could be found. Although we do not know the mechanism of molecular action and therefore the receptor on which these compounds act, the present information is useful to design analogous structures that favor the *I*-conformer or generate similar structures with anchored geometry.

To the best of our knowledge, the synthesized 4-aryloxy- and 4-methoxyquinolines tested in this work have not been previously described on the inhibition of fungal growth, in consequence the molecular mechanism of action is unknown. However, after a careful analysis, it is possible to visualize certain structural analogy when comparing the 2-aryl-4-aryloxyquinolines with fluconazole structures (Figure 3). Accordingly, we considered this molecular similarity to carry out a Docking study as a good start in the search for a possible target and action mechanism of our assayed compounds, which could be through the inhibition of 14 α -steroidesmethylase, that is, the action target of fluconazole.

Thus, to have supportive elements to direct biological studies in the future, a docking study was carried out considering as a possible molecular target the cytochrome P450 14 α -steroidesmethylase (Cyp51), which is an essential enzyme in the synthesis of sterols in eukaryotic cells. First, to validate the procedure, docking with fluconazole was performed (Figure 4). Herein is illustrated the comparison of the docking result obtained from fluconazole binding to the enzyme obtained from the crystal with PDB code 1EA1 against the same crystal structure, obtaining a fit with RMSD of 0.504. The interactions exhibited by the reference ligand Fluconazole with the 1EA1 protein are illustrated in Figure 4A. The coordination of the triazole ring with the iron atom of the heme group stands out, as well as two other important interactions, a π - π stacked between the second heterocycle with the amino acid residues TYR76 and PHE78 and another p-cation of the difluorophenyl with the amino acid residue ARG96 (Figure 4B).

After docking with fluconazole, we proceeded to analyze the interactions of our synthesized quinoline derivatives with Cyp51. From the series of compounds 1-17, compound 3 with an electron-poor aryl (3,5-difluorophenyl) at C-2 of quinoline was the most active. On the other hand, compound 9 which contains an electron-rich aryl (1,3-benzodioxole) at C-2 of quinoline, also showed good activity in growth inhibition. Therefore, these two compounds were selected to carry out the docking study (Figure 5). We found that both compounds 3 (figure 5A) and 9 (figure 5B) gave a thermodynamically favored interaction at the cytochrome P450 recognition site. The two ligands exhibited similar

Table 6

Comparison between experimental and calculated values obtained for compounds 1–17 (strain M5 at 100 μ g/mL) in their *I*- and *II*-conformations. The calculated descriptors in the QSAR models are shown.

Molecular descriptor Compound	SPAN	Mor13e	Mor13v	Mor23p	G2m	%Germination Experimental	Calculated Equation (1)		Calculated Equation (2)	
							<i>I</i> -conformer	<i>II</i> -conformer	<i>I</i> -conformer	<i>II</i> -conformer
1	7.00	-0.39	-0.96	-1.19	0.16	98	95	48	105	47
2	6.80	-0.82	-1.12	-1.13	0.16	39	38	39	40	36
3	6.90	-0.86	-1.23	-1.00	0.16	5	8	35	7	34
4	6.90	-0.53	-1.00	-1.18	0.16	86	78	38	85	41
5	7.00	-0.47	-1.00	-1.07	0.20	32	26	42	30	46
6	7.40	-0.48	-1.00	-1.04	0.18	58	71	50	54	59
7	8.30	-0.81	-1.13	-1.20	0.17	92	83	89	97	90
8	7.90	-0.65	-1.03	-1.20	0.17	98	97	82	101	78
9	7.30	-1.02	-1.20	-1.15	0.17	30	20	40	31	32
10	7.70	-0.41	-1.08	-0.97	0.16	70	87	66	72	59
11	7.20	-0.70	-1.26	-0.94	0.16	11	12	54	19	53
12	7.50	-0.54	-1.17	-0.98	0.17	30	38	56	45	54
13	7.20	-0.42	-1.10	-0.97	0.18	22	32	72	36	69
14	7.50	-0.34	-1.09	-1.00	0.16	83	76	64	80	61
15	7.70	-0.40	-1.09	-0.99	0.17	86	70	71	68	74
16	8.30	-0.15	-1.09	-0.94	0.17	98	96	90	101	96
17	7.40	-0.71	-1.17	-1.00	0.16	38	48	47	39	57

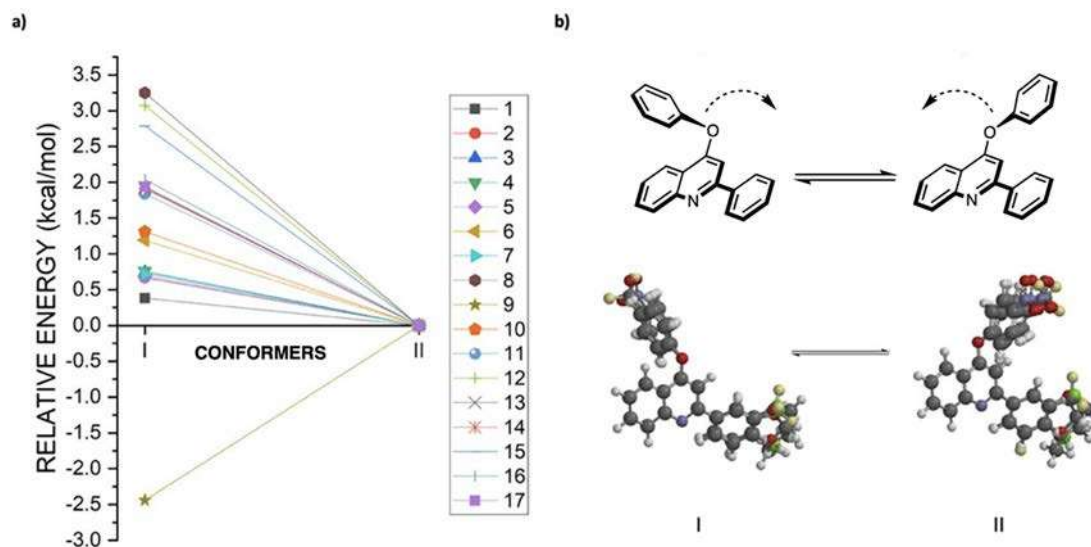


Figure 1. a) Relative energy-difference of compounds 1–17 between *I*- and *II*-conformations is shown with arbitrarily assigning a value of zero to all the *II*-conformer structures. b) Superposition of structures 1–17 in their respective *I* and *II*-conformations as used in the QSAR study.

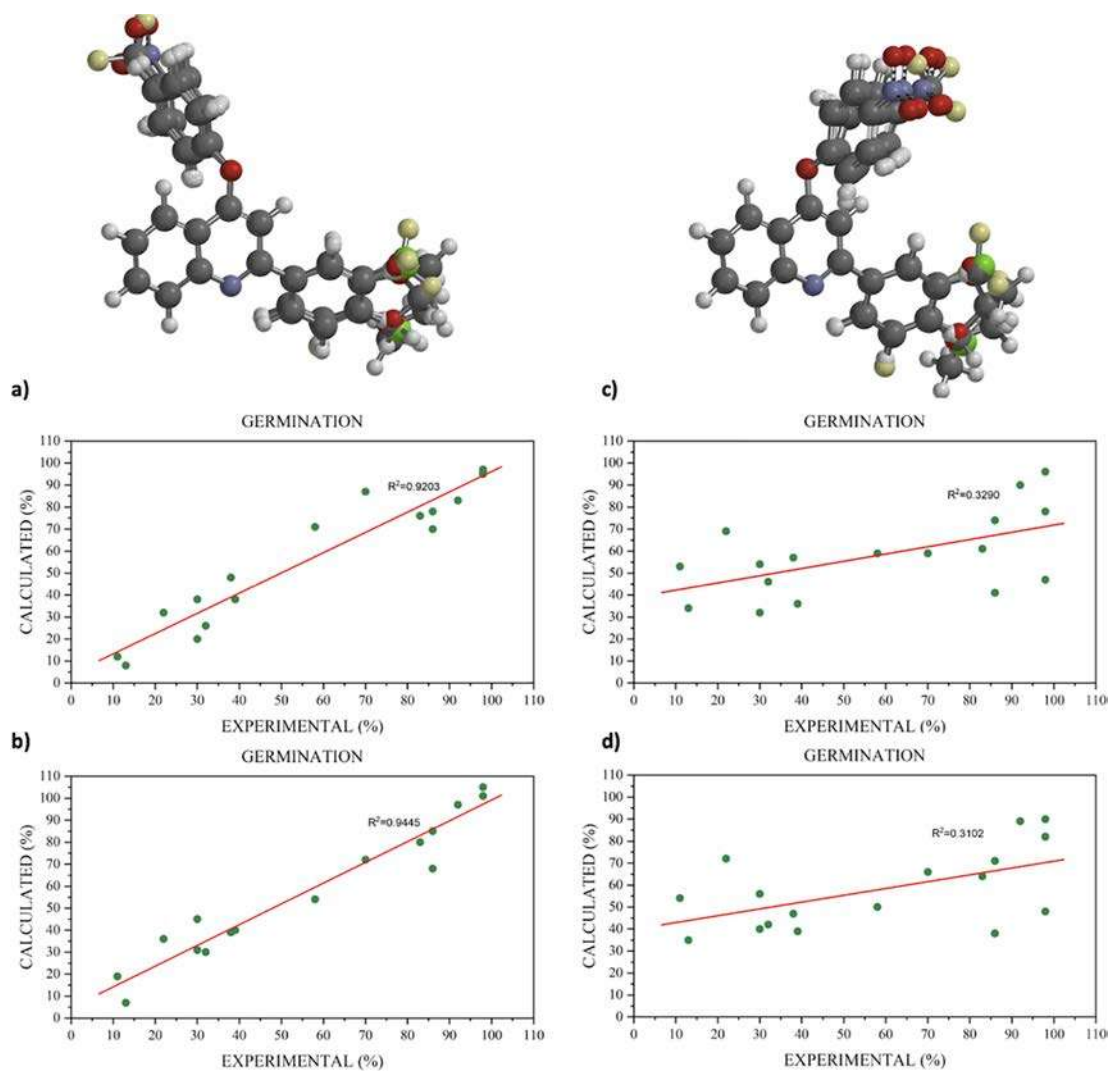


Figure 2. Experimental vs predicted (% germination from QSAR models) activity according to: a) eq. (1) for *I*-conformer, b) eq. (2) for *I*-conformer, c) eq. (1) for *II*-conformer and d) eq. (2) for *II*-conformer.

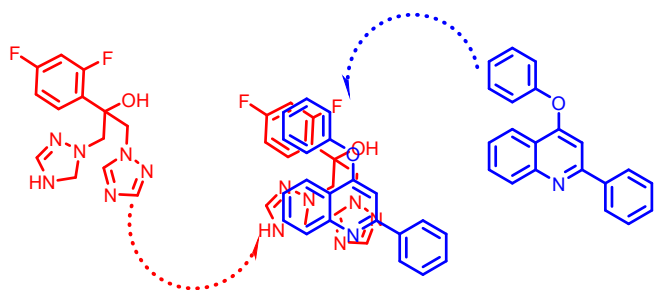


Figure 3. Contrast between structure of fluconazole and the synthesized quinolines core.

interactions compared with those showed by fluconazole, including the interactions with the amino acid residues TYR76, PHE78, and HIS259 in the heme group.

It is remarkable that the conformation adopted by the most active compound **3** in the active site (figure 5A), corresponds to the *I*-conformer (see Figure 1). This result fully agrees with the obtained result in our QSAR study in which this conformation explains its activity. On the other hand, although **9** is not the most active of the compounds, its relative stability contrasts, when compared to the rest of the compounds, having a preference for conformation I (-3.5 kcal·mol⁻¹) (see Figure 1a) but interestingly it shows a significant interaction at the fluconazole recognition site (Figure 5B) through the conformation adopted for form II. This is contrary to what was observed for the other compounds and expected by the QSAR model. Moreover, a superposition of **9** with fluconazole (Figure 6), obtained in docking, allows to visualize that in the geometric arrangement for the active site, both triazols of fluconazole match with the benzenic ring and with the 1,3-benzodioxole at C-2 of quinoline, while the 4-aryloxy group matches with the 3,5-difluorophenyl of fluconazole.

Finally, we decided to carry out a docking study for the active 4-methoxyquinoline compounds. Although we have not enough examples of the 4-methoxylated derivatives **18-25** (n=7) to obtain a

statistically significant QSAR analysis, we performed a Docking study for compound **19**, which is the most active quinoline of this series. We also found a favored interaction with CYP51 (Figure 7). Even though the recognition geometry changes in the active site with respect to compounds **3** and **9** (see figure 5), the phenyl group at C-2 of compound **19** contributes with one of the most predominant interactions, as occurs in **3** and **9** compounds. This indicates the importance of the aryl group substituent at C-2 of quinoline core in both, 4-aryloxy- and 4-methoxy-quinoline series.

Considering the Docking studies which displayed very favored interactions at 14 α -steroid demethylase (Cyp51) for **3**, we got additional elements to support and postulate this enzyme as the plausible action site of our synthesized quinolines. Thus, we decided to experimentally test if the enzymatic activity is affected by our most active compounds **3** and **11** at different concentrations (25, 50, 100, 150 and 200 μ g/mL). In such way the target enzyme was obtained from the NIH-3T3 mouse fibroblast (see SI) and different experiments were carried using lanosterol-14 α -desmethylase (CYP51)-specific immuno-analysis (ELISA) for determining the enzymatic activity which was also compared against the fungistatic of reference fluconazole (Table 7).

The obtained results showed very similar effects for the fluconazole and quinolines **3** and **11** in every assayed concentration. In such way, modest enzymatic inhibition was observed at 25 μ g/mL, while in 50 μ g/mL a reduction up to close to the 50% of enzymatic activity is observed. However, a strong inhibition of the enzymatic activity occurs at 150 μ g/mL, displaying levels of < 4 (U / mg prot). Finally assays at 200 μ g/mL resulted in the complete inhibition of enzymatic activity for fluconazole, a very few of activity for quinoline **11** and slightly higher for **3** (0.4 and 1.18 u/mg prot respectively). These experiments demonstrate that our quinolines **3** and **11** acted similarly to the commercial fungistatic fluconazole in the proposed action site lanosterol-14 α -desmethylase (CYP51) as well as in the efficacy for inhibiting the enzymatic activity.

In conclusion, we discovered two new fungistatic 2-aryl-4-aryloxy-quinolines-based compounds whose biological activity in one case is comparable (compound **11**) and in another case resulted better

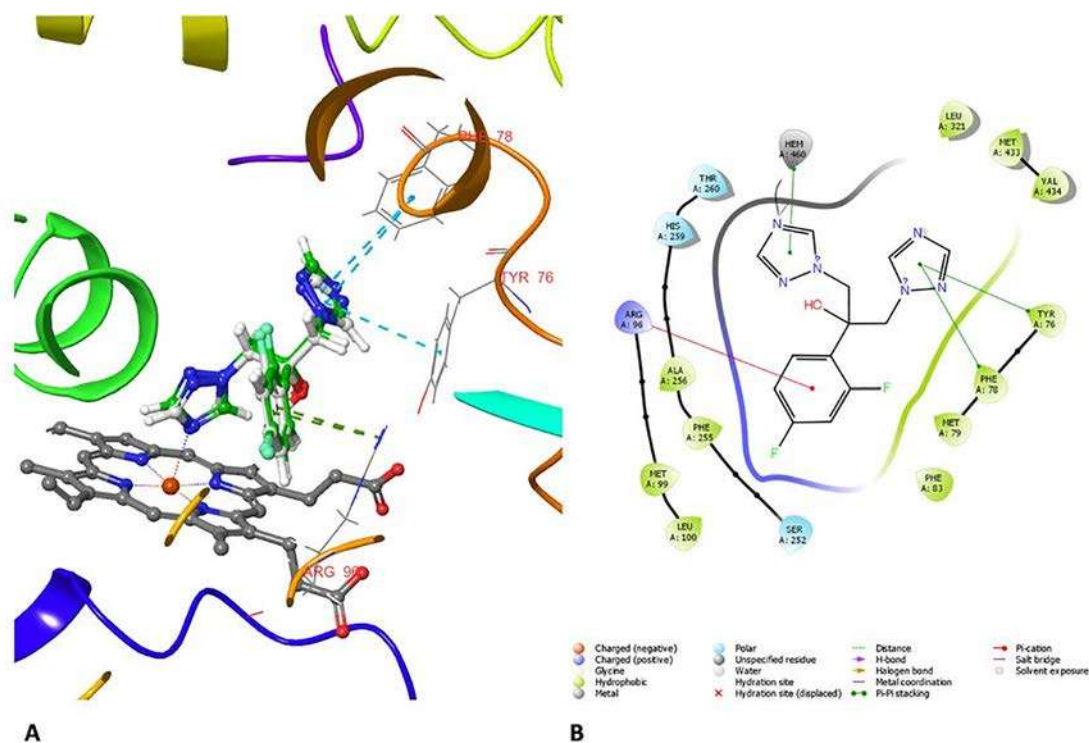


Figure 4. A) RMSD of fluconazole pose obtained from docking (green) and obtained from crystal; PDB code: 1EA1 (white). B) Interaction diagram of fluconazole. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

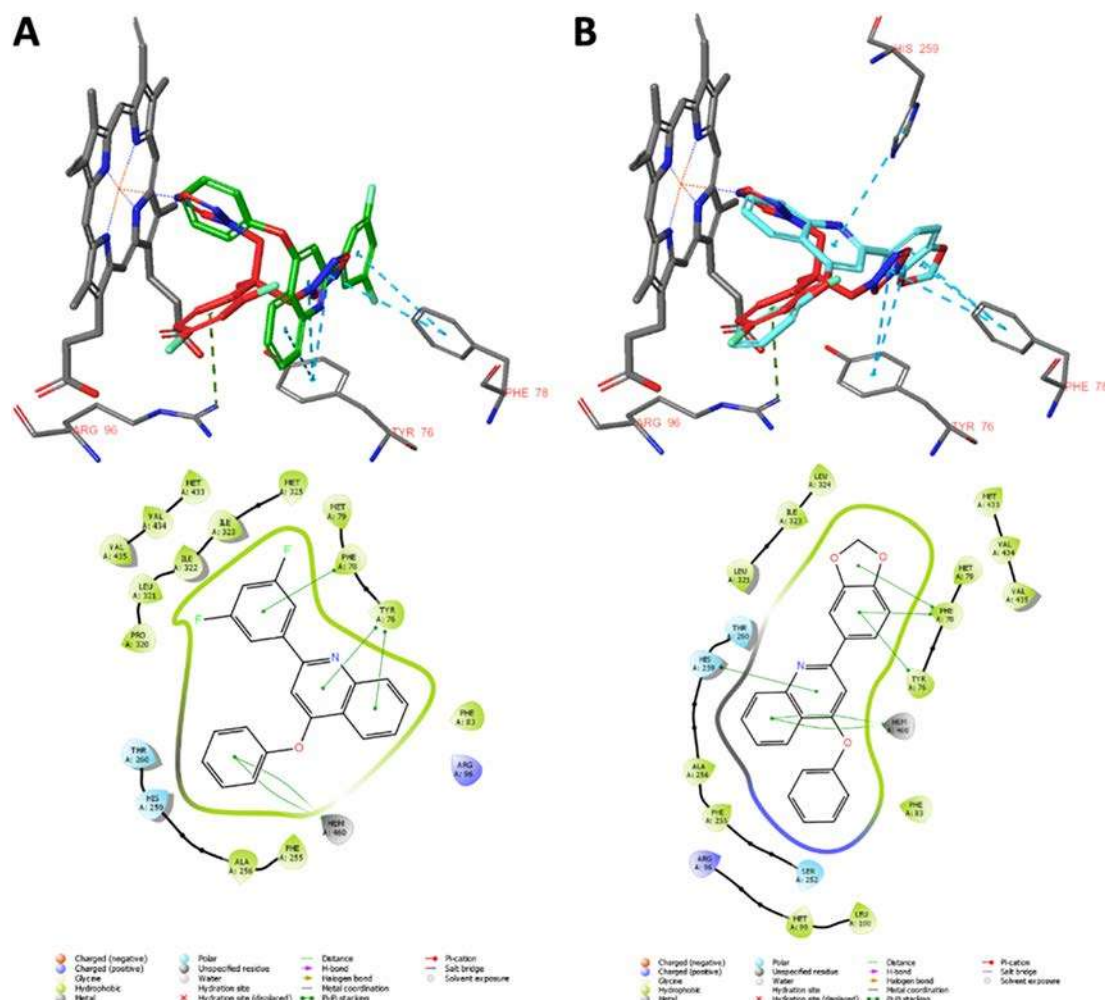


Figure 5. Interaction diagram pose obtained from docking for fluconazole (in red) and: A) compound **3** and B) compound **9**. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

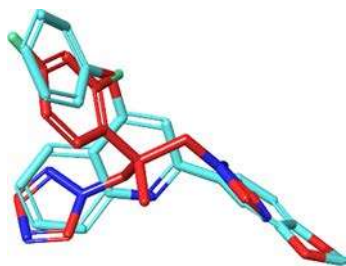


Figure 6. Comparison of fluconazole (red) and compound **9** as obtained from the corresponding docking output structures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(compound **3**) than commercially available fluconazole against the R7B and M5 strains of *Mucor circinelloides*. The introduction of a phenoxy or 4-nitrophenoxy group at C-4 position of the quinoline core as well as the presence of two fluorine atoms at 3 and 5-positions of the phenyl group at C-2 position of the quinoline nucleus were crucial for the best fungistatic activity against R7B and M5 strains of *Mucor circinelloides*. Our QSAR analysis explained that the best biological activity is conformationally-dependent where the *I*-conformer is the molecular active predicted form. On the other hand, under the geometric and molecular similitude between the 2-aryl-4-methoxy- and 2-aryl-4-

aryloxyquinoline core with the corresponding of the fluconazole; the analysis of the possible molecular target and/or action mechanism was focused on the CYP51 which is the described action target of fluconazole. Thus, in the docking study, we found a thermodynamically favored interaction of the most active quinoline **3** with CYP51 at the cytochrome P450. The same favorable interaction was found for compounds **9** and **19** of 4-methoxyquinoline series. This study revealed the importance of an aryl group at C-2 of the quinoline nucleus which makes a very important contribution in their compound interaction. Additionally, enzymatic-inhibition assays in lanosterol-14 α -desmethylase (CYP51) by testing fluconazole, quinolines **3** and **11** at different concentrations; revealed the complete enzymatic inhibition at 150-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, these assays give additionally elements for pointing to this enzyme as the action site. Based upon this, we could conclude the plausible CYP51 enzyme inhibition by our compounds which in consequence would inhibit the spore germination on *Mucor circinelloides* by interrupting the ergosterol synthesis. Although these experimental and computational analysis results are not definitive about the receptor interaction, they provided useful information for the design of new 2-aryl-4-aryloxyquinolines-based chemotypes with higher probabilities of increasing the fungistatic activity. Regarding our synthesized compounds, these new derivatives are excellent candidates as plausible alternatives to the known fungistatic treatment with fluconazole. Additionally, some advantages such as an easier, shorter and less-expensive-reagent synthetic route can be highlighted. The compounds **3** and **11** could be potentially used as iterative treatment for preventing the fungus resistance. In light

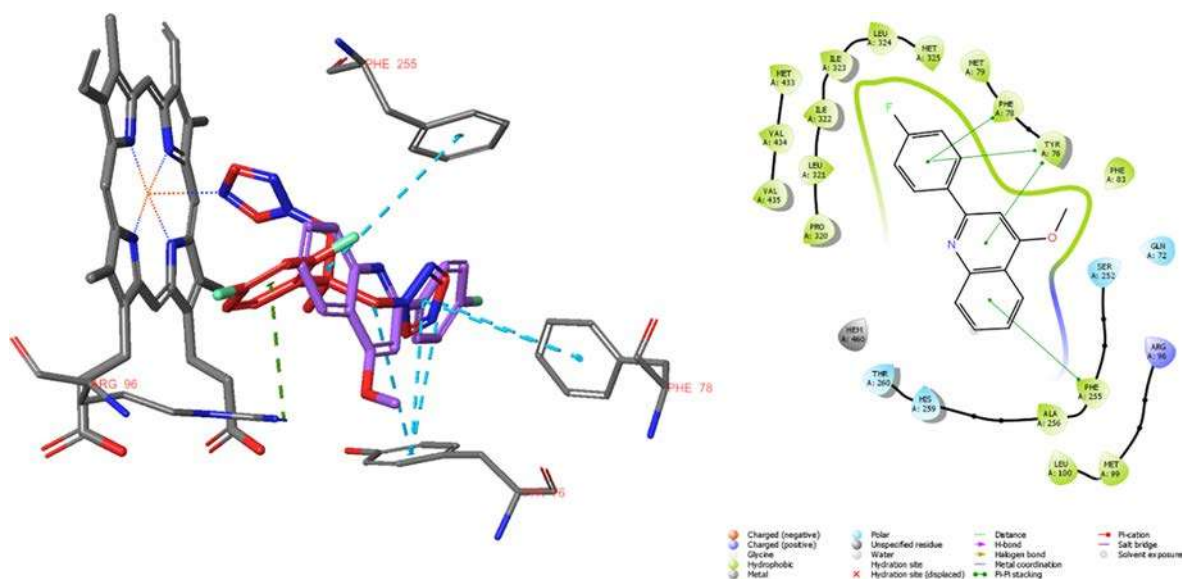


Figure 7. Interaction diagram pose obtained from docking for compound 19.

Table 7

Determination of the lanosterol-14 α -desmethylase (CYP51) specific enzymatic activity

	Specific Enzymatic Activity (U / mg prot) ^{a,b,c}				
	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	150 μ g/mL	200 μ g/mL
Fluconazole	12.8 \pm 0.61	7.18 \pm 0.19	2.49 \pm 0.02	1.25 \pm 0.12	0 \pm 0
11	16.70 \pm 1.08	11.21 \pm 1.36	6.02 \pm 0.93	2.56 \pm 0.37	0.40 \pm 0.06
3	17.96 \pm 0.81	13.12 \pm 0.74	6.76 \pm 0.23	3.28 \pm 0.39	1.18 \pm 0.06
Compound []	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL	150 μ g/mL	200 μ g/mL

^a Based on the followed protocol the highest activity to be observed by the enzyme is 20 (U / mg prot)

^b The results are the average of three assays.

^c The triplicate of control experiment resulted in 19.44 \pm 0.57 (U / mg prot)

of the few pharmacological treatments for attending mucormycosis, the compounds 3 and 11 can eventually be postulated as potentially strong candidates for a treatment.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by The Office of Support to Research and Postgraduate of Guanajuato University (UG-DAIP). We acknowledge the facilities of the DCNyE, the Chemistry Department and the National Laboratory UG-CONACyT (LACAPFEM) at the University of Guanajuato. We also thank CONACyT for fellowship to PDN.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128649>.

References

- [1] Richardson M. *CMI*. 2009;15:2. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02972.x>.
- [2] Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. *CMR*. 2000;13:236. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.236-301.2000>.
- [3] Mendoza L, Vilela R, Voelz K, Ibrahim AS, Voigt K, Lee SC. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* 2014;5:1. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019562>.
- [4] Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, et al. *Clin Infect Dis.* 2005;41:634. <https://doi.org/10.1086/432579>.
- [5] Serris A, Danion AF, Lanternier F. *J. Fungi*. 2019;5:23. <https://doi.org/10.3390/jof5010023>.
- [6] Lewis RE, Georgiadou SP, Sampsonas F, Chamilos G, Kontoyiannis DP. *Mycoses*. 2013;57:49. <https://doi.org/10.1111/myc.12101>.
- [7] Walsh TJ, Hospenthal DR, Petraitis V, Kontoyiannis DP. *J. Fungi*. 2019;5:57. <https://doi.org/10.3390/jof5030057>.
- [8] Gomes MZR, Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011;24:411. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-10>.
- [9] Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2006;25:215. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0107-1>.
- [10] S. Ibrahim, B. Spellberg. *Zygomycetes as agents of infectious disease in humans, in Molecular Principals of Fungal Pathogenesis* (Eds: J. Heitman, S. Filler, Edwards, Jr. J, A. Mitchell), ASM Press, Washington, 2006, chapter 29. DOI: 10.1128/9781555815776.ch29.
- [11] Mendoza L, Vilela R, Voelz K, Ibrahim AS, Voigt K, Lee SC. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* 2015;5(a019562):1. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019562>.
- [12] Bartnicki-Garcia S. *Bacteriol. Rev.* 1963;27:293.
- [13] Inderlied CB, Sypherd PS. *J. Bacteriol.* 1978;133:1282.
- [14] Orłowski M. *Microbiol. Rev.* 1991;55:234.
- [15] McIntyre M, Breum J, Arnau J, Nielsen J. *Appl. Microbiol. Biot.* 2002;58:495. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0916-1>.
- [16] Lübbühnen TL, Nielsen J, McIntyre M. *Mycol. Res.* 2003;107:223. <https://doi.org/10.1017/s0953756203007299>.
- [17] Lee SC, Li A, Calo S, Heitman J. *PLOS Pathog.* 2013;9:1. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>.
- [18] Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Future Microbiol.* 2013;8:1163. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.78>.
- [19] Rogers TR. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;61, i35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm429>.
- [20] Achan J, Talisuna AO, Erhart A, et al. *Malar. J.* 2011;10:1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>.
- [21] Diaz G, Miranda IL, Nogueira-Díaz MA. In: *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. chapter 6. InTech; 2015:141. <https://doi.org/10.5772/59819>.
- [22] Sharma V, Mehta DK, Das R. *Mini-Rev Med Chem.* 2017;17:1557. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170510104954>.
- [23] Kapishnikov S, Staalso T, Yang Y, et al. *PNAS*. 2019;116:22946. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910123116>.
- [24] Insuaty D, Vidal O, Bernal A, et al. *Antibiotics*. 2019;8:239. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040239>.
- [25] Musiol R, Jampilek J, Buchta V, et al. *J. Polanski. Bioorg. Med. Chem.* 2006;14:3592. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.016>.
- [26] Senerovic L, Ospenica D, Moric I, Aleksic I, Spasić M, Vasiljevic B. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1282:37. https://doi.org/10.1007/5584_2019_428.

- [27] Shang XF, Morris-Natschke SL, Yang GZ, et al. *Med. Res. Rev.* 2018;38:1614. <https://doi.org/10.1002/med.21492>.
- [28] Shang XF, Morris-Natschke SL, Yang GZ, et al. *Med. Res. Rev.* 2018;38:775. <https://doi.org/10.1002/med.21466>.
- [29] Tse EG, Korsik M, Todd MH. *Malar. J.* 2019;18:93. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>.
- [30] Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, et al. *Rev.* 2011;35:247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00247.x>.
- [31] Chu XM, Wang C, Liu W, et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2018;161:101. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.035>.
- [32] a) Jin M, Petronella BA, Cooke A, Kadalbajoo M, Siu KW, Kleinberg A, May EW, Gokhale PC, Schulz R, Kahler J, Bittner MA, Foreman K, Pachter JA, Wild R, Epstein D, Mulvihill MJ. *ACS Med Chem. Lett.* 2013;4:627–631. b) Marganakop SB, Kamble RR, Taj T, Kariduraganvar MY. *Med Chem Res.* 2012;21:185–191. c) Massari S, Daelemans D, Manfroni G, Sabatini S, Tabarrini O, Pannecouque C, Cecchetti V. *Bioorg. Med. Chem.* 2009;17:667–674.
- [33] a) Nahide PD, Solorio-Alvarado CR. *Tetrahedron Lett.* 2017;58:279. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.11.093>. b) Arcadi A, Marinelli F, Rossi E. *Tetrahedron.* 1999;55:13233. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00814-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00814-5).
- [34] Rangel-Porras RA, Díaz-Pérez SP, Mendoza-Hernández JM, et al. *J. Microbiol.* 2019; 57:606. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8680-z>.
- [35] Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Global Antifungal Surveillance Group. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:1366. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-09>.
- [36] Örtqvist P, Peterson SD, Åkerblom E, et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2007;15:1448. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.11.003>.
- [37] Our procedure for the synthesis of the more active quinolines 3 and 11 needs of just three-step, while the modern synthesis of fluconazole even at continuous flow involves more. J. Szeto, V. A. Vu, J. P. Malerich, N. Collins, *J. Flow. Chem.* 2019, 9, 35. DOI: 10.1007/s41981-018-00.
- [38] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983;65:55. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [39] International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 10993-5 Part 5. (2009). Test for in vitro cytotoxicity International Standard, biological evaluation of medical devices.

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tbsd20>

Derivates of 1,6-dihydroazaazulenes as inhibitors of tyrosine kinases BCR-ABL1 wild type and mutant T315I: a molecular dynamics approach

Manuel de Jesus Solís-Hernández, Juan Pedro Palomares-Báez, Rafael Herrera-Bucio, Luis Chacón-García & Pedro Navarro-Santos

To cite this article: Manuel de Jesus Solís-Hernández, Juan Pedro Palomares-Báez, Rafael Herrera-Bucio, Luis Chacón-García & Pedro Navarro-Santos (08 Nov 2023): Derivates of 1,6-dihydroazaazulenes as inhibitors of tyrosine kinases BCR-ABL1 wild type and mutant T315I: a molecular dynamics approach, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, DOI: [10.1080/07391102.2023.2279274](https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2279274)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2279274>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 08 Nov 2023.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Derivates of 1,6-dihydroazaazulenes as inhibitors of tyrosine kinases BCR-ABL1 wild type and mutant T315I: a molecular dynamics approach

Manuel de Jesus Solís-Hernández^a, Juan Pedro Palomares-Báez^b, Rafael Herrera-Bucio^a, Luis Chacón-García^a and Pedro Navarro-Santos^{a,c}

^aInstituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Edificio B-1, Ciudad Universitaria, Michoacán, Mexico; ^bFacultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Mexico; ^cCONACYT-Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo Edificio B-1, Ciudad Universitaria, Michoacán, Mexico

Communicated by Ramaswamy H. Sarma

ABSTRACT

The protein tyrosine kinase (PTK) produced by the BCR-ABL1 gene has generated significant interest in the development of inhibitors since the presence of punctual mutations causes resistance to currently approved drugs, mainly the **T315I** mutation has been the most difficult to address. In this work, derivatives of 1,6-dihydroazaazulenes are studied as possible inhibitors of this PTK in its wild form and the mutant **T315I**. The recognition of the ligands was explored through molecular docking, and the stability of the complexes and their evolution over time was studied using molecular dynamics (MD) simulations. Our results show that complexes are energetically stable and reside on the ATP binding site in all cases during the MD experiments. Interestingly, a few of our proposed ligands presented greater affinity for **T315I**, finding more favorable binding free energies (ΔG) than the reference drug axitinib. Furthermore, they may act as inhibitors for both isoforms. Our findings are promising because mutation of **T315I** does not prevent ligand recognition, as detailed in this work, which is very important to conduct further experimental research.

ARTICLE HISTORY

Received 4 July 2023
Accepted 30 October 2023

KEYWORDS

1,6-dihydroazaazulenes; BCR-ABL1; CML; TKIs; MD

1. Introduction

Protein tyrosine kinases (PTKs) are a large family of proteins that catalyze the transfer of the gamma phosphate group of the ATP to the tyrosine residues of themselves by the self-phosphorylation mechanism. They are classified into two subfamilies: receptor tyrosine kinases (RTKs) and non-receptor tyrosine kinases (NRTKs). Both subfamilies are present in the cell signaling pathways since they trigger a cascade of signals that transmit external and internal stimuli to the cytoplasm and the nucleus proteins, regulating cell differentiation, growth, proliferation, apoptosis, and survival, among others (Hubbard & Till, 2000; Robinson et al., 2000). PTKs have been identified as playing a key role in the pathogenesis of several types of cancers (Saraon et al., 2021). Among them, a hematological malignancy such as chronic myeloid leukemia (CML) (Bhanumathy et al., 2021), whose genetic characteristic is the reciprocal translocation between chromosome 22 and chromosome 9 that generates a Bcr-Abl1 (Philadelphia Chromosome) fusion gene that produces a protein with constitutively active or deregulated tyrosine kinase activity (Minciocchi et al., 2021).

Because of these relevant facts, Bcr-Abl1 tyrosine kinases have been considered an important target for developing inhibitors (ITKs), which have been classified into different types depending on the binding site to the protein and its mechanism of action (Al-Obeidi & Lam, 2000; Rossari et al.,

2018). This fact becomes relevant due to the acquisition of point mutations in the Abl1 kinase domain, which alter the binding mode of the inhibitor to the protein, thus generating a mechanism of resistance to ITKs (Gibbons et al., 2014). A large number of point mutations have been found (Braun et al., 2020), which the substitution of Threonine 315 for Isoleucine (**T315I**) in the Bcr-Abl1 tyrosine kinase confers the highest level of resistance to most of the first and second generation of inhibitors (e. g., dasatinib, nilotinib, imatinib, and ponatinib) (Rajendran et al., 2018; Yaghmaie & Yeung, 2019). Therefore, developing new compounds that satisfactorily bind to these proteins becomes a significant challenge.

On the other hand, azaazulenes are heterocyclic compounds that have acquired great interest from the synthetic point of view due to their inherent chemical structure (Abe & Gunji, 2010). Besides, they are considered privileged nuclei in medicinal chemistry due to their biological properties. We recently described the synthesis of derivatives of 1,6-dihydroazaazulenes through a pseudo-three-component reaction through the cyclization of pyrrolyl-enones (Valentin-Escalera et al., 2021).

It has been reported that compounds derived from azaazulenes have inhibitory activity against different PTKs, such as JNK, FGFR, MAPK, FGR, NTRK, KIT, among others, in various cancer processes (Lee et al., 2013), e. g., Somwar et al. (2002) described some azaazulene derivatives as inhibitors of p38

MAPK, a PTK that reduces insulin-mediated glucose uptake in adipose tissue cells without affecting the translocation of the GLUT4 glucose transporter. In addition, Yamauchi et al. (Yamauchi et al., 2008) reported the synthesis of 2-benzimidazolyl-1-azaazulene and its biological activity as an anticancer agent in Hela S3 cells. Because Bcr-Abl1 tyrosine kinase, a target for cancer treatment, represents an understudied receptor in its interaction with azaazulenes, a group of promising heterocycles as cytotoxic agents.

In the present work, derivatives of 1,6-dihydroazaazulenes are studied using chemical computational techniques described in structure-based drug design. Our results suggested that the proposed compounds bind at the ATP recognition site. The complexes formed are also stable since they form hydrogen bonds with significant residence percentages with key amino acid residues and promising binding free energies. Therefore, it positions them as promising candidates that could be included as therapeutic agents after further *in vitro* research.

2. Computational details

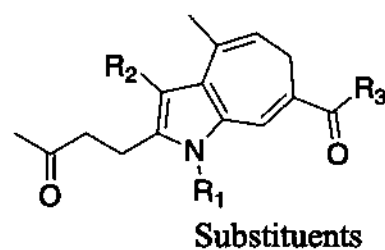
2.1. Preparation of ligands

The possible ligands targeting the BCR-ABL1 were selected from our recent experimental work on synthesizing 1,6-dihydroazaazulenes (Valentin-Escalera et al., 2021). Scheme 1 shows the structure of the nine potential inhibitors studied in this work. The 3D structures were built using the Spartan 20 suite (Spartan'20, 2020), then the possible protonation state was generated at a pH of 7.4 to simulate physiological conditions using the Avogadro (Hanwell et al., 2012) package. Finally, the optimized molecular structure of nine derivatives of 1,6-dihydroazaazulenes and the reference compound axitinib were obtained employing DFT approximation at the level of theory B3LYP/6-311G++(d, p) using Gaussian16 (Frisch et al., 2016). Once the optimized structures were obtained, the global minima were validated by exploring the Potential Energy Surface (PES) and finding positive vibrational modes in all the studied compounds.

2.2. Molecular docking procedure

In the first stage of the computational protocol employed in this work, Molecular Docking simulations were carried out using the suite Autodock4.2 (AD4) (Morris et al., 2009) to explore the binding sites and affinity of 1,6-dihydroazaazulenes and its derivatives against the BCR-ABL1 tyrosine kinases wild and mutant **T315I** respectively.

The co-crystal structure of proteins BCR-ABL1 wild type (PDB ID: **4WA9**) (Pemovska et al., 2015) and its mutant type **T315I** (PDB ID: **4TWP**) (Pemovska et al., 2015) were obtained from the Protein Data Bank (www.rcsbpdb.org) (Berman et al., 2000) within a resolution of 2.2 and 2.4 Å respectively. The chains were refined and prepared using the PDBfixer program (Eastman et al., 2017) considering a protonation state to pH of 7.4. Subsequently, polar hydrogens, Kollmann charges, and AD4 atoms type were added using the AutoDockTools (ADT) (Sanner, 1999), for the ligands, detect



Compound	R ₁	R ₂	R ₃
1		H	Me
2		H	
3		H	
4		H	Me
5	Me	H	Me
6	Me	H	
7	Me	H	
8			Me
9	Me		Me

Scheme 1. Chemical structures of derivatives of 1,6-dihydroazaazulenes considered in this work.

root was done, and routable bonds were chosen. Firstly, blind docking was done to explore all the possible binding sites, finding the binding pocket of the proposed ligands with a searching grid of $126 \times 126 \times 126$ with a 0.375 \AA spacing built with the Autogrid program (Morris et al., 2009). Lamarckian genetic algorithm (Morris et al., 1998) was applied, searching up to 1000 possible conformers within a population of 1500. To validate the docking protocol, we redocked the co-crystallized ligand axitinib to measure the RMSD between our docking results concerning the co-crystallized structure conformation.

2.3. Molecular dynamics details

The stability and evolution of the best-interacting complexes were studied by Molecular Dynamics simulations using the

software *NAMD* (Phillips et al., 2020). Firstly, the parametrization of ligands was carried out through the Ligand Reader & Modeler module using the CHARM-GUI server (Jo et al., 2008; Kim et al., 2017), then the complexes between the ligands and receptors (PDB ID: **4WA9** and **4TWP**) were prepared by using the Solution Builder module (Jo et al., 2008; Lee et al., 2016), within a periodic orthorhombic cell of size $95 \times 95 \times 95 \text{ \AA}^3$ solvated with the TIP3P water model, the systems were neutralized by adding counter ions and NaCl at 0.15 M. All simulations were carried out by using the CHARMM36 forcefield (Vanommeslaeghe et al., 2010) and by modeling the long-range electrostatic interactions using the Particle Mesh Ewald (Essmann et al., 1995) method (PME) and a 12 \AA cutoff for non-bonded interactions. Following the subsequent simulations protocol: 1) an energy minimization was done using the conjugate gradient algorithm (Fletcher & Reeves, 1964) for 100,000 iteration steps taken as initial conformation of the best results from the docking experiments. 2) The complexes were then heated from 0 to 310 K by intervals of 1 K during a period of 500 ps and maintained at 310 K during a period of 500 ps using the NVT ensemble employing the Langevin dynamics model. 3) Subsequently, the equilibration of the systems was done during a period of 5 ns within the NPT ensemble (1 atm and 310 K), using time-steps of 1 fs, using the Langevin piston Nosé-Hoover method for the thermostat and barostat models (Feller et al., 1995; Martyna et al., 1994). 4) Finally, the production simulations were carried out during a period of 200 ns at a timestep of 2 fs. The interaction energy of the ligand, RMSD, the most representative interactions, and other conformational properties were calculated from the last 100 ns of the production simulations using the VMD (Humphrey et al., 1996) program and homemade scripts.

The binding free energy of the ligands coupled at the ATP recognition site was calculated employing the widely used Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area (MM/PBSA) (Genheden & Ryde, 2015) end-point method using the VMD—CaFE (Liu & Hou, 2016) plugin. For the non-polar solvation energy calculation, the area of the surface accessible to the solvent was estimated using the VMD software package. For the polar solvation energy part, the APBS (Jurrus et al., 2018) program was used with values of 1 and 80 for the internal and external dielectric constant, respectively. The entropic part is neglected because calculating normal vibration modes is computationally expensive. For per-residue decomposition energy analysis, we employed the *gmx_MMPBSA* tool considering a cutoff of 5 \AA around the ligand position of each complex, the results of the binding free energy and the per-residue decomposition were obtained from the average exploration of 500 snapshots of the last 100 ns of the molecular dynamics production stage.

3. Results and discussion

3.1. Molecular docking

Firstly, a molecular docking study was conducted considering the wild-type with a DFG-out conformation and its mutant **T315I** with a DFG-in conformation BCR-ABL1 protein tyrosine

kinases as molecular targets. On the one hand, the docking experiments were validated considering reference ligand axitinib (**AXI**) in a blind scheme. The comparison of our best-scoring docking conformation concerning the co-crystallized structure obtained an RMSD of 0.956 and 0.410 \AA , respectively. The docking prediction is successful if the RMSD value is $< 2.0 \text{ \AA}$ (Figure S1). In addition, the binding free energy calculated was -11.80 and $-11.90 \text{ kcal mol}^{-1}$ for wild-type and mutant **T315I**, respectively. The results obtained from the RMSD, and its binding energy of the reference ligand allow us to validate that the chosen conditions were adequate for the employed molecular docking protocol.

To identify the mechanism of interaction of the proposed ligands, the conformations with the best binding free energy for both proteins were analyzed, finding for all studied ligands that the most favored binding site is the ATP binding site, as shown in Figure 1.

The binding free energies of the best-scored conformations are summarized in Table 1. The binding energies calculated are from -7.69 up to $-11.03 \text{ kcal mol}^{-1}$. Most ligands have an inhibition constant (K_i) in the nanomolar order against both proteins; to help visualize this property, the pK_i are also presented. The K_i was estimated from the binding energy of the poses generated during the docking experiments.

$$K_i = e^{\frac{\Delta G}{RT}} \quad (1)$$

From such results, ligands **2** and **3** have the lowest binding energy for both proteins, that is, -10.84 and $-10.49 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively, for the wild-type protein and -11.03 and $-10.13 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively, for the mutant **T315I**. Moreover, the rest of the ligands have acceptable free binding energies, showing similar trends against both proteins, finding for the wild-type protein that $2 < 3 < 7 < 1 < 4 < 6 < 5 < 8 < 9$ and for the mutant **T315I** $2 < 3 < 6 < 4 < 7 < 1 < 5 < 9 < 8$.

To correlate the binding free energy, we analyzed the interactions between the ligands and amino acids in the binding pocket, as shown in Table 1. For the wild-type protein, most proposed ligands preferentially formed hydrogen bonds with at least one of the amino acid residues TYR253, LYS271, MET318, and ASP381, except for ligand **8**, which forms a hydrogen bond with GLU255. In contrast, for the mutant protein **T315I**, the ligands interacted with the amino acid residues LYS271, MET318, and PHE382, except for ligands **2**, **3**, and **4**, which did not form hydrogen bonds, indicating that their affinity is entirely governed by hydrophobic interactions. It is worth mentioning that considerable hydrophobic interactions are found in both proteins. Figures S2 and S3 illustrate the ligand-protein interactions for both proteins. These results are significant because these amino acid residues are part of the G-loop, conserved lysine, hinge, and DFG regions, which play a significant role in ATP binding; thus, inhibiting them could prevent phosphate group transfer (Kornev et al., 2006; Peng et al., 2013).

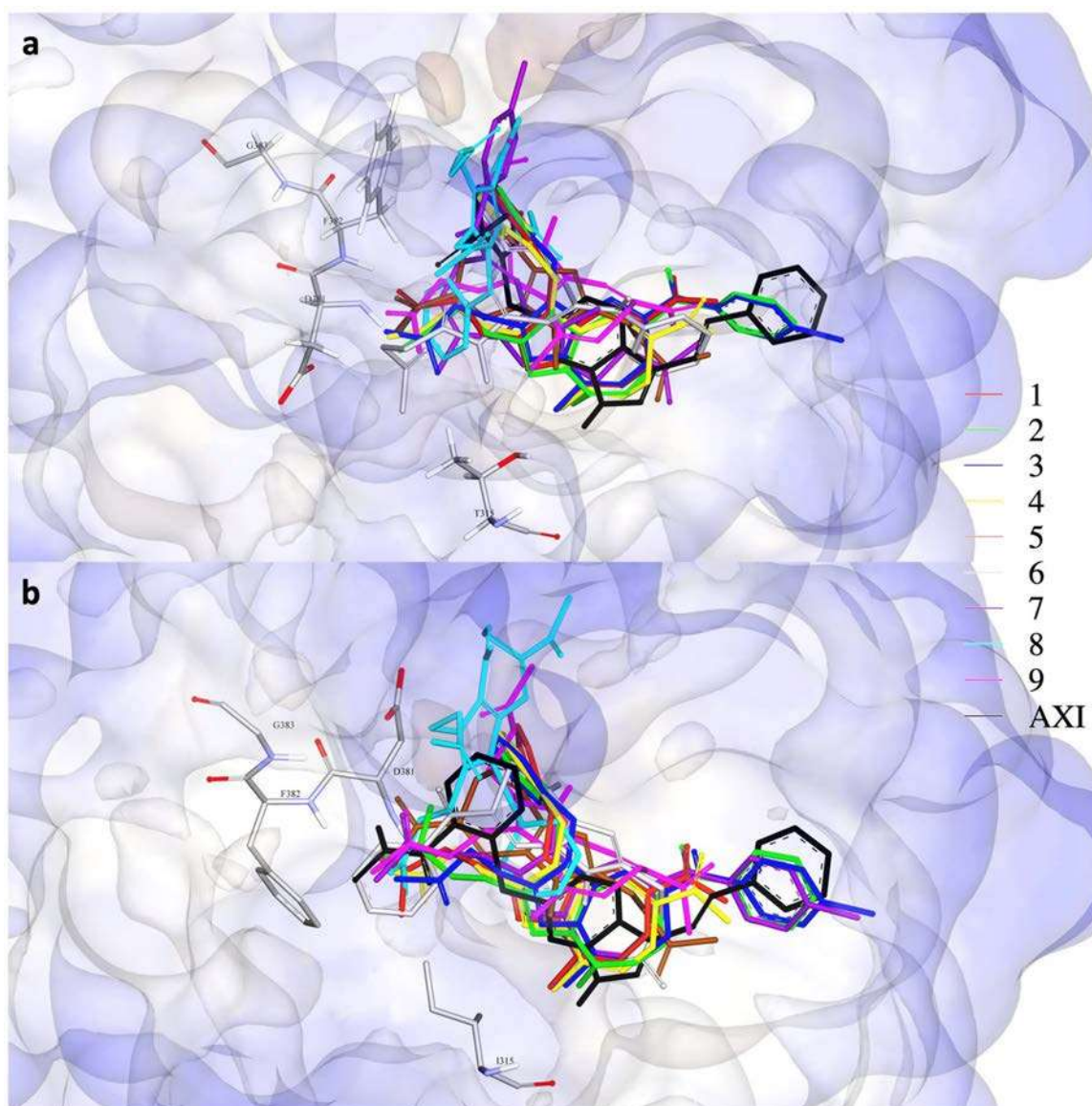


Figure 1. The best-scored conformations of 1,6-dihydroazaazulenes derivatives against a) BCR-ABL1 wild type and b) BCR-ABL1 mutant T315I. Sticks models of amino acids show the a) DFG-out and b) DFG-in conformational differences and the gatekeeper mutation T315I.

Table 1. Binding free energy (in kcal mol⁻¹), Ki (in nM), pKi, and hydrogen bonds of derivatives of 1,6-dihydroazaazulenes against the tyrosine kinases bcr-abl1.

Ligand	WILD TYPE				MUTANT T315I			
	ΔG	Ki	pKi	H-bond identified	ΔG	Ki	pKi	H-bond identified
AXI _{EXP}	-11.49	3.8	8.42	TYR253, LYS271, GLU316, MET318	-13.64	0.1	10	TYR253, LYS271, GLU316, MET318
AXI _{CALC}	-11.8	2.24	8.65	TYR253, LYS271, GLU316, MET318	-11.9	1.91	8.72	TYR253, LYS271, GLU316, MET318
1	-9.9	55.6	7.25	TYR253, LYS271	-9.34	141.5	6.85	PHE382
2	-10.84	11.34	7.95	TYR253, ASP381	-11.03	8.28	8.08	-
3	-10.49	20.44	7.69	TYR253, ASP381	-10.13	37.85	7.42	-
4	-9.85	60.09	7.22	ASP381	-9.56	98.5	7.01	-
5	-8.81	347.24	6.46	LYS271, MET318	-8.9	301.47	6.52	LYS271, MET318
6	-9.44	120.55	6.92	ASP381	-9.78	67.26	7.17	LYS271, MET318
7	-9.92	53.23	7.27	TYR253, LYS271	-9.54	102.12	6.99	LYS271
8	-8.68	435.32	6.36	GLU255	-7.69	2310	5.64	LYS271
9	-8.36	740.5	6.13	LYS271	-8.26	884.85	6.05	LYS271

*nM = 1×10^{-09} .

3.2. Molecular dynamics results

3.2.1. Analysis of the stability of the complexes

Once the ligands' binding sites were found and it was seen that they interacted strongly with key amino acid residues,

200 ns of molecular dynamics simulations were run to test the stability of protein-ligand complexes and look at how they changed over time. Based on these simulations, the stability of the complexes was determined by calculating the

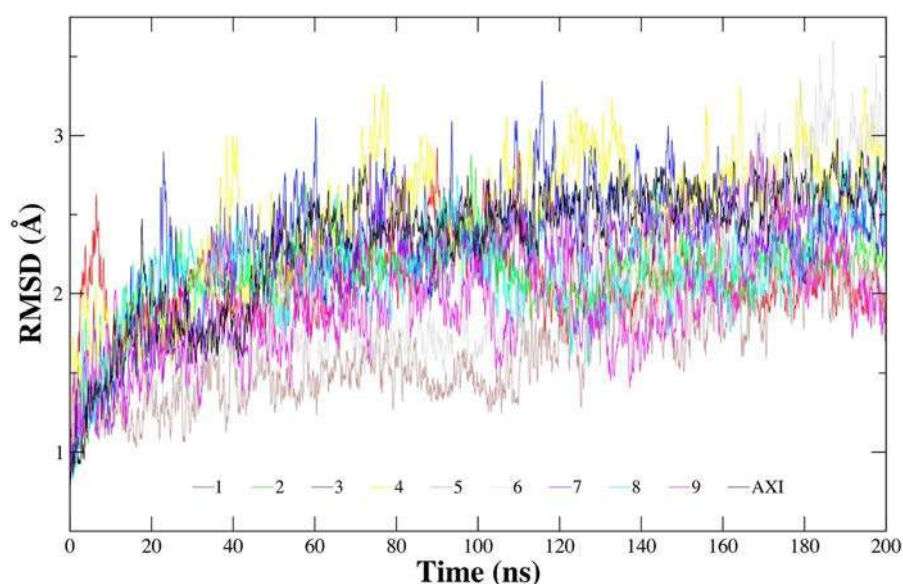


Figure 2. RMSD of the C_{α} of the wild-type BCR-ABL1 kinase in complex with 1,6-dihydroazaazulenes derivatives.

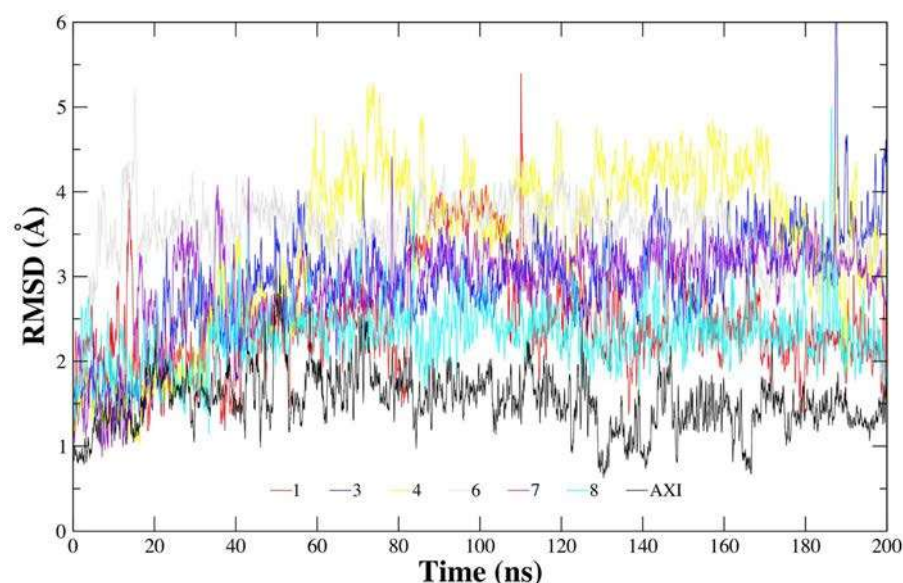


Figure 3. RMSD (average $< 3.5 \text{ \AA}$) as a function of simulation time of 1,6-dihydroazaazulenes derivatives fitted to wild-type BCR-ABL1 kinase.

root mean square deviation (RMSD) of the ligands and the protein backbones. As depicted in Figure 2, the backbone of each complex's wild-type protein was stabilized with RMSD values below 3 \AA ; no substantial fluctuations were observed (see Table S1 for details).

In addition, Figures 3 and 4 display the stability of the ligand aligned to the protein according to their RMSD values during the 200 ns of simulation. The lower value of the RMSD of our proposed ligand is 1.97 \AA (Table S1), and the following stability trend for the ligands in the wild-type protein is: $1 > 8 > 7 > 3 > 4 > 6$. Particularly, ligands 2, 5, and 9 showed the highest fluctuations observed during the simulation time as we can see in Figure 4. Analyzing their trajectories of the ligands, approximately at 40 ns, it was found that these fluctuations are caused by a rearrangement of the initial pose of the ligands. This RMSD increase is because the

initial conformation of such ligands is with respect to the molecular docking results in such a way that ligands bind in the same position as AXI does (as shown in Figure 1), but they do not diffuse from the ATP binding site (Figure S4). Additional fluctuations of ligands are observed due to the rotation of the butan-2-one substituent of the pyrrole ring, while the more minor fluctuations come from the rotation of the substituent rings.

Figure 5 shows that the protein backbone of all compounds containing the mutant protein T315I is stabilized with average RMSD values less than 3 \AA (see Table S2 for details). No significant fluctuations are observed over the 200 ns of simulation, indicating that the protein is stable under the studied conditions. On the other hand, Figures 6 and 7 illustrate the stability of ligands throughout simulations, finding that ligand 5 has a lower value (1.14 \AA) of the

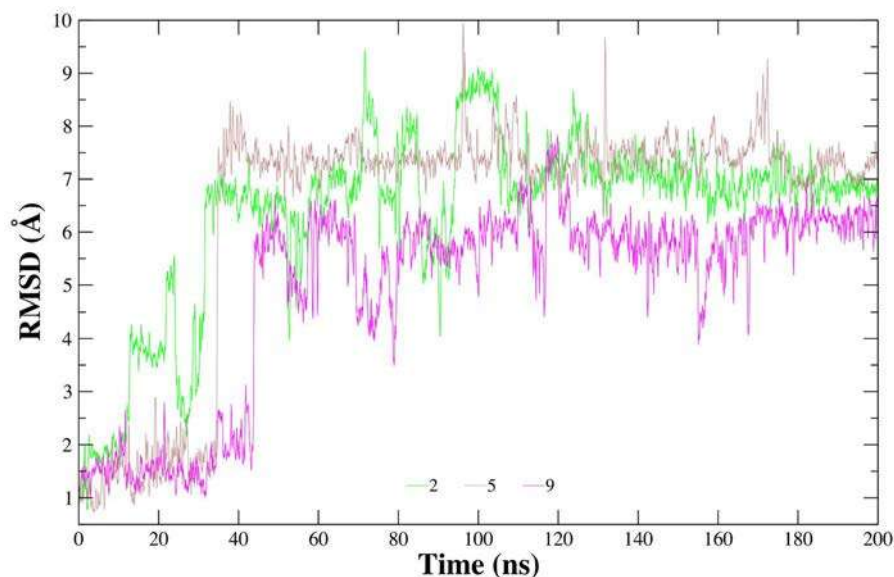


Figure 4. RMSD (average $> 4.0 \text{ \AA}$) as a function of simulation time of 1,6-dihydroazaazulenes derivatives fitted to wild-type BCR-ABL1 kinase.

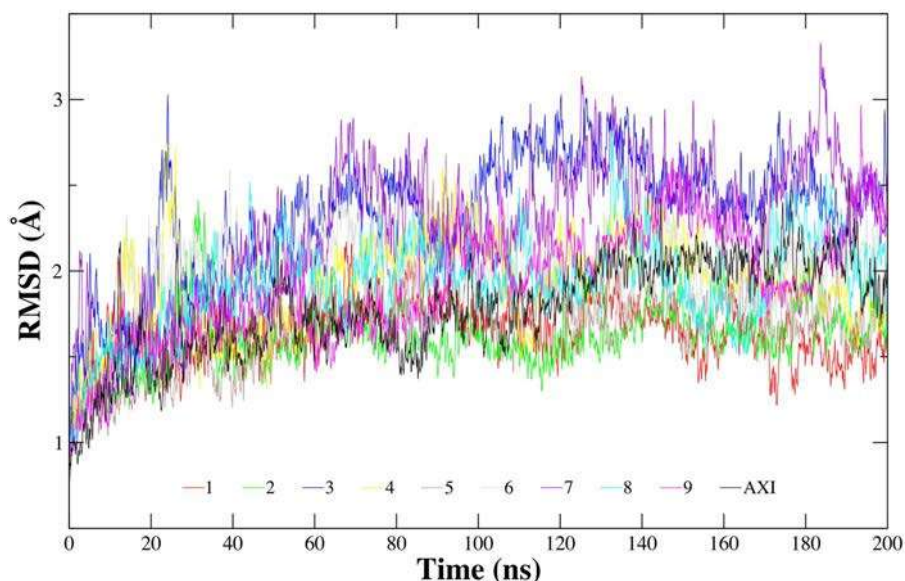


Figure 5. RMSD of the C_{α} of mutant T315I BCR-ABL1 kinase in complex with 1,6-dihydroazaazulenes derivatives.

RMSD than **AXI** (1.21 \AA) and following the stability trend: $5 > 1 > 2 > 9 > 6 > 3 > 4$ (see Table S2 for details). Among them, **3** and **9** are the only ones that presented more fluctuations, stabilizing in the binding site after 100 ns . On the other hand, we also observed from Figure 7 those ligands **7** and **8** with average RMSD values of 3.75 and 6.50 \AA , respectively. The increment of their RMSD is because such ligands change their initial pose with respect to the docking initial conformation (see Figure S5). It is worth mentioning that **7** and **8** do not diffuse from the ATP-binding site. Similar fluctuations of ligand substituents as described for the wild-type BCR-ABL1 kinase are observed for this mutant protein.

3.2.2. H-bonding analysis

For this analysis, the percentage of occupancy of H-bonds formed in the last 100 ns , which was considered the most

stable portion of each trajectory obtained from MD simulations, was calculated, applying the criteria described by Jeffrey, (Jeffrey & Jeffrey, 1997) considering the strengths of hydrogen bonds from moderate to strong, where their geometric parameters are: angles of 130° - 180° and donor-acceptor distances of $2.5 - 3.2 \text{ \AA}$, for the sake of simplicity, only H-bonds with occupancies greater than 8%, are discussed.

The results of the residence of the H-bonds are shown in Table 2. First, it is important to note that the only ligands that form stable H-bonds with the wild-type protein are **4** and **6**, 78% of the time, they form a stable H-bond with MET318. It is worth mentioning that this is a crucial amino acid residue in the hinge region for ATP binding and the recognition of the inhibitor **AXI**. Ligand **2** lacks H-bonds with significant occupancies. As shown in Table 2, the remaining ligands also exhibited hydrogen bonding interactions with

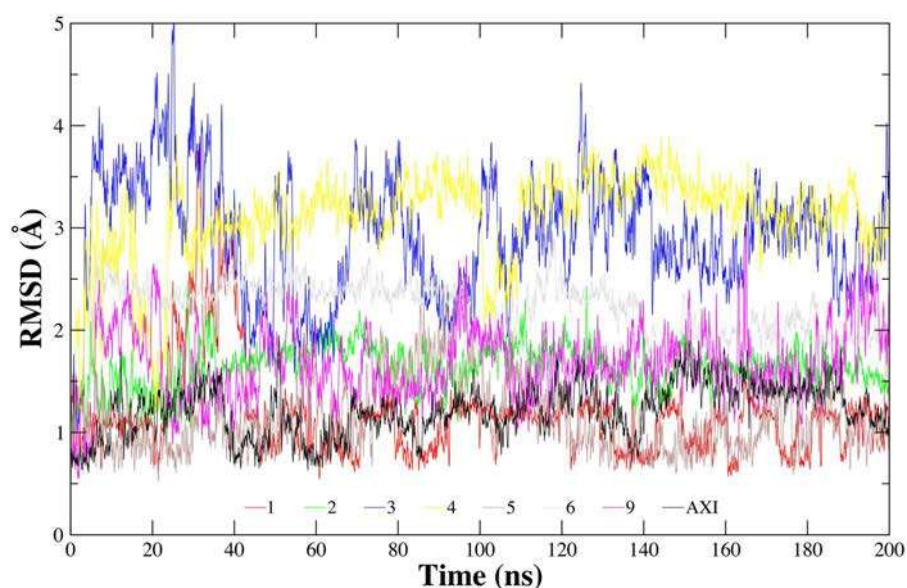


Figure 6. RMSD (average < 3.0 Å) as a function of simulation time of 1,6-dihydroazaazulenes derivatives fitted mutant **T315I** BCR-ABL1 kinase.

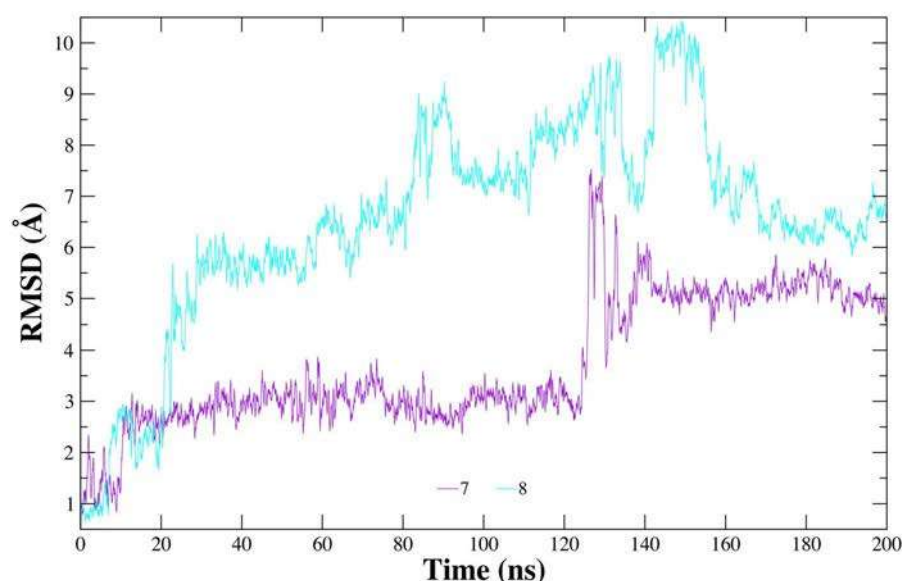


Figure 7. RMSD (average > 4.0 Å) as a function of simulation time of 1,6-dihydroazaazulenes derivatives fitted mutant **T315I** BCR-ABL1 kinase.

amino acids that are part of the G-loop (GLY249, TYR253, GLY254, and GLU255), Hinge region (MET318 and ASN322), and A-loop (ARG367 and ASN367), but to a lesser extent.

Interestingly, for the mutant protein **T315I**, almost all of the ligands studied in this work exhibited higher H-bond occupancies than the wild-type protein, with the exception of ligand **3** that did not form hydrogen bonds with significant occupancies, i.e., **1** formed a stable H-bond with ASP381 (91.76%), **2** with LYS271 (51.32%), **4** with ASP381 (78.72%), **5** formed two H-bonds with MET318 (93.14%) and with ASP381 (64.82%), **6** formed two H-bonds with MET318 (81.40%) and with ASP381 (86.38%), **7** formed two H-bonds with ASN322, one with the backbone (76.90%) and another one with the side chain (68.46%), **8** with MET318 (69.28%) and **9** presented interactions with LYS271, ASN322, and ASP381 but with low occupancies. As stated previously, each of these

interactions is essential for the catalytic activity of these kinases.

In contrast to the literature, we do not observe the formation of hydrogen bonds between the studied ligands and the amino acid residue THR315. For example, imatinib stability in this kinase depended on the interactions of ligands with THR315. (Nagar et al., 2002) Moreover, Melge et al. demonstrated that when this amino acid is mutated by ILE315, the ability to form this interaction may be lost. ILE315 is also more voluminous, which may present a steric hindrance to binding with ligands (Melge et al., 2019). Our results indicate that this mutation has no effect on the binding mode of the proposed ligands, as it is extremely similar in both proteins. Importantly, the mutant protein **T315I** is resistant to most approved ITKs (Amarante-Mendes et al., 2022; Yang & Fu, 2015).

Table 2. Occupancy of hydrogen bonds during last 100 ns simulations of complexes of 1,6-dihydroazaazulenes derivatives with wild-type and mutant T3151 BCR-ABL1 kinases.

Ligand	Target					
	BCR-ABL1 WILD TYPE			BCR-ABL1 MUTANT T3151		
	Donor	Acceptor	Occupancy (%)	Donor	Acceptor	Occupancy (%)
AXI	–	–	–	GLY254-Main-N-H	O	58.76
	LYS271-Side-N-H	O	13.26	LYS271-Side-N-H	O	8.04
	MET318-Main-N-H	N3	28.98	MET318-Main-N-H	N3	54.24
1	–	–	–	N1-H	GLN252-Main-O	34.02
	N2-H	GLU316-Main-O	63.88	N2-H	GLU316-Main-O	97.10
	GLU255-Main-N-H	O1	8.16	–	–	–
2	–	–	–	ASP381-Main-N-H	O1	91.76
	–	–	–	LYS271-Side-N-H	O1	51.32
3	TYR253-Side-OH	O2	36.02	–	–	–
	ASN322-Main-N-H	O2	21.80	–	–	–
4	ASN322-Side-N-H	O2	21.70	–	–	–
	GLY254-Main-N-H	O1	18.96	–	–	–
5	MET318-Main-N-H	O2	78.76	–	–	–
	–	–	–	ASP381-Main-N-H	O1	78.72
6	GLY249-Main-N-H	O1	8.26	–	–	–
	MET318-Main-N-H	O1	23.86	MET318-Main-N-H	O1	93.14
7	–	–	–	ASP381-Main-N-H	O2	64.82
	MET318-Main-N-H	O2	78.58	MET318-Main-N-H	O1	81.40
8	–	–	–	ASP381-Main-N-H	O2	86.38
	ASN322-Main-N-H	O1	15.60	ASN322-Main-N-H	O2	76.90
9	ASN322-Side-N-H	O1	13.30	ASN322-Side-N-H	O2	68.46
	–	–	–	MET318-Main-N-H	O2	69.28
10	–	–	–	ASN322-Main-N-H	O3	11.38
	–	–	–	ASN322-Side-N-H	O3	12.08
11	ARG367-Side-N-H	O3	27.82	–	–	–
	–	–	–	LYS271-Side-N-H	O3	21.56
12	–	–	–	ASN322-Side-N-H	O2	15.50
	ASN368-Side-N-H	O2	22.44	–	–	–
13	–	–	–	ASP381-Main-N-H	O1	8.10

Table 3. The predicted binding free energy and individual components (kcal mol⁻¹) of ligands in complex with wild-type BCR-ABL1 kinase.

Ligands	ΔE_{elec}	ΔE_{vdw}	ΔE_{PB}	ΔE_{SA}	ΔG_{bind}
AXI	-28.39	-44.98	68.52	-5.75	-10.59
1	-12.84	-38.75	48.03	-5.44	-9.01
2	-4.41	-32.03	27.79	-4.63	-13.28
3	-13.08	-42.55	43.17	-5.81	-18.28
4	-15.54	-44.05	50.23	-5.88	-15.25
5	-6.91	-28.23	29.72	-4.10	-9.52
6	-7.50	-43.03	45.12	-5.57	-10.98
7	-19.64	-38.68	45.78	-5.77	-18.31
8	-16.31	-36.16	43.48	-4.80	-13.80
9	-19.15	-31.04	44.63	-4.68	-10.25

Table 4. The predicted binding free energy and individual components (kcal mol⁻¹) of ligands in complex with mutant T3151 BCR-ABL1 kinase.

Ligands	ΔE_{elec}	ΔE_{vdw}	ΔE_{PB}	ΔE_{SA}	ΔG_{bind}
AXI	-30.23	-47.43	71.73	-5.50	-11.42
1	-11.02	-45.88	49.58	-5.60	-12.92
2	-17.88	-50.52	55.85	-6.21	-18.77
3	-2.51	-51.34	45.81	-6.25	-14.30
4	-8.86	-43.30	45.96	-5.67	-11.87
5	-11.59	-39.26	45.01	-5.00	-10.85
6	-12.63	-49.73	51.11	-5.67	-16.92
7	-16.32	-38.69	40.39	-5.19	-19.82
8	-15.24	-40.35	46.10	-5.95	-15.44
9	-16.99	-32.75	49.10	-5.29	-5.93

3.2.3. Binding free energy analysis

The binding free energy of protein-ligand complexes and the contributions of their various components are presented in Tables 3 and 4. In the case of the wild-type protein, six of the ligands have higher binding energies than the calculated value for the reference ligand AXI. The stability of these

ligands was consistent with their RMSD analysis; the energetic stability exhibited the following trend: **7 > 3 > 4 > 8 > 2 > 6 > AXI > 9 > 5 > 1**.

In contrast, for the mutant protein T3151, all ligands except 5 and 9 have higher binding energies than AXI. The calculated energetic stability of the ligands follows the trend: **7 > 2 > 6 > 8 > 3 > 1 > 4 > AXI > 5 > 9**. Thus, these proposed ligands may serve as dual inhibitors for WT/T3151 kinases.

It is important to mention that most of the binding free energies have a hydrophobic nature because of the presence of aromatic rings in the structure of the proposed ligands, which confers the ability to form hydrophobic vdW interactions, e.g., stacking π - π , CH- π , etc., in agreement with the contribution of ΔE_{vdw} to the ΔG_{bind} as we can observe in Tables 3 and 4. These interactions play a key role in stabilizing the tyrosine kinase inhibitors in the different regions of the catalytic site, in agreement with other ligands that present these interactions (Zhu et al., 2021). Consistent with this, ligands 5 and 9 do not have aromatic rings as substituents in their structures attached to their base nucleus. We think that this is why they present the lowest affinity to both proteins, while the rest of the ligands with at least one aromatic ring as a substituent have binding-free energies that are more stable in synergy with the hydrogen bonds already described.

3.2.4. Per-residue energy decomposition analysis

To analyze the contribution of the amino acids binding the ligands, we calculated the per-residue energy decomposition.

The energy contribution of the amino acids within a radius of 5 Å with respect of ligands positions, for the wild-type BCR-ABL1 kinase is shown in Table 5. Particularly, we

observed the importance of the hydrophobic interactions to the total energy of binding because they show values larger than 1 kcal mol⁻¹ for almost all the binding ligands, e.g.,

Table 5. Per-residue energy decomposition for selected amino acids of wild-type BCR-ABL1 kinase.

Aminoacids	AXI	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LEU248	-1.44	-0.71	-1.48	-2.38	-3.14	-0.34	-1.92	-2.50	0.00	-0.12
GLY249	-0.29	-0.03	-1.32	-1.58	-2.06	0.00	-0.16	-1.15	0.00	-0.04
TYR253	-1.74	-2.47	-0.05	-4.52	-0.63	-3.63	-0.96	-3.33	-4.89	-3.54
GLY254	-0.03	0.00	0.00	-0.26	0.00	0.00	0.00	-0.43	-0.11	-0.34
VAL256	-1.61	-1.55	-1.16	-2.16	-2.34	-0.49	-1.40	-1.70	-0.66	-0.23
ALA269	-0.82	-0.52	-0.44	-1.10	-0.74	-0.13	-1.00	-1.40	-0.14	-0.02
LYS271	-1.52	0.15	-1.34	-0.19	-0.16	-0.80	1.03	0.42	1.53	-0.21
GLU286	-0.09	2.48	0.47	-0.88	-0.04	0.27	-0.34	-0.84	-0.01	0.03
VAL299	0.11	-1.01	-0.13	-1.41	-0.57	-0.11	-0.33	-0.96	-0.05	-0.06
THR315	-0.95	-0.74	-0.23	-0.43	-0.12	-0.03	-1.91	-0.95	-0.02	0.00
GLU316	-4.85	0.25	0.03	-1.20	1.07	0.37	-2.21	-0.96	0.00	0.17
PHE317	-2.37	-0.39	-0.74	-1.84	-2.11	-0.24	-2.51	-1.44	0.00	-0.02
MET318	-1.89	-0.69	-0.81	-1.42	-2.11	-0.04	-2.07	-1.75	0.00	-0.03
GLY321	-1.34	-0.15	-0.75	-1.85	-0.11	-0.07	-0.78	-1.14	0.00	0.05
ASN322	-0.49	-0.27	-1.10	-0.92	-0.27	-0.51	-0.17	-1.16	-0.36	-0.72
ARG367	-0.09	-0.49	1.04	-1.38	-0.34	-0.10	0.08	-1.06	-1.05	2.96
ASN368	-0.64	-0.29	-0.13	-1.35	-0.31	-0.95	-0.21	-1.39	-0.95	-3.80
LEU370	-1.75	-1.40	-1.15	-2.13	-1.94	-0.53	-1.59	-3.05	-0.44	-0.35
ALA380	-0.07	-2.20	-0.35	-1.83	-0.50	-0.57	-0.95	-1.59	-0.29	-0.59
PHE382	-2.07	-1.91	-0.41	-2.05	-2.53	-2.74	-0.97	-2.46	-2.37	-1.29

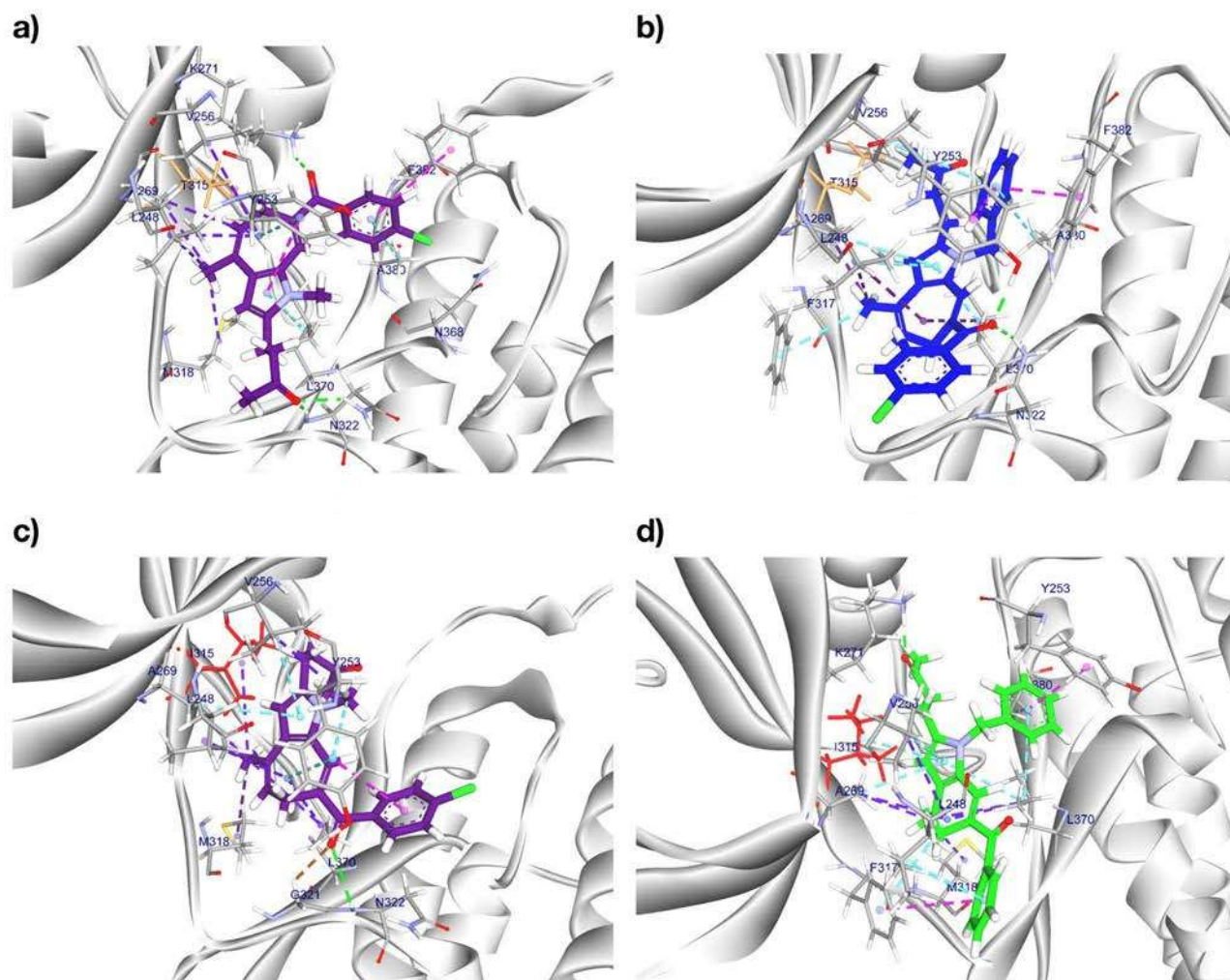


Figure 8. Interactions formed during the MD simulations of the most stable complexes a) 7-4WA9, b) 3-4WA9, c) 7-4TWP, and d) 2-4TWP. Color scheme: green hydrogen bonds, pink π - π stacking or T-shaped, cyan π -alkyl, purple alkyl interactions and brown no conventional hydrogen bond. Shown in orange gatekeeper THR315 and red ILE315.

Table 6. Per-residue decomposition energy for selected amino acids of mutant **T315I** BCR-ABL1 kinase.

Energy contribution (kcal mol ⁻¹)										
Aminoacids	AXI	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LEU248	-1.34	-1.19	-1.86	-1.90	-1.13	-0.56	-0.87	-2.60	-1.88	-1.10
TYR253	-4.28	-1.92	-2.23	-1.92	-0.27	-2.19	-2.11	-3.53	-1.72	0.03
GLY254	-1.61	0.00	0.00	-0.53	0.00	0.00	0.00	-1.01	-0.11	-0.06
VAL256	-2.07	-1.22	-1.88	-1.27	-1.50	-1.36	-1.45	-2.19	-1.15	-0.99
ALA269	-1.07	-1.08	-1.47	-1.16	-1.22	-0.65	-0.59	-1.30	-0.45	-0.21
LYS271	-2.28	1.69	-3.65	-0.93	2.71	-0.25	-0.45	-0.73	0.56	-6.48
GLU286	0.81	-1.06	1.32	-0.95	-1.90	0.18	-0.89	-0.89	0.16	2.60
MET290	-0.04	-0.51	-0.48	-0.90	-0.42	-0.59	-1.16	-0.93	-0.06	-0.36
VAL299	0.05	-1.24	-0.48	-0.80	-1.10	-0.48	-0.72	-0.71	-0.34	-0.52
ILE315	-0.73	-1.39	-1.47	-1.12	-1.19	-1.37	-1.37	-1.77	-0.40	-0.68
GLU316	-5.73	-0.28	-0.65	-0.87	-0.42	-2.35	-2.99	-1.08	0.45	0.32
PHE317	-2.65	-1.37	-1.93	-1.33	-1.48	-1.86	-1.73	-1.31	0.00	-0.20
MET318	-1.97	-1.69	-1.44	-1.62	-1.44	-2.24	-2.28	-1.38	0.00	-0.34
GLY321	-1.29	-1.04	-0.94	-0.77	-0.86	0.06	0.07	-0.60	0.00	-0.25
ASN322	-0.43	-1.05	-0.31	-0.56	-0.65	-0.05	-0.06	-1.19	-0.97	-0.45
ASN368	-0.23	-0.28	-0.49	-0.39	-0.41	-0.22	-0.19	-1.14	-1.03	-1.99
LEU370	-1.92	-2.21	-2.21	-1.68	-2.34	-1.24	-1.47	-2.19	-2.30	-2.00
ALA380	-0.44	-2.88	-0.88	-0.97	-2.36	-2.01	-3.29	-1.67	-0.25	-2.25
ASP381	4.46	-1.32	-0.99	-1.02	-1.42	-1.11	-1.25	-1.26	5.18	5.61
PHE382	-0.12	-0.28	-0.36	-1.25	-0.29	-0.62	-1.98	-1.02	-0.15	-0.58

residues TYR253, PHE317 y PHE382 contributing through π - π / π -alkyl interactions. Additionally, residues LEU248, VAL256 y LEU370 presented alkyl/ π -alkyl interactions as shown in **Figure 8a and b** respectively. Concerning ligands **3** and **7** which have the lowest binding free energy, for the case of **3** we can observe that its most important interactions are π - π type, observe them between the substituent R₁ of **3** and TYR253 and PHE382 contributing -4.52 and -2.05 kcal mol⁻¹, respectively. Moreover, we identified another π -alkyl interaction with LEU248 (-2.38 kcal mol⁻¹), VAL256 (-2.16 kcal mol⁻¹), ALA269 (-1.10 kcal mol⁻¹), PHE317 (-1.84 kcal mol⁻¹), and LEU370 (-2.13 kcal mol⁻¹), as well as hydrogen bonds with TYR253 and ASN322 (-0.92 kcal mol⁻¹), respectively.

For the case of ligand **7**, it shows π - π interactions between TYR253 and its pyrrole ring and PHE382 with its substituent R₃ where their contributions are -3.33 and -2.46 kcal mol⁻¹, respectively. Also π -alkyl interactions with LEU370 (-3.05 kcal mol⁻¹) and ALA380 (-1.59 kcal mol⁻¹), alkyl-type with LEU248 (-2.50 kcal mol⁻¹), VAL256 (-1.70 kcal mol⁻¹) and MET318 (-1.75 kcal mol⁻¹) and a hydrogen bond with ASN322 (-1.16 kcal mol⁻¹). The rest of the studied ligands in complex with the wild-type BCR-ABL1 kinase are shown in the supporting information (**Figure S6**).

On the other hand, **Table 6** summarizes the per-residue decomposition analysis for the mutant **T315I** BCR-ABL1 kinase. We observed that the π - π and π -alkyl hydrophobic interactions and hydrogen bonds contributed significantly to ligands with the lowest binding free energy as shown in **Figure 8c and d** respectively. For the case of **2**, LYS271 forms a recurrent hydrogen bond (-3.65 kcal mol⁻¹). Moreover, we found π - π type interactions between TYR253 and the R₁ ligand substituent (-2.23 kcal mol⁻¹) and PHE317 with the R₃ (-1.93 kcal mol⁻¹). Additionally, **2** show π -alkyl interactions with LEU248 (-1.86 kcal mol⁻¹), VAL256 (-1.88 kcal mol⁻¹), ALA269 (-1.47 kcal mol⁻¹), ILE315 (-1.47 kcal mol⁻¹) and LEU370 (-2.21 kcal mol⁻¹), and alkyl-type with MET318 (-1.44 kcal mol⁻¹).

For the case of **7**, we found π - π interactions between TYR253 its substituent R₃ (-3.53 kcal mol⁻¹), π -alkyl type between VAL256 (-2.19 kcal mol⁻¹) and ALA269 (-1.30 kcal mol⁻¹), alkyl-type with LEU248 (-2.60 kcal mol⁻¹), ILE315 (-1.77 kcal mol⁻¹), MET318 (-1.38 kcal mol⁻¹) and LEU370 (-1.19 kcal mol⁻¹) and a hydrogen bond with ASN322 (-2.19 kcal mol⁻¹), respectively. The rest of the studied ligands in complex with the mutant **T315I** BCR-ABL1 kinase are shown in the supporting information (**Figure S7**).

It is worth mentioning that from our results, we observed that ILE315 is involved in the ligand stabilization of almost all the proposed compounds, contributing more than 1 kcal mol⁻¹ to the total binding energy promoting the hydrophobic interactions.

As shown in **Figure 8**, we can observe clearly that the hydrophobic interactions (π - π , CH- π , alkyl) are responsible for the stabilization of the proposed ligands on the binding pocket, i.e., for **4TWP**, residue ILE315 (marked in red color) shown hydrophobic interactions, in contrast with the **4WA9**, the presence of the residue THR315 (marked in orange color), which does not contribute to such interactions because of its polar nature, these findings are in agreement with the energy decomposition analysis.

4. Conclusions

Molecular docking experiments and molecular dynamics simulations of 1,6-dihydroazaazulene derivatives against wild-type and mutant **T315I** BCR-ABL1 kinases confirmed that all the considered ligands are recognized at the ATP site. Only ligands **4** and **6** formed stable H-bonds with the wild-type, whereas the remaining ligands exhibited low occupancy. Intriguingly, most ligands have a higher affinity for the mutant protein **T315I**, forming stable H-bonds with a long residence in nearly all examined cases in synergy with vdW interactions.

The hydrophobic behavior inferred from the aromatic substituents of ligands stabilizes the ligand in the binding

pocket without involving H-bond with the mutating residue (ILE315) in good agreement with the per-residue decomposition energy analysis, which is promising because this mutation confers resistance to the majority of currently approved TKIs. Based on our findings, ligand **7** has the highest energetic affinity for both the wild-type and mutant **T315I** protein, outperforming the reference ligand axitinib in both cases. Therefore, compounds such as those proposed in this study could have a remarkable inhibitory effect on these CML proteins in future experimental investigations. Although this approach is out of the scope of this endeavor, the information obtained in this study is valuable for designing new and promising structures of dihydroazaazulene derivatives pursuing novel candidates for cancer treatment.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT). M. J. S-H thanks to CONAHCYT for PhD. scholarship 755896 and P. N-S for infrastructure grant 252239. The authors thankfully acknowledge the computer resources provided by the IPICT's National Supercomputing Center (CNS), under the computational time grant TKII-JPP001.

References

- Abe, N., & Gunji, T. J. H. (2010). The chemistry of azaazulenes. *Heterocycles*, 82(1), 201–248. [https://doi.org/10.3987/REV-10-SR\(E\)1](https://doi.org/10.3987/REV-10-SR(E)1)
- Al-Obeidi, F. A., & Lam, K. S. (2000). Development of inhibitors for protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 19(49), 5690–5701. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203926>
- Amarante-Mendes, G. P., Rana, A., Datoguia, T. S., Hamerschlag, N., & Brumatti, G. (2022). BCR-ABL1 tyrosine kinase complex signaling transduction: challenges to overcome resistance in chronic myeloid leukemia. *Pharmaceutics*, 14(1), 215. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010215>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bhanumathy, K. K., Balagopal, A., Vizeacoumar, F. S., Vizeacoumar, F. J., Freywald, A., & Giambra, V. (2021). Protein tyrosine kinases: Their roles and their targeting in leukemia. *Cancers*, 13(2), 184. <https://doi.org/10.3390/cancers13020184>
- Braun, T. P., Eide, C. A., & Druker, B. J. (2020). Response and resistance to BCR-ABL1-targeted therapies. *Cancer Cell*, 37(4), 530–542. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.006>
- Eastman, P., Swails, J., Chodera, J. D., McGibbon, R. T., Zhao, Y., Beauchamp, K. A., Wang, L.-P., Simmonett, A. C., Harrigan, M. P., Stern, C. D., Wiewiara, R. P., Brooks, B. R., & Pande, V. S. (2017). OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. *PLoS Computational Biology*, 13(7), e1005659. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005659>
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Feller, S. E., Zhang, Y., Pastor, R. W., & Brooks, B. R. (1995). Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(11), 4613–4621. <https://doi.org/10.1063/1.470648>
- Fletcher, R., & Reeves, C. M. (1964). Function minimization by conjugate gradients. *The Computer Journal*, 7(2), 149–154. <https://doi.org/10.1093/comjnl/7.2.149>
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V. P. G. A., Petersson, G. A., Nakatsuji, H. J. R. A., & Li, X. (2016). *Gaussian 16 Rev. C.01*.
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Gibbons, D. L., Pricl, S., Posocco, P., Laurini, E., Fermeglia, M., Sun, H., Talpaz, M., Donato, N., & Quintás-Cardama, A. (2014). Molecular dynamics reveal BCR-ABL1 polymutants as a unique mechanism of resistance to PAN-BCR-ABL1 kinase inhibitor therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3550–3555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321173111>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Hubbard, S. R., & Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 373–398. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.373>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jeffrey, G. A., & Jeffrey, G. A. (1997). *An introduction to hydrogen bonding* (Vol. 12). Oxford university press.
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(1), 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kim, S., Lee, J., Jo, S., Brooks, C. L., 3rd, Lee, H. S., & Im, W. (2017). CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 38(21), 1879–1886. <https://doi.org/10.1002/jcc.24829>
- Kornev, A. P., Haste, N. M., Taylor, S. S., & Ten Eyck, L. F. (2006). Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), 17783–17788. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607656103>
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B., & Im, W. (2016). CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Lee, O., Chen, C.-H., Hung, C.-Y., Chang, Y.-L., & Chen, T.-S. (2013). *Azaazulene compounds: Google Patents*.
- Liu, H., & Hou, T. (2016). CaFE: A tool for binding affinity prediction using end-point free energy methods. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(14), 2216–2218. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw215>
- Martyna, G. J., Tobias, D. J., & Klein, M. L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *The Journal of Chemical Physics*, 101(5), 4177–4189. <https://doi.org/10.1063/1.467468>
- Melge, A. R., Kumar, L. G., Pavithran, K., Nair, S. V., & Manzoor, K. (2019). Predictive models for designing potent tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia for understanding its molecular mechanism of resistance by molecular docking and dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 37(18), 4747–4766. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1559765>
- Minciacchi, V. R., Kumar, R., & Krause, D. S. (2021). Chronic myeloid leukemia: A model disease of the past, present and future. *Cells*, 10(1), 117. <https://doi.org/10.3390/cells10010117>

- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, *19*(14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::Aid-jcc10>3.0.Co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::Aid-jcc10>3.0.Co;2-b)
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nagar, B., Bornmann, W. G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D. R., Miller, W. T., Clarkson, B., & Kuriyan, J. (2002). Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Research*, *62*(15), 4236–4243.
- Pemovska, T., Johnson, E., Kontro, M., Repasky, G. A., Chen, J., Wells, P., Cronin, C. N., McTigue, M., Kallioniemi, O., Porkka, K., Murray, B. W., & Wennerberg, K. (2015). Axitinib effectively inhibits BCR-ABL1(T315I) with a distinct binding conformation. *Nature*, *519*(7541), 102–105. <https://doi.org/10.1038/nature14119>
- Peng, Y.-H., Shiao, H.-Y., Tu, C.-H., Liu, P.-M., Hsu, J. T.-A., Amancha, P. K., Wu, J.-S., Coumar, M. S., Chen, C.-H., Wang, S.-Y., Lin, W.-H., Sun, H.-Y., Chao, Y.-S., Lyu, P.-C., Hsieh, H.-P., & Wu, S.-Y. (2013). Protein kinase inhibitor design by targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) motif: The role of the DFG motif in the design of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(10), 3889–3903. <https://doi.org/10.1021/jm400072p>
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., ... Tajkhorshid, E. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics*, *153*(4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>
- Rajendran, V., Gopalakrishnan, C., & Sethumadhavan, R. (2018). Pathological role of a point mutation (T315I) in BCR-ABL1 protein-A computational insight. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(1), 918–925. <https://doi.org/10.1002/jcb.26257>
- Robinson, D. R., Wu, Y. M., & Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, *19*(49), 5548–5557. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203957>
- Rossari, F., Minutolo, F., & Orciuolo, E. (2018). Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: From chemical development to clinical efficacy. *Journal of Hematology & Oncology*, *11*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0624-2>
- Sanner, M. F. (1999). Python: A programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *17*(1), 57–61.
- Saraon, P., Pathmanathan, S., Snider, J., Lyakisheva, A., Wong, V., & Stagljar, I. (2021). Receptor tyrosine kinases and cancer: Oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene*, *40*(24), 4079–4093. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01841-2>
- Somwar, R., Koterski, S., Sweeney, G., Sciotti, R., Djuric, S., Berg, C., Trevillyan, J., Scherer, P. E., Rondinone, C. M., & Klip, A. (2002). A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(52), 50386–50395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205277200>
- Spartan'20 (Version 20.1.3). (2020). Wavefunction, Inc., Q-CHEM.
- Valentin-Escalera, J., García-Dueñas, A. K., Solorio-Alvarado, C. R., Contreras-Celedón, C., Cortés-García, C. J., & Chacón-García, L. (2021). A novel pseudo-three-component synthetic strategy for the synthesis of 1,6-dihydroazaazulenes via cyclization of pyrrolyl-enones. *Synlett*, *32*(14), 1461–1464. <https://doi.org/10.1055/a-1535-6085>
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & Mackerell, A. D., Jr. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(4), 671–690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
- Yaghmaie, M., & Yeung, C. C. (2019). Molecular mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Current Hematologic Malignancy Reports*, *14*(5), 395–404. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00543-7>
- Yamauchi, N., Fujii, H., Kakehi, A., Shiro, M., Kurosawa, M., Konakahara, T., & Abe, N. J. H. (2008). Facile synthesis of (2-benzimidazolyl)-1-azaazulenes, (2-benzothiazolyl)-1-azaazulenes, and related compounds and evaluation of their anticancer in vitro activity. *Heterocycles*, *76*(1), 617. [https://doi.org/10.3987/COM-08-S\(N\)53](https://doi.org/10.3987/COM-08-S(N)53)
- Yang, K., & Fu, L.-W. (2015). Mechanisms of resistance to BCR-ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *93*(3), 277–292. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.11.001>
- Zhu, Y., Alqahtani, S., & Hu, X. (2021). Aromatic rings as molecular determinants for the molecular recognition of protein kinase inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(6), 1776. <https://doi.org/10.3390/molecules26061776>