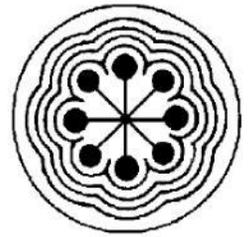




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE  
INVESTIGACIONES NUCLEARES



ININ

FACULTAD DE MEDICINA

**Análisis bioinformático  
del acoplamiento de HYNIC-CXCR4-L  
con el receptor específico quimiocina-4  
y determinación del perfil biocinético  
dosimétrico del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L  
en modelos tumorales murinos**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN FÍSICA MÉDICA

PRESENTA

**Gerardo Bravo Villegas**

**Comité de Tutores:** Dra. en C. Guillermina Ferro Flores  
Dr. en C. Eugenio Torres García  
Dra. en C. Nelly Ma. de la Paz González Rivas



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO 2020

## Contenido

Resumen .....	6
Abstract.....	7
Abreviaturas .....	8
Índice de figuras .....	9
Índice de tablas .....	10
Capítulo 1: Introducción.....	11
Capítulo 2: Estado del arte .....	13
2.1. Pregunta investigación .....	13
2.2. Hipótesis .....	13
2.3. Objetivos .....	13
2.3.1. Objetivo General.....	13
2.3.2. Objetivos Específicos.....	14
Capítulo 3: Marco teórico .....	15
3.1 Péptidos radiomarcados en el desarrollo de radiofármacos.....	15
3.2 Diseño de péptidos y bioinformática .....	17
3.2.2 Dinámica Molecular .....	26
3.2.3 Radiomarcaje de péptidos .....	27
3.2.4 Péptidos Radiomarcados de uso clínico .....	29
Capítulo 4: Metodología .....	31
4.1. Infraestructura y apoyo técnico disponible .....	31
4.2 Diseño de estudio .....	31
4.2.1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación .....	31
4.3. Procedimientos.....	32
4.4 Variables de estudio.....	37
4.5. Implicaciones bioéticas .....	37
4.6. Recolección de datos .....	38
4.7. Análisis estadísticos .....	38
Capítulo 5: Resultados y discusión .....	39
5.1. Acoplamiento Molecular (Docking Molecular) .....	39
5.2. Dinámica Molecular (DM).....	41
5.3. Perfil biocinético y dosimétrico.....	48
Capítulo 6: Discusión .....	55

Capítulo 7: Conclusiones .....	58
Capítulo 8: Trabajo a Futuro .....	58
Capítulo 7: Referencias .....	59
Anexos .....	63
Anexo 1 “Presentación en Congreso” .....	63
Anexo 2 “Artículo: Synthesis and preclinical evaluation of the <sup>99m</sup> Tc-/ <sup>177</sup> Lu-CXCR4-L theranostic pair for in vivo chemokine-4 receptor-specific targeting” .....	64

## Resumen

Las interacciones intermoleculares entre proteínas, hormonas y péptidos desempeñan un papel importante para el funcionamiento de los procesos biológicos. Sin embargo, los procesos patológicos, incluyendo el cáncer, también se encuentran sujetos a la asociación de moléculas por medio del mismo tipo de interacciones. Los receptores proteínicos como blanco de péptidos radiomarcados han tenido gran importancia dentro de la medicina nuclear y la oncología. Dentro de la medicina nuclear molecular, los péptidos radiomarcados son una clase emergente de radiofármacos con reconocimiento molecular específico y permiten implementar técnicas de diagnóstico o terapia altamente eficaces, además tienen la gran ventaja de proveer información fisiológica de procesos biológicos en tiempo real. El  $^{99m}\text{Tc}$  es uno de los radionúclidos empleados comúnmente en el diagnóstico nuclear, puede conjugarse con diversos péptidos, entre ellos, inhibidores del receptor específico de quimiocina-4 (CXCR4), el cual es un receptor transmembranal unido a proteínas G que juega un importante papel en la progresión y metástasis de muchos tipos de cáncer, hecho que centra la atención de los investigadores en dicho receptor CXCR4, como blanco para el desarrollo de fármacos empleados en el diagnóstico y tratamiento de cáncer metastásico. El CXCR4-L (cyclo-D-Tyr-D-[NMe]Orn-Arg-Nal-Gly) es un ligando peptídico pentacíclico con alta afinidad por el receptor de quimiocina-4. Con la finalidad de utilizarlo como un sensor para imagen molecular utilizando técnicas tomográficas de emisión de fotón único (SPECT), el CXCR4-L podría conjugarse al quelante 6-hydrazinyl nicotinamide (HYNIC). El presente trabajo se enfoca en la descripción del acoplamiento de CXCR4-L y HYNIC-CXCR4-L con el receptor específico quimiocina-4 a través del análisis computacional con las técnicas de acoplamiento y dinámica molecular para determinar las características fisicoquímicas como energía de afinidad y tipos de interacciones intermoleculares que intervienen en la formación del aducto proteínico y su estabilidad química. Además, se aborda la determinación del perfil biocinético y dosimétrico del radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L en modelos tumorales murinos.

## Abstract

Intermolecular interactions between proteins, hormones and peptides play an important role in the functioning of biological processes. However, pathological processes, including cancer, are also subject to the association of molecules through the same type of interactions. Protein receptors as a target for radiolabeled peptides have been of great importance in nuclear medicine and oncology. Within molecular nuclear medicine, radiolabeled peptides are an emerging class of radiopharmaceuticals with specific molecular recognition and highly specific diagnostic or therapy techniques can be implemented, they also have the great advantage of providing physiological information of biological processes in real time.  $^{99m}\text{Tc}$  is one of the radionuclides used in nuclear diagnosis, it can be conjugated with various peptides, including inhibitors of the specific chemokine-4 receptor (CXCR4), which is a transmembrane receptor linked to G proteins that plays an important role in the progression and metastasis of many types of cancer, a fact that focuses the attention of researchers on said CXCR4 receptor, as a target for the development of drugs used in the diagnosis and treatment of metastatic cancer. CXCR4-L (Cyclo-D-Tyr-D- [NMe] Orn-Arg-Nal-Gly) is a pentacyclic peptide ligand with high affinity for the chemokine-4 receptor. In order to use it as an image sensor using molecular techniques of single photon emission techniques (SPECT), CXCR4-L could be conjugated to chelator 6-hydrazinyl nicotinamide (HYNIC). The present work focuses on the description of the coupling of CXCR4-L and HYNIC-CXCR4-L with the specific chemokine-4 receptor through computational analysis with coupling techniques and molecular dynamics to determine physicochemical characteristics such as affinity energy and types of intermolecular interactions involved in the formation of the protein adduct and its chemical stability. In addition, the determination of the biokinetic and dosimetric profile of the  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L radiopharmaceutical in murine tumor models is addressed.

## Abreviaturas

$^1\text{H-NMR}$	Resonancia magnética nuclear del átomo de hidrógeno
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnecio-99 metaestable
AG	Algoritmos genéticos
Ala-Scan	Escaneo Alanina
Arg	Arginina
EDA	Estimación de algoritmos de distribución
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosín difosfato
His	Histidina
Ile	Isoleucina
kDa	Kilodaltones
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MD	Dinámica Molecular (Molecular Dynamic)
Phe	Fenilalanina
SAR	Relación estructura actividad
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
Tyr	Tirosina
Val	Valina
CXCR4	Receptor de quimiocina-4
CXCR4-L	Ligando antagónico del receptor de quimiocina-4
HYNIC-CXCR4-L	Ligando antagónico del receptor de quimiocina-4 acoplado a 6-hydrazinylnicotinamida
HYNIC	Agente bifuncional 6-hydrazinylnicotinamida
SDF-1	Factor 1 derivado de células estromales
CXCL12	Motivo C-X-C quimiocina 12, Factor 1 derivado de células estromales
CVX15	Péptido antagónico de CXCR4
$^{68}\text{Ga-Pentixafor}$	Radiotrazador utilizado en Tomografía por emisión de positrones

## Índice de figuras

Figura	Título	Pág
Figura 1	Diagrama de flujo para la realización de acoplamiento molecular automatizado	26
Figura 2	Agentes bifuncionales para el marcado indirecto de péptidos	28
Figura 3	Complejo proteínico formado por CXCR4 y CXCR4-L	40
Figura 4	Esquema de interacciones presentes en el acoplamiento CXCR4 y CXCR4-L	40
Figura 5	Complejo proteínico formado por CXCR4 y HYNIC-CXCR4-L	41
Figura 6	Esquema de interacciones presentes en el acoplamiento CXCR4 y HYNIC-CXCR4-L	41
Figura 7	Fichero em.mdp para configuración del proceso de minimización de energía de cada sistema molecular con su receptor	42
Figura 8	Fichero ie.mdp para configuración del proceso equilibrio NPT	43
Figura 9	Fichero md.mdp para configuración de la ejecución de la dinámica molecular	44
Figura 10	Energía potencial vs tiempo para cada ligando con el receptor CXCR4	45
Figura 11	Trayectoria de energía total en la dinámica molecular de CXCR4 con los ligandos CXCR4-L, HYNIC-CXCR4-L, Pentixafor	46
Figura 12	Radio de giro (Rg) de CXCR4 con los ligandos CXCR4-L, HYNIC-CXCR4-L y Pentixafor	47
Figura 13	Perfil biocinético en hígado para modelo de tumor inducido con células DU-4475	51
Figura 14	Dosis equivalente para cada órgano	52
Figura 15	Relación de captación tumor/órgano	53

## Índice de tablas

Tabla	Título	Pág.
Tabla 1	Puntuaciones de afinidad de modelado por acoplamiento molecular	39
Tabla 2	Datos de pesos de órganos de modelos murinos de 25 g	48
Tabla 3	Factores de conversión de dosis total de $^{99m}\text{Tc}$	48
Tabla 4	Porcentajes de dosis por gramo de órgano (%ID/g) y por órgano (%ID) para tumores inducidos con Du-4475	49
Tabla 5	Porcentajes de dosis por gramo de órgano (%ID/g) y por órgano (%ID) para tumores inducidos con C6	49
Tabla 6	Perfil biocinético por órgano de tumores inducidos con Du-4475, Obtenidos con OLINDA	50
Tabla 7	Perfil biocinético por órgano de tumores inducidos con C6, Obtenidos con OLINDA	50
Tabla 8	Número de desintegraciones totales por órgano para tumores inducidos con Du-4475 y C6	51
Tabla 9	Cálculo de dosis equivalente por órgano	52
Tabla 10	Relación de captación tumor-órgano en modelos murinos de 25g para tumores con células Du-4475 y C6	53

## Capítulo 1: Introducción

Las interacciones intermoleculares entre proteínas, hormonas y péptidos desempeñan un papel importante para el funcionamiento de los procesos biológicos. Sin embargo, los procesos patológicos, incluyendo el cáncer, también se encuentran sujetos a la asociación de moléculas por medio del mismo tipo de interacciones. Los receptores proteínicos como blanco de péptidos radiomarcados han tenido gran importancia dentro de la medicina nuclear y la oncología. Dentro de la medicina nuclear molecular, los péptidos radiomarcados son una clase emergente de radiofármacos con reconocimiento molecular específico y permiten implementar técnicas de diagnóstico o terapia altamente eficaces.

Dentro de la medicina nuclear molecular, los péptidos radiomarcados son una clase emergente de compuestos químicos con reconocimiento molecular específico, permiten implementar técnicas de diagnóstico o terapia altamente eficaces. Conjuntamente tienen la gran ventaja de proveer información funcional en el tiempo y espacio acerca de procesos biológicos a diferencia de los radio-trazadores usados en técnicas de imagen nuclear. El  $^{99m}\text{Tc}$  es uno de los radionúclidos empleados comúnmente en el diagnóstico nuclear, puede conjugarse con diversos péptidos, entre ellos, inhibidores del receptor específico de quimiocina-4 (CXCR4), el cual es un receptor transmembranal unido a proteínas G involucrado en la progresión y metástasis de muchos tipos de cáncer, convirtiéndolo en un blanco potencial para el desarrollo de nuevos radio-trazadores con aplicación en el diagnóstico de cáncer metastásico.

El receptor de quimiocina-4 (CXCR4) es el receptor molecular del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1, también llamado CXCL12) (1), juega un papel fundamental en la progresión, invasividad y metástasis tumoral en más de 30 tipos de cáncer (2).

El CXCR4-L (cyclo-D-Tyr-D-[NMe]Orn-Arg-Nal-Gly) es un ligando peptídico pentacíclico con alta afinidad por el receptor de quimiocina-4 (CXCR4) (3), el cual, al conjugarse con el agente bifuncional 6-hydrazinylnicotinamida (HYNIC) para su

marcado con Tc-99m, puede utilizarse como un sensor para imagen molecular por medio de técnicas tomográficas de emisión de fotón único (SPECT).

El objetivo del presente trabajo se enfoca en la describir el acoplamiento de CXCR4-L y HYNIC-CXCR4-L con CXCR4 a través del análisis computacional con las técnicas de acoplamiento molecular para determinar las características fisicoquímicas como puntuación de afinidad y tipos de interacciones intermoleculares que intervienen en la formación del aducto proteínico. Además, se aborda la determinación del perfil biocinético y dosimétrico del radiofármaco <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-CXCR4-L en modelos tumorales murinos.

## Capítulo 2: Estado del arte

### 2.1. Pregunta investigación

¿Cuál será la magnitud de la energía libre de Gibbs relacionada con afinidad calculada a través de análisis bioinformático del acoplamiento de CXCR4-L y HYNIC-CXCR4-L con el receptor específico quimiocina-4? ¿El HYNIC (molécula altamente lipofílica) acoplada al CXCR4-L funciona como un sitio de anclaje adicional en las cavidades hidrófobas del CXCR4 para disminuir la energía libre de Gibbs y con ello incrementar la afinidad del ligando al receptor? ¿El perfil biocinético y dosimétrico del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L en modelos tumorales murinos mostrará una relación tumor/tejido normal mayor a 1 para la visualización por imagen SPECT de tumores que sobre-expresan a la proteína CXCR4?

### 2.2. Hipótesis

La molécula de HYNIC acoplada al CXCR4-L funciona como un sitio de anclaje adicional en las cavidades hidrófobas del CXCR4 disminuyendo la energía libre de Gibbs e incrementando la afinidad del ligando al receptor, además de quelar con alta eficiencia (>90%) al Tc-99m para la formación del radiotrazador  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L, útil en la detección por SPECT de tumores que sobre-expresan CXCR-4.

### 2.3. Objetivos

#### 2.3.1. Objetivo General

Analizar, a través de herramientas bioinformáticas, el acoplamiento de HYNIC-CXCR4-L con el receptor específico quimiocina-4 y determinar el perfil biocinético y dosimétrico del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L en modelos tumorales murinos.

### 2.3.2. Objetivos Específicos

- Calcular las funciones de puntuación de acoplamiento molecular entre HYNIC-CXCR4-L con el receptor específico quimiocina-4, a través de herramientas bioinformáticas.
- Determinar las trayectorias de energía vs tiempo por dinámica molecular para el aducto formado entre HYNIC-CXCR4-L y su receptor específico quimiocina-4.
- Determinar el perfil biocinético del fármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L, a partir de imágenes de modelos tumorales murinos
- Determinar el perfil dosimétrico del fármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L a partir de la biocinética obtenida.

## Capítulo 3: Marco teórico

### 3.1 Péptidos radiomarcados en el desarrollo de radiofármacos

Las interacciones intermoleculares entre proteínas, hormonas y péptidos desempeñan un papel importante para el funcionamiento de los procesos biológicos. Sin embargo, los procesos patológicos, incluyendo el cáncer, también se encuentran sujetos a la asociación de moléculas por medio del mismo tipo de interacciones (4,5). Los receptores proteínicos como blanco de péptidos radiomarcados han tenido gran importancia dentro de la medicina nuclear y la oncología. Muchos receptores peptídicos se encuentran sobreexpresados en numerosos tipos de cáncer, en comparación con su expresión fisiológica relativamente baja en órganos no patológicos (5), esta característica de sobreexpresión cobra importancia para la obtención de imágenes moleculares *in vivo* y para la terapia de radionúclidos dirigida con sondas peptídicas radiomarcadas.

Con el objetivo de visualizar tumores neuroendócrinos, un grupo de investigadores conformado por Krenning y colaboradores, en 1990, reportaron por primera vez una imagen gammagráfica de los receptores de somatostatina, empleando [<sup>123</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]-octreótido como péptido radiomarcado (5-7). Dicho octreótido (8 aminoácidos) es un análogo de la hormona somatostatina (14 aminoácidos), de manera que el mecanismo de reconocimiento molecular se basó en estimular la inhibición de la liberación de la hormona del crecimiento, que está mediada por receptores de somatostatina (6,7).

Partiendo de la premisa de que la acción biológica de los péptidos está mediada por la unión con alta afinidad por receptores específicos y la sobreexpresión de receptores en procesos tumorales, sienta las bases moleculares para el desarrollo de péptidos radiomarcados para su aplicación como radiofármacos para imágenes de tumores o terapia, en función de radionúclido conjugado (5).

El proceso para el desarrollo exitoso de un radiopéptido dirigido a un receptor específico, puede esquematizarse en 6 pasos (5):

- 1) Identificación del blanco molecular (receptor): Se puede utilizar técnicas experimentales como autoradiografía, inmunohistoquímica, etc. A partir del desarrollo tecnológico y computacional, resulta óptimo utilizar herramientas bioinformáticas para analizar códigos genómicos y proteómicos para optimizar la búsqueda de dichos receptores.
- 2) Síntesis de un péptido o análogo con alta afinidad por el receptor: El diseño de péptidos afines al receptor se basa en la búsqueda de ligandos naturales de alta afinidad por dicho receptor o a través del uso de modelado molecular donde también puede evaluarse la factibilidad teórica sobre la funcionalidad potencial de la unión receptor-ligando y estimar los resultados que podrían esperarse en la etapa experimental, con la finalidad de optimizar tiempos de análisis y aprovechar los recursos disponibles.
- 3) Radiomarcado: Consiste en la unión covalente del péptido sintetizado con un radionúclido para imagen diagnóstica o terapia. Dependiendo de las características del péptido resulta útil la implementación de un agente bifuncional quelante unido a la biomolécula que permita la formación de un complejo con el radionúclido, con la finalidad de mantener la estructura molecular biológicamente activa en el reconocimiento específico sin afectar la afinidad del radiopéptido por su receptor. Deben usarse protocolos de radiomarcado que garanticen una alta pureza radioquímica, actividad específica.
- 4) Caracterización *in vitro*: En esta etapa se realizan pruebas experimentales en cultivos celulares adecuados que sobreexpresen el receptor de interés en la investigación.
- 5) Evaluación *in vivo*: En este paso técnicas de biodistribución e imagen son usadas con modelos animales adecuados para evaluar el comportamiento farmacológico y farmacocinético del péptido radiomarcado.
- 6) Pruebas toxicológicas y pruebas clínicas en humanos: Es una etapa importante en el desarrollo farmacéutico donde se corrobora la seguridad

e inocuidad del radiotrazador diseñado para su aplicación en pruebas clínicas en humanos.

### 3.2 Diseño de péptidos y bioinformática

#### 3.2.1.1 **Diseño de péptidos**

Un péptido es una cadena corta de aminoácidos unidos a través de un enlace tipo amida llamados “enlace peptídico”. Estas cadenas cortas se clasifican en función del número de aminoácidos que contengan: oligopéptido si tiene entre 2 y 10 residuos, polipéptidos si contiene de 10 a 50 residuos, cadenas mayores reciben el nombre de proteínas. Los péptidos tienen funciones biológicas como acción hormonal, neurotransmisora, ligandos de canales iónicos, incluso pueden tener actividad anti-infectiva (8–10). Son moléculas de señalización selectiva, eficaz y específica, pueden unirse a receptores específicos en la superficie celular como: receptores acoplados a proteína G (GPCRs), o canales iónicos donde activan efectos intracelulares. Las propiedades intrínsecas de los péptidos y su atractivo perfil farmacológico proyectan a los péptidos como punto de partida para diseñar terapias novedosas de alta especificidad, seguridad, tolerabilidad y eficacia en humanos (9). Dentro de la biofarmacéutica, la producción con péptidos tiene menor complejidad que productos basados en proteínas completas. El diseño de péptidos para fines clínicos incluye: péptidos multifuncionales y de penetración celular, así como conjugados de fármacos (9,11,12).

Existen diversos métodos y herramientas para el diseño de péptidos; una técnica llamada “Diseño Racional” se basa en iniciar con una secuencia peptídica de estructura cristalina conocida, ya que aporta información de su estructura secundaria y terciaria. Posteriormente se realizan análisis como: las sustituciones de Alanina (Ala-Scan), relación estructura actividad (SAR); con la finalidad de identificar aminoácidos esenciales y posibles sitios de sustitución que sean propensos a eventos de isomerización, glicosilación u oxidación que deben evitarse para preservar la estabilidad del péptido (13).

Otro aspecto importante en el diseño racional de péptidos consiste en mejorar las propiedades fisicoquímicas de los péptidos naturales, ya que suelen presentar tendencia a agregarse que puede resolverse mediante metilaciones en centros hidrófobos o presentar insolubilidad en agua por lo que se debe prestar atención en la distribución de carga y el punto isoeléctrico del péptido en contraste con el pH del producto final que se desea obtener (9,13). Factores que pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas de los péptidos son la adición de estabilizantes de  $\alpha$ -hélices, formación de puentes salinos o puentes de lactama. Es importante resaltar que las mejoras a las propiedades fisicoquímicas del péptido deben corresponder a las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas del péptido terapéutico deseado. El uso de herramientas informáticas de software puede facilitar el diseño racional de péptidos. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de los péptidos siguen siendo un desafío que ha llevado a soluciones subóptimas en su uso como medicamentos (9,13,14).

### **3.2.1.2 Bioinformática**

Sobre la base del desarrollo de los dispositivos de alto rendimiento para la captura de datos en biotecnología, surgió una amplia gama de problemas de optimización dimensional en el campo de la bioinformática y la biología computacional durante la última década. Debido a que las técnicas de optimización clásica solo exploran una parte limitada del espacio de una solución, se propuso el uso de motores de búsqueda aleatorios basados en una población, para superar esta limitación y poder explorar mejor el vasto espacio de soluciones. Los algoritmos genéticos (AG) son las técnicas de optimización evolutiva más conocidas y han sido el método de elección para muchos de los problemas de la bioinformática (5).

La estimación de los algoritmos de distribución (EDAs) es una nueva clase de algoritmos de optimización evolutiva que se desarrollaron como una alternativa natural a los algoritmos genéticos. Las principales ventajas de los EDA sobre los algoritmos genéticos son la ausencia de múltiples parámetros que se

deben ajustar, la expresividad y transparencia del modelo probabilístico que guía el proceso de búsqueda (15,16).

### **3.2.1.3 Acoplamiento molecular (Molecular Docking)**

El campo del acoplamiento molecular ha cobrado auge durante las últimas tres décadas, debido a la necesidad estructural de la Biología molecular y al descubrimiento de fármacos basados en la estructura. Esta área ha crecido en gran medida por el desarrollo tecnológico del poder y capacidad de las computadoras que han facilitado el acceso a bases de datos de pequeñas moléculas y proteínas (17–20).

El Software de acoplamiento molecular automatizado tiene como objetivo comprender y predecir el reconocimiento molecular de manera estructural y energéticamente a través de la afinidad de enlace. El acoplamiento molecular generalmente se realiza entre una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula diana, que suele llamarse “acoplamiento ligando-proteína”. Sin embargo, existe un interés creciente en el acoplamiento proteína-proteína. Algunas de las aplicaciones del acoplamiento molecular convergen en el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos, incluyendo estudios de estructura-actividad, optimización, como asistente en la cristalografía de rayos x para la adaptación de sustratos inhibidores de la densidad electrónica, estudios de mecanismos químicos, entre otros (17).

La aplicación de técnicas computacionales para estudiar el acoplamiento proteína-ligando o proteína-proteína en la predicción de la orientación de un ligando con el sitio de unión de su receptor, ha sido relevante desde las pasadas tres décadas (21,17). Con las estrategias de acoplamiento molecular, es posible calcular la fármaco-compatibilidad de ligandos y su especificidad frente a una macromolécula blanco o la búsqueda de derivados optimizados. Los softwares de acoplamiento molecular emplean algoritmos de búsqueda donde la conformación del ligando se evalúa de manera recursiva hasta converger en una conformación

de mínima energía. A cada conformación se le denomina pose, para evaluarlas y determinar cuál es la de mayor viabilidad energética, se emplea una función de puntuación de afinidad ( $\Delta G$ ) que es representativa de la energía total del sistema ( $U_{\text{Total}}$  en kcal/mol) y se compone la suma de las energías implicadas en interacciones de tipo coulombianas, de Van der Waals, electrostáticas y en la formación de puentes de hidrógeno (22). La complementariedad entre ligando-receptor en sistemas biológicos, está determinada por la forma y superficie electrostática del sitio de unión del receptor y su respectivo ligando. Las técnicas de acoplamiento molecular tienen como objetivo: 1) La predicción de poses: determinar conformaciones del ligando, 2) Cribado virtual: evaluar el acoplamiento de una biblioteca de ligandos respecto a un mismo receptor y 3) Realizar el cálculo aproximado de la afinidad de unión ligando-receptor (23,24)

La metodología de acoplamiento molecular se basa principalmente en dos herramientas básicas: El algoritmo de búsqueda y la función de puntuación de energía para generar y evaluar las conformaciones del ligando.

### **Algoritmos de búsqueda**

Los algoritmos de búsqueda son usados para explorar el entorno de energía libre y encontrar la mejor pose del ligando. Si la función de energía modela correctamente los efectos de entalpía y entropía del sistema termodinámico, la energía global mínima podría corresponder a la conformación experimental ligando-receptor. Sin embargo, considerar los efectos entrópicos es complejo y se utilizan aproximaciones burdas, esto conlleva a obtener discrepancias respecto al modo nativo de unión (23). Existen, en principio, tres métodos de acoplamiento para abordar los efectos entrópicos relacionados con la flexibilidad del ligando y su receptor macromolecular: en el primer caso, la macromolécula y el ligando son considerados como cuerpos rígidos, únicamente se evalúan los grados de libertad traslacionales y rotacionales del ligando, es decir, los grados de libertad internos del ligando no son involucrados; la segunda forma implica que la macromolécula sea considerada como rígida y los grados de libertad traslacionales, rotacionales y

conformacionales (internos) del ligando sean incluidos en la geometría; un tercer método involucra la flexibilidad total o parcial de la macromolécula y todos los grados de libertad del ligando también son evaluados (23). Como se mencionó en la sección anterior, la mayoría de los algoritmos consideran a la macromolécula como un cuerpo rígido y el ligando como una entidad molecular flexible. Es importante concretar que, en este método, los enlaces formados por hibridaciones  $sp^3$  pueden rotar y tanto longitudes como ángulos de enlace se mantienen fijos (22,24).

En función de la metodología para investigar la flexibilidad del ligando, los algoritmos de búsqueda pueden clasificarse en tres grupos: sistemáticos, estocásticos y búsquedas deterministas.

Los algoritmos sistemáticos modelan los grados de libertad del ligando durante la búsqueda. Este grupo de algoritmos puede subdividirse como: 1) exhaustivos: que evalúan los valores de cada grado de libertad en forma combinatoria con base a la rotación de ángulos diédricos del ligando, sujetos a restricciones geométricas y químicas (24), es evidente notar que un ligando con mayor número de grados de libertad, tendrá un problema de optimización más complejo, los programas eHiTs (28) y Glide (29) forman parte de este grupo de algoritmos; 2) construcción incremental: es un enfoque de fragmentación del ligando en partes más pequeñas con la selección y acoplamiento de un fragmento base dentro del sitio de unión del receptor y la posterior reconstrucción del ligando completo, esta estrategia es ampliamente utilizada en el diseño de novo de ligandos con mejores características de acoplamiento (30,31), los programas FlexX (32), Hammerhead (33) son ejemplo de esta categoría; 3) estrategia de conjunto conformacional: acoplan de manera rígida un set de conformaciones del ligando generadas previamente en el sitio de unión, ejemplo de estos softwares son FLOG (34) y Dock 4.0 (35).

Los algoritmos basados en métodos estocásticos se fundamentan en el cambio aleatorio de los grados de libertad rotacional, traslacional y conformacional del ligando en cada paso, esto genera una diversidad de poses que

es evaluada bajo criterios probabilísticos para determinar si cada una es aceptada o no. Ejemplo de estos algoritmos son Monte Carlo (MC), Algoritmos Evolutivos (EAs) (35). En este tipo de algoritmos es necesario ejecutar de manera repetida e independiente el proceso de acoplamiento molecular para aumentar la probabilidad de converger o encontrar una conformación de mínima energía global. Los métodos basados en MC cambian aleatoriamente los grados de libertad del ligando e incorporan una etapa de minimización de energía en cada conformación generada. Las poses son aceptadas o rechazadas de acuerdo con el factor de Boltzmann, que considera la energía de la conformación antes y después del cambio aleatorio, así como la temperatura absoluta. Una variación de este método es el Recocido Simulado (Simulated Annealing) que aplica variaciones de temperatura con el objetivo de aumentar la probabilidad de encontrar la mínima energía global, debido a que un aumento de temperatura puede permitir que ciertas barreras energéticas sean superadas (35). Los EAs son métodos basados en la teoría de la evolución biológica poblacional a través de la selección natural para obtener soluciones óptimas a un problema determinado, en estos métodos se incluyen algoritmos genéticos, programación evolutiva y estrategias de evolución. Los EAs tienen la gran ventaja de poder escapar de los mínimos locales y a la vez poder identificar múltiples soluciones de baja energía (35). Algunos ejemplos de programas de acoplamiento molecular que emplean algoritmos estocásticos son: Prodock (36) e ICM (37) que se basan en métodos MC, GOLD (38) y DockThor (39) basados en EAs, entre otros como PSI-Dock (40) y PLANTS (41).

Respecto a los métodos deterministas, el estado actual del sistema determina las modificaciones a realizar para obtener el estado siguiente, la minimización de energía (EM, por sus siglas en inglés) y la dinámica molecular son ejemplo de este grupo de algoritmos. EM evalúa el entorno energético empleando la dirección asociada con el gradiente de energía potencial llevando al sistema al mínimo local más cercano. Sin embargo, en este método se tiene como limitante la incapacidad para superar barreras energéticas que permitan evaluar otros mínimos locales y poder realizar una evaluación del entorno energético con

mayor eficiencia, por ello, para obtener resultados con mejores aproximaciones, EM se combina (como un método local) con otras estrategias de acoplamiento (24). Los métodos MD, simulan el movimiento de un sistema a través del tiempo en consideración con variables termodinámicas de estado (temperatura y presión). En consecuencia, se obtiene el beneficio de poder incluir de manera natural un disolvente particular, además los grados de libertad del ligando y el receptor son considerados en la simulación. El costo computacional y la posibilidad de que el sistema quede atrapado en un mínimo local resultan ser los principales inconvenientes para este método. Con la finalidad de minimizar dichos inconvenientes, al igual que en el caso de EM, se realizan adaptaciones para combinar MD con otras estrategias (24). Por ejemplo, CDOCKER (42) combina MD con recocido simulado para tal efecto.

Las proteínas en solución adoptan conformaciones variadas al unirse a un ligando debido a efectos de ajuste inducidos, generando que las proteínas existan como un conjunto de estados conformacionales y no como una estructura nativa única. Por ello es importante tomar en cuenta la flexibilidad de la proteína en las estrategias de acoplamiento molecular (43). Las metodologías que se han desarrollado con el objetivo de abordar esta característica pueden clasificarse en: Acoplamiento suave, flexibilidad de la cadena lateral, relajación molecular.

Acoplamiento suave modela pequeños cambios conformacionales como variaciones atómicas de hasta 1 Å y suaviza el término repulsivo del potencial de Lennard-Jones con pequeñas sobreposiciones entre la proteína y los átomos del ligando. Aunque esta metodología es rápida, debe emplearse únicamente para movimientos locales del receptor (44). En 2004, Ferrari y colaboradores obtuvieron mejores resultados al aplicar acoplamiento suave en cribado virtual el estudio de ligandos potenciales de lisozima T4 y un aldol reductasa (44).

El enfoque sobre la flexibilidad de cadena lateral es útil cuando se exceden los límites de acoplamiento suave, en esta estrategia la cadena principal de la proteína se considera fija y sólo se evalúan las conformaciones de las cadenas laterales en función de sus grados de torsión y de libertad, los algoritmos

empleados en esta metodología utilizan como referencia bibliotecas de rotámeros de las cadenas laterales de cada aminoácido (24).

La relajación molecular es empleada para optimizar las conformaciones del complejo proteína-ligando obtenidas por acoplamiento rígido, se utilizan métodos EM, MC, MD. El uso de modelos de disolventes implícitos y las restricciones geométricas en los aminoácidos externos al sitio de unión, son empleados en MD para reducir el espacio de búsqueda y conseguir que la simulación sea eficiente y viable computacionalmente (44).

### **Función de puntuación de energía**

Durante el proceso de acoplamiento molecular, los algoritmos de búsqueda investigan una gran cantidad de conformaciones de ligandos, evaluando la calidad de estas poses de acoplamiento, con la finalidad de guiar los métodos de búsqueda hacia conformaciones de ligandos relevantes. Las funciones de puntuación tienen tres objetivos principales: El primero es distinguir los modos de unión observados experimentalmente, asociándolos con los valores de energía más bajos del paisaje energético, de todas las demás poses exploradas por el algoritmo de búsqueda. El segundo objetivo de las funciones de puntuación es clasificar adecuadamente los ligandos activos e inactivos (cribado virtual). El tercero y más crítico, es que debe predecir las constantes de afinidad y clasificar correctamente varios compuestos según su potencia (estimación de la afinidad de unión).

Los métodos de acoplamiento actuales presentan un buen rendimiento en identificar modos de unión experimentales cuando la flexibilidad no juega un papel muy relevante para una proteína en particular. Sin embargo, la detección de compuestos activos entre un conjunto señuelo de ligandos y la predicción precisa de la afinidad de unión siguen siendo tareas desafiantes, incluso cuando los efectos de ajuste inducidos no son importantes para la unión.

Las funciones de puntuación pueden dividirse en 3 clases:

- Basadas en campos de fuerza
- Empíricas

- Basadas en conocimientos

Las funciones de puntuación basadas en campos de fuerza se derivan de un campo de fuerza clásico y consisten en una suma en términos de energía. Este tipo de función de puntuación normalmente considera las energías de interacción del complejo proteína-ligando (términos no enlazados) y la energía interna del ligando (términos enlazados y no enlazados). Los principales problemas relacionados con el uso de funciones de puntuación basadas en campos de fuerza se relacionan con los choques atómicos que surgen de una fuerte repulsión a distancias cortas como resultado del potencial de Lennard-Jones y la sobreestimación de las interacciones entre átomos cargados. Se han desarrollado algunas variaciones para abordar estos efectos indeseables y se han incluido términos adicionales para calcular otras propiedades como el efecto de solvatación (Zhang et al. 1997; Shoichet et al. 1999).

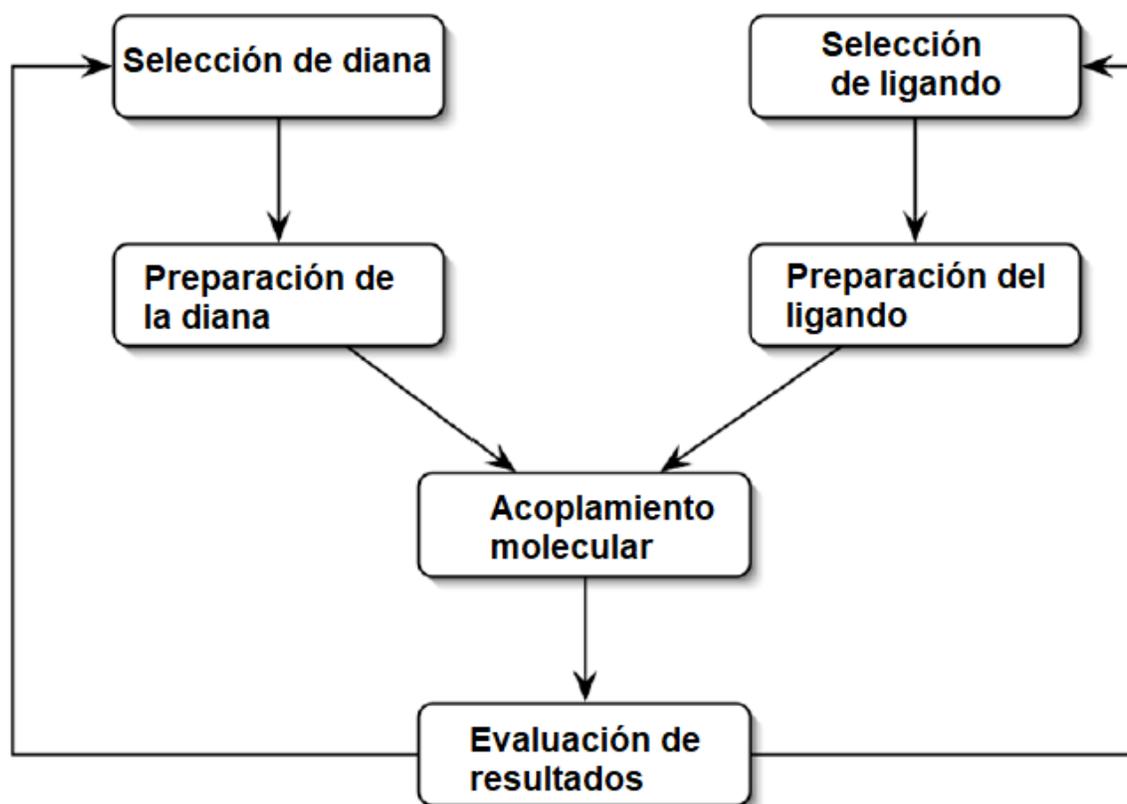
Las funciones de puntuación empíricas se han desarrollado para reproducir datos de afinidad de unión experimentales con alta precisión. Estas funciones se basan en la idea de que es posible correlacionar la energía libre de enlace con una suma ponderada de variables no relacionadas. Los coeficientes asociados con los términos funcionales se pueden obtener mediante un análisis de regresión utilizando datos de afinidad de unión conocidos de estructuras determinadas experimentalmente. Una función de puntuación empírica se puede descomponer en varios términos relacionados con propiedades específicas de interés. Por ejemplo, interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y entropía y se puede escribir en términos de sumatoria de energías.

Las funciones basadas en el conocimiento se han determinado a partir del análisis estadístico de pares de átomos que interactúan a partir de complejos proteína-ligando con estructuras tridimensionales disponibles. Estos datos de átomos por pares se convierten en un pseudopotencial, también conocido como potencial de fuerza media, que describe las geometrías preferidas de los átomos por pares de proteína-ligando (Wallqvist y Covell 1996).

Existe una amplia gama de herramientas de acoplamiento molecular, cada una sujeta a metodologías de procesamiento en particular, de las cuales las más

citadas son AutoDock (<http://autodock.scripps.edu>); DOCK (<http://dock.compbio.ucsf.edu/>); FlexX (<http://www.biosolveit.de/FlexX>); GOLD ([http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life\\_sciences/gold/](http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/)); and ICM (<http://www.molsoft.com/docking.html>) (17,23,25–28).

De manera general realización del acoplamiento molecular consiste en: Selección y preparación de la molécula diana (“target”), selección y preparación de la molécula que será el ligando (“ligand”), ejecución del acoplamiento molecular (Docking) y el análisis de los resultados. Como se muestra en la figura 1.



*Figura 1. Diagrama de flujo para la realización de acoplamiento molecular automatizado (modificado de Hu y col, 2005).*

### 3.2.2 Dinámica Molecular

La dinámica molecular (MD) ha permitido un alcance muy amplio en la Química y Biología al proporcionar una resolución espacial y temporal que no está disponible en los experimentos. Las simulaciones muestrean fácilmente los

movimientos moleculares en la escala  $\mu$ s y las técnicas de conjunto permiten estudiar procesos a escala de milisegundos, como el plegamiento de proteínas. Como primer paso, un usuario típico de MD elige una configuración molecular inicial, describe las interacciones atómicas y la física del modelo, ejecuta una simulación y hace observaciones de la trayectoria. Estas simulaciones evalúan millones de interacciones de partículas durante miles de millones de pasos de tiempo, lo que puede requerir cantidades extraordinarias de hardware y tiempo computacional; la calidad científica del resultado es a menudo proporcional a la cantidad de muestreo. El enorme potencial de aplicación ha llevado a implementaciones de MD en muchos paquetes de software, incluidos GROMACS, AMBER, NAMD, CHARMM, LAMMPS y Desmond.

En la actualidad, han aumentado considerablemente las publicaciones utilizan GROMACS cada año, debido a su versatilidad y una de las partes más interesantes del software libre.

Una de las grandes ventajas de GROMACS es enfoque clave de la suposición fundamental de que los recursos son limitados en la ciencia en muchas ocasiones: GROMACS minimiza el uso de recursos, permite ejecutar más simulaciones, p. ej. a través de métodos de conjunto. GROMACS tiene como objetivo proporcionar el rendimiento y la eficiencia absolutos más altos posibles en cualquier hardware, de modo que tanto el rendimiento máximo alcanzable como el rendimiento real sea alto, para hacer el mejor uso de los recursos computacionales.

### 3.2.3 Radiomarcaje de péptidos

Con la secuenciación completa del genoma, la perspectiva de la medicina se enfoca en obtener imágenes moleculares capaces de diagnosticar alteraciones fenotípicas del cuerpo humano tales como cambios en la actividad enzimática, aumento o disminución de receptores celulares, actividad o integridad celular. La química de radiofármacos se ha perfilado al estudio de la química molecular, y la medicina nuclear busca aprovechar la capacidad que tienen los péptidos radiomarcados para detectar sitios bioquímicos específicos para obtener imágenes moleculares de procesos bioquímicos sin alterarlos (29).

Los métodos para radiomarcar péptidos están basados en los métodos para marcar anticuerpos monoclonales. No obstante, es importante elegir cuidadosamente el método para hacerlo debido a para el caso de los péptidos, al ser moléculas de menor tamaño, existe una menor cantidad de sitios disponibles para enlazar el radionúclido, con ello se corre el riesgo de modificar estructuralmente al péptido causándole la pérdida de su actividad biológica (29,30).

Los métodos para el radiomarcado pueden clasificarse de dos formas: directo e indirecto. Para el marcado directo se emplean agentes reductores que formen especies electrofílicas del radionúclido que se adhieran a los grupos funcionales del péptido. Por ejemplo  $^{99m}\text{Tc}$  es un radionúclido con afinidad hacia los grupos tioles formados por la reducción de puentes disulfuro, las desventajas son: en primer lugar se requiere que el péptido tenga cisteínas cicladas en su estructura, en segundo lugar existe una alta probabilidad de alterar la funcionalidad del péptido (29,30). El método indirecto emplea agentes bifuncionales para unirse por un lado al péptido y por otro al radionúclido, figura 2.

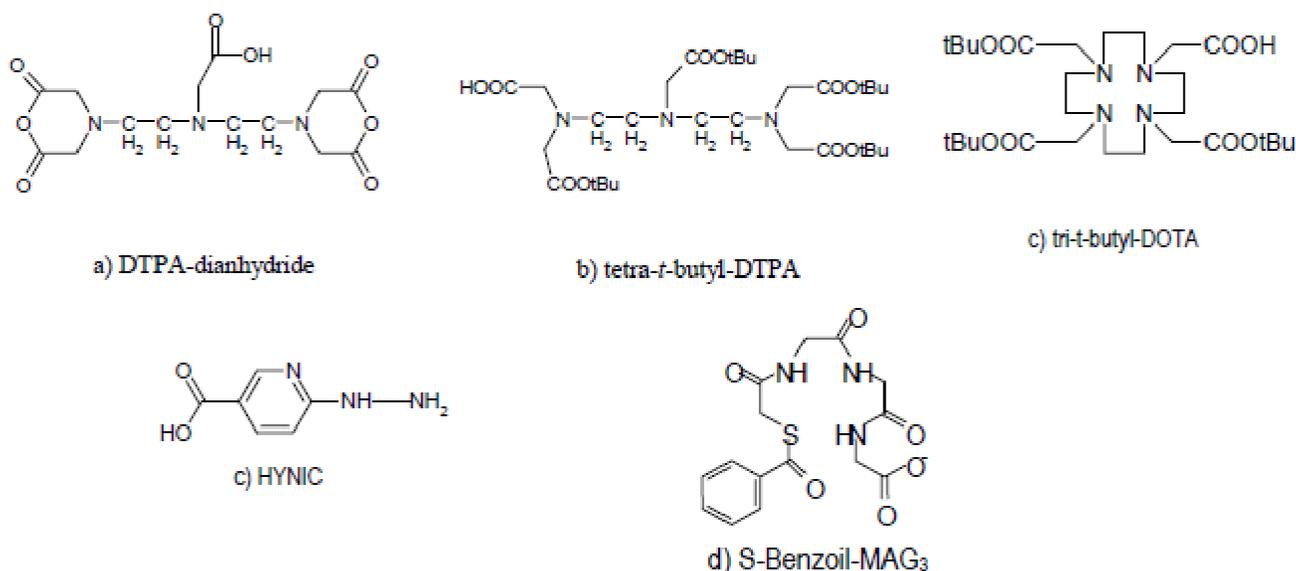


Figura 2. Agentes bifuncionales para el marcado indirecto de péptidos (tomado de Alafort y col, 2002).

Se derivan dos métodos para el marcado indirecto: pre-conjugación y post-conjugación. La pre-conjugación consiste en radiomarcarse al agente bifuncional antes de conjugarlo para evitar exponer al péptido a condiciones extremas de temperatura o pH durante el proceso de marcado. Es importante resaltar que la protección de grupos reactivos debe realizarse antes de la conjugación si existiera más de uno en el péptido, y desprotegerlo al terminar el marcado, así mismo hay que purificar el producto para eliminar reactivos remanentes. Para el marcado post-conjugación consiste en conjugarse el péptido con el agente bifuncional y después marcar el conjugado, en este método se obtiene un producto único y no requiere purificación (5,29).

### 3.2.4 Péptidos Radiomarcados de uso clínico

#### 1.1.4.1 Inhibidores de receptor específico de quimiocina-4 (CXCR4)

El receptor específico de quimiocina-4 (CXCR4) es una proteína transmembranal sobreexpresada en más de 23 tipos de cánceres que afectan al humano, lo que lo vuelve una molécula blanco para el tratamiento y diagnóstico nuclear. Se ha empleado  $^{68}\text{Ga}$ -Pentixafor<sup>®</sup>, un ciclopentapéptido radiomarcado con galio-68, como trazador en tomografía por emisión de positrones (PET) para visualizar al receptor CXCR4 (4,31–33). A través de estudios preclínicos, con el ligando (N-[ $^{11}\text{C}$ ]metil-AMD3465) útil en PET, se ha podido obtener imágenes confiables de la expresión de CXCR4 en gliomas (34). Estos trazadores de PET tienen un potencial aplicación útil en la identificación de pacientes en quienes una terapia dirigida a CXCR4 como blanco tendría beneficio para ellos. Sin embargo, con la finalidad permitir la producción de trazadores comerciales de menor costo, la posibilidad de desarrollar radiopéptidos marcados con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para tomografía por emisión de fotón único (SPECT) permitiría la detección con gran exactitud de la proteína CXCR4 y con mayor accesibilidad alrededor del mundo.

En este afán el péptido cíclico T140<sup>®</sup> conformado por 14 aminoácidos tiene una alta actividad antagonista hacia el receptor CXCR4. Las características de la unión química ligando-receptor muestran que el núcleo Arg<sup>2</sup>, NaI<sup>3</sup>, Tyr<sup>5</sup> y Arg<sup>14</sup> de ligando T140<sup>®</sup> es clave en el reconocimiento específico por CXCR4, formándose

interacciones polares y puentes de hidrógeno entre Arg2 y Arg14 de T140® con las cadenas laterales de los residuos Asp171, Asp262, Thr117 y His117 de la proteína CXCR4, así como también un sitio de anclaje peptídico entre NaI3 y Tyr5 de T140® con la región hidrofóbica de la  $\alpha$ -hélice V del receptor CXCR4 (35). Con base a este núcleo de interacción de T140®, Fuji y colaboradores (2003), diseñaron el cyclopentapéptido (ciclo-Tyr<sup>5</sup>-Arg<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-NaI<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>) con una actividad antagonista mejorada (36).

En la búsqueda de una utilidad terapéutica con radionúclidos, Demmer y colaboradores (37) agregaron [NMe]Orn al residuo Arg<sup>1</sup> para poder unir al agente quelante bifuncional DOTA (ácido 1,4,7,10-tetracyclododecano-1,4,7,10-tetracético), con ello lograr el radiomarcado con <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu y <sup>90</sup>Y (Pentixafor®), determinaron que la metilación en [NMe]-Orn era crítica para mantener la afinidad del ligando por el receptor CXCR4 (37). Un antagonista de CXCR4 radiomarcado con <sup>99m</sup>Tc de estructura similar sin considerar la metilación de Orn fue reportado por Mikaeili y colaboradores en 2018 (37).

El ligando IT1t®, de origen no peptídico interactúa como un potente antagónico a través de puentes salinos con los grupos carboxílicos de las cadenas laterales de Asp<sup>97</sup> y Glu<sup>288</sup> de CXCR4 (38,39). CVX15 es otro antagonista importante, estructuralmente es un ciclopéptido de 16 residuos con alta afinidad a CXCR4 (39).

A lo largo de investigaciones realizadas, es observable que tanto los ligandos T140®, IT1t, CVX15 y Pentixafor® convergen en la interacción con la hélice V y VI de la proteína CXCR4.

## Capítulo 4: Metodología

### 4.1. Infraestructura y apoyo técnico disponible

- Equipo de cómputo para realizar docking molecular y dinámica molecular (Laboratorio de Simulación Monte Carlo, Facultad de Medicina UAEMéx, Dr. en C. Eugenio Torres García, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UNAM-UAEMex, Dra. en C. Ma. de la Paz Nelly González Rivas)
  - Software: AutoDock Vina, Avogadro, Chimera, Discovery Studio 2019, AutoDock Tools, ConTEXT.
  - Para Dinámica molecular se usará la paquetería de software: GROMACS Software Package.
- Determinación del perfil biocinético y dosimétrico (ININ, Dra. en C. Guillermina Ferro Flores)
- Conjugación y radomarcado del péptido modificado con  $^{99m}\text{Tc}$  (ININ, Dra. en C. Guillermina Ferro Flores)
- Análisis estadístico: SigmaPlot

### 4.2 Diseño de estudio

#### 4.2.1. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

##### **Criterios de inclusión:**

- Se incluyeron las estructuras de acoplamiento con funciones de puntuación de AutoDock vina cuyo valor absoluto fuese mayor a 8 kcal/mol.

##### **Criterios de Exclusión:**

- Se eliminaron las estructuras que difieran en más de 3 kcal/mol respecto a la pose de mayor puntuación en AutoDock vina.

## **Criterios de Eliminación:**

- Estructuras que pierdan conexión entre los átomos en la simulación de acoplamiento o dinámica molecular.

### 4.3. Procedimientos

#### **4.3.1 Docking y Dinámica Molecular**

- Preparación del Receptor: Se utilizó la estructura proteínica de CXCR4 obtenida de Protein Data Bank con clave 3OEO, la cual se editó eliminando las moléculas de agua, asociadas a la estructura proteínica, dejando exclusivamente la cadena principal de aminoácidos, mediante modelado por homología con SWISS-MODEL se completaron átomos faltantes en la cadena de aminoácidos, debido a la resolución del modelo 3OEO por difracción de rayos X (2.90 Å), se adicionaron los hidrógenos polares para una condición de pH=7.4 fisiológico.
- Preparación del Ligandos:
  - Control: Se utilizó la estructura CVX15 como ligando, incluida en la estructura PDB:3OEO, para validar los resultados a través de re-docking. De la misma forma la molécula se editó para la eliminación de moléculas de agua de la estructura, se agregaron los hidrógenos polares para una condición de pH=7.4 fisiológico y se optimizó empleando MOPAC con el algoritmo de mecánica cuántica PM7.
    - Propiedad del ININ
      - Ligando 1: CXCR4-L
      - Ligando 2: HYNIC-CXCR4-L
    - Péptido comercial usado en PET
      - <sup>68</sup>Ga-Pentixafor®

Las estructuras se editarán en ChemDraw 18.1 para general los modelos 2D y se producirá el modelo con coordenadas cartesianas en

formato “.pdb” a través de Chem3D 18.1, las moléculas se optimizarán en MOPAC con el algoritmo PM7 de mecánica cuántica.

- La configuración para la ejecución del docking se realizó con un tamaño de caja centrado en las coordenadas del ligando CVX15 incluido en la estructura pdb 3OEO y un tamaño de caja de búsqueda de 55 angstroms, se generaron 20 poses por cada ligando y se realizaron 5 repeticiones para realizar un análisis estadístico.
- La ejecución del modelado por acoplamiento molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Simulaciones de Monte Carlo en la Facultad de Medicina, UAEMéx.
- El análisis de los resultados de acoplamiento molecular consistió determinar la estadística descriptiva de cada ligando, la validación con CVX15 se realizó a través de la comparación con datos experimentales reportados en la literatura.
- Se revisaron las interacciones moleculares con el software Discovery Studio 2020 para cuantificar los puentes de hidrógeno formados y generar los esquemas correspondientes de cada aducto proteínico formado.
- Se recalculó la energía del sistema en cada modelo filtrados mediante la paquetería de software GROMACS ejecutando análisis por dinámica molecular empleando el campo de fuerza CHARMM36.

#### **4.3.2 Perfil biocinético y dosimétrico**

##### **Preparación de $^{99m}\text{Tc}$ - HYNIC-CXCR4-L**

###### **Materiales**

El péptido ciclo-D-Tyr-D- [NMe] Orn (HYNIC) -Arg-Nal-Gly (PM 837 g/mol) (HYNIC-CXCR4-L) se utilizó para el marcaje con  $^{99m}\text{Tc}$  el péptido fue diseñado en el ININ y adquirido a través de una síntesis personalizada por medio de Zhejiang Ontores Biotechnologies Co. Ltd. El péptido fue caracterizado y analizado mediante espectroscopias de masas (MALDI) e IR

(ATR-FTIR), así como cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). El tecnecio ( $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ ) se obtuvo de un generador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (ININ, México).

### **Radiomarcado**

Preparación de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L ( $^{99m}\text{Tc}$ -CXCR4-L)

El HYNIC-CXCR4-L marcado con tecnecio-99m se obtuvo mediante la reconstitución de una formulación liofilizada (HYNIC-CXCR4-L, 0,05 mg, 0,06 mmol; ácido etilendiamina-N, N-diacético, 10 mg; tricina, 20 mg; manitol 50 mg) con una solución de  $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$  (925 MBq, 2 mL, NaCl al 0,9%) e incubación de la solución en baño seco a 9 ° C durante 10 min.

Evaluación de la pureza radioquímica

Mediante el uso de radiocromatografía radio-HPLC (columna  $\mu$ -Bondapak C18, Waters, 3,9 x 300 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ), se evaluó la pureza radioquímica del  $^{99m}\text{Tc}$ -CXCR4-L (equipo Shimadzu en línea con un detector de radiactividad Gabi-Raytest). Se utilizó un gradiente lineal (disolvente A: TFA al 0.1% / agua; disolvente B: TFA al 01% / acetonitrilo), con un flujo de 1 mL / min (disolvente B: de 0 a 70% de en 20 min).

### **Biodistribución**

Los estudios de biodistribución de  $^{99m}\text{Tc}$ -CXCR4-L en ratones se llevaron a cabo de acuerdo con las normas éticas (normas internacionales y nacionales) para el manejo de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999). Se indujeron tumores C6 (glioma) o DU-4475 (cáncer de mama) en la parte superior de la espalda de ratones atómicos (21-23 g, hembra de 7 semanas de edad) mediante inyección subcutánea de células C6 o DU-4475 ( $2 \times 10^6$  células / 0.1 ml de NaCl al 0.9%). Se inyectó  $^{99m}\text{Tc}$ -CXCR4-L en la vena de la cola de ratones (0.05 ml, 3,7 MBq, 0,2  $\mu\text{g}$  de péptido). A las 0,5, 1, 3 y 24 h ( $^{99m}\text{Tc}$  CXCR4-L) después de la inyección (n = 3 en cada punto temporal), se sacrificaron los ratones. Los órganos disecados (hígado, bazo, páncreas, pulmón, riñones, corazón) y muestras de

tejido (tumor, intestinos, músculo, sangre) se contaron para determinar la presencia de radiactividad (recuentos por minuto, c.p.m.) en un detector de NaI(Tl). También se contó una muestra de la solución inicial de  $^{99m}\text{Tc}$ -CXCR4-L (0.05 mL, 3.7 MBq) que representaba el 100% de la actividad inyectada para calcular el % ID/g (porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido). A las 3 h, se llevaron a cabo estudios de biodistribución adicionales en animales co-inyectados con CXCR4-L frío (0.1 ml de una solución de 1,0  $\mu\text{mol} / \text{ml}$ ) (grupo CXCR4 bloqueado, n = 3).

### **Modelo biocinético**

A partir de datos de biodistribución de  $^{99m}\text{Tc}$ -CXCR4-L en ratones con tumores inducidos con células de glioma C6 y DU-4475 y el porcentaje de actividad por órgano (sangre, pulmón, hígado, bazo, riñón, intestino, tumor) respecto al tiempo (t= 20 min, 1h, 3h, 24h), se ajustó el modelo biocinético a una cinética de primer orden calculando el total de desintegraciones por órgano mediante el código OLINDA, se tomaron en cuenta los valores S para cada órgano en modelos murinos, con ellos se calcularon las dosis equivalentes y efectiva para obtener el perfil dosimétrico, de acuerdo a la metodología MIRD basados en la ecuación (1) para el cálculo de la dosis absorbida en un órgano:

$$\bar{D} = \frac{\tilde{A} \sum n_i E_i \phi_i}{m} \quad (1)$$

Donde  $\bar{D}$  = dosis absorbida (Gy);  $\tilde{A}$  = es la actividad acumulada (MBq·s);  $n_i$ = número de partículas con energía  $E_i$  emitidas por transición nuclear;  $E_i$ = energía por partícula (MeV);  $\phi_i$  = fracción de la energía absorbida en el blanco; m= masa de la región blanco (kg).

El término “actividad acumulada” ( $\tilde{A}$ ) es el área bajo la curva de actividad-tiempo para un órgano fuente o región. Como la actividad es el número de

desintegraciones por unidad de tiempo, integrando ésta sobre el tiempo da el número total de desintegraciones.

$$\tilde{A} = \int_0^t A_h(t) dt \cdot \quad (2)$$

La ecuación de la dosis absorbida en el sistema MIRD (“Medical Internal Radiation Dosimetry”) es una representación simplificada de la ecuación (1) como sigue:

$$\bar{D} = \tilde{A} S \quad (3)$$

La actividad acumulada representa el factor biológico como anteriormente se explicó, mientras que el factor “S” engloba a todos los parámetros físicos involucrados en la evaluación de la dosis absorbida:

$$S = \frac{\sum_i n_i E_i \phi_i}{m} \quad (4)$$

Para más de un órgano se consideran varios blancos para los que se requiere saber la dosis absorbida. En este caso, la ecuación MIRD necesita ser resuelta para cada región fuente ( $r_h$ ) y para cada región blanco ( $r_k$ ) como sigue:

$$\bar{D}(r_k \leftarrow r_h) = \sum_h \tilde{A}_h S(r_k \leftarrow r_h) \quad (5)$$

Utilizando el código OLINDA (Organ Level Internal Dose Assessment), se expresó la dosis como:

$$D = N \times DF \quad (6)$$

Donde N es el número de desintegraciones que ocurren en un órgano fuente, y DF (el factor de dosis) es:

$$DF = \left( k \sum_i n_i E_i \phi_i \right) / m \quad (7)$$

El DF matemáticamente es el mismo que el valor S. El número de desintegraciones es la integral de la curva tiempo-actividad para una región fuente. La integral de esta función tiene unidades de actividad x tiempo (Bq s). Se utilizó el número de desintegraciones que ocurren en una región fuente para obtener la dosis total para las regiones blanco seleccionadas. En este trabajo se utilizó el número de desintegraciones que ocurren en una región fuente por unidad de actividad administrada, definida como N en unidades de Bq-s/Bq administrado.

El DF matemáticamente es el mismo que el valor S. El número de desintegraciones es la integral de la curva tiempo-actividad para una región fuente. Se utilizó el número de desintegraciones que ocurren en una región fuente para obtener la dosis total para las regiones blanco seleccionadas.

#### 4.4 Variables de estudio

Independientes: pH, Temperatura, Presión, osmótica, Actividad por órgano, Valores S para modelos murinos (OLINDA)

Dependientes: Energía de Afinidad, Estabilidad, Dosis equivalente, Dosis efectiva

Intervinientes: Conformación estructural, Energía libre de Gibbs, Entalpías.

#### 4.5. Implicaciones bioéticas

La ejecución de las pruebas en modelos murinos se realizará mediante las normas vigentes de manejo de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999, también se considerará los factores de protección radiológica para minimizar el impacto de la exposición hacia el personal que colabore en el presente proyecto

#### 4.6. Recolección de datos

Se recolectarán los datos de acuerdo con las variables establecidas, serán tanto de frecuencias como valores medidos para cada variable se registrarán en la bitácora de investigación para su posterior análisis estadístico

#### 4.7. Análisis estadísticos

Para determinar si existe diferencia significativa entre los resultados del análisis bioinformático se utilizará una prueba t-student, empleando el software SigmaPlot de igual forma en la determinación del perfil biocinético y dosimétrico en modelos murinos.

## Capítulo 5: Resultados y discusión

### 5.1. Acoplamiento Molecular (Docking Molecular)

En la tabla 1 se presentan los valores de las funciones de puntuación de afinidad como resultado de cada modelado por acoplamiento molecular, tomando los valores promedio de las 5 repeticiones (D1, D2, D3, D4, D5) el ligante HYNIC-CXCR4-L muestra una puntuación mejor (-10.8 kcal/mol) respecto al ligante CXCR4-L (-9.5 kcal/mol) y al ligante Pentixafor (-9.00 kcal/mol), por casi un orden de magnitud mayor que se refleja al momento de determinar la constante de inhibición ( $K_i$ ), este comportamiento es compatible con la hipótesis planteada respecto al grupo HYNIC como un sitio adicional de anclaje en la unión del ligante con el receptor de quimicina-4. A su vez se muestra que HYNIC-CXCR4-L podría presentar resultados confiables para la detección del receptor por imagen SPECT respecto a su análogo comercial Pentixafor utilizado en imagen PET. Generando un candidato prometedor para su aplicación en imagen molecular diagnóstica a un costo menor.

*Tabla 1. El parámetro de “Afinidad” se refiere a los valores de la función de puntuación de afinidad obtenidas con AutoDock vina 1.1.2. Los encabezados D1, D2, D3, D4, D5, representan cada una de las repeticiones de la ejecución de acoplamiento molecular, los valores  $K_i$  (constante de inhibición) se determinaron a través de la ecuación descrita en el manual de AutoDock4 <<  $K_i = \exp(\text{Afinidad}/(R \cdot T))$  >> presentando los valores en unidad nanomolar.*

Molécula	Afinidad (kcal/mol)					PROMEDIO	SD	Ki (nM)
	D1	D2	D3	D4	D5			
CVX15	-9.20	-9.00	-9.20	-9.30	-8.70	-9.10	0.24	205.00
Pentixafor	-9.10	-9.10	-9.30	-8.30	-9.00	-9.00	0.38	243.00
CXCR4-L	-9.50	-9.60	-9.50	-9.50	-9.60	-9.50	0.05	104.00
HYNIC-CXCR4-L	-11.00	-10.90	-10.90	-10.50	-10.90	-10.80	0.19	12.00

La representación de los complejos proteína-ligando formados se muestra en la figura 3 y 4.

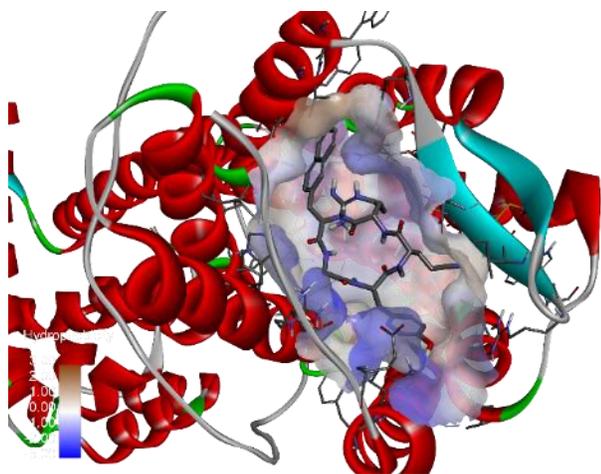


Figura 3. Complejo proteínico formado por CXCR4 (representación en forma de listón) y el ciclopentapéptido CXCR4-L.

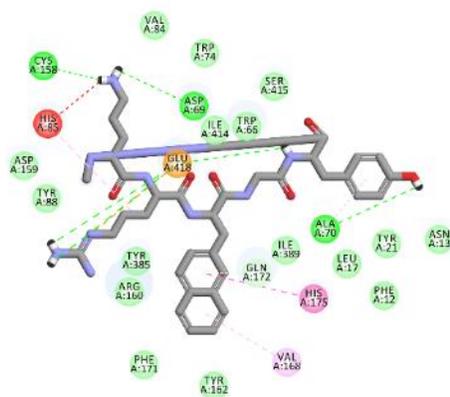


Figura 4. Esquema de interacciones presentes en el acoplamiento CXCR4 (esferas) y CXCR4-L (representación en trazo).

Las figuras 3 y 4 corresponden al aducto formado por el ligando CXCR4-L y el receptor CXCR4, como se muestra en la figura 3 existe la formación de 3 puentes hidrógeno entre los aminoácidos Asp69, Ala70, Cys158 del receptor con al ligando pentacíclico, es perceptible que la His85 de CXCR4 tiene una repulsión por cercanía entre dos grupos donadores de densidades electrónicas.

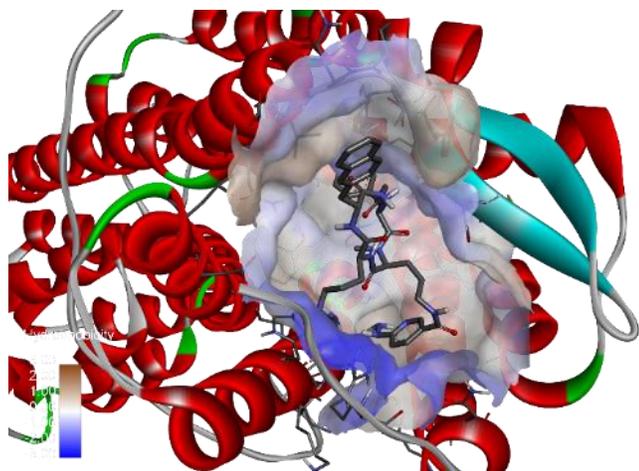


Figura 5. Complejo proteínico formado por CXCR4 (representación en forma de listón) y el ciclopentapéptido HYNIC-CXCR4-L.

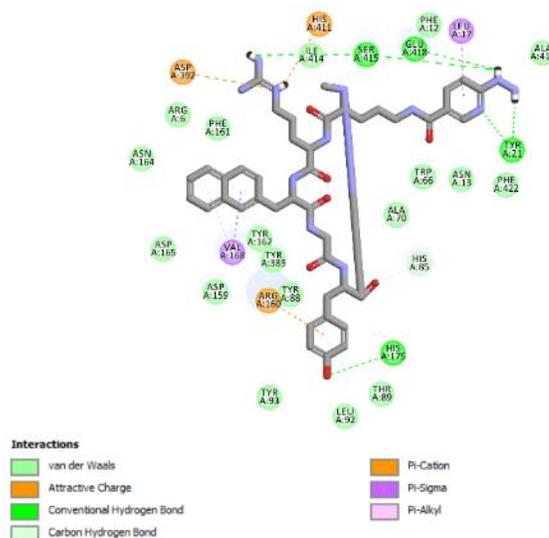


Figura 6. Esquema de interacciones presentes en el acoplamiento CXCR4 (esferas) y CXCR4-L (representación en trazo).

Las interacciones formadas por el ligante HYNIC-CXCR4-L y el receptor de quimiocina-4 (Figuras 5 y 6) mantiene interacciones de tipo electrostático en el sitio activo del receptor. Se generan 3 puentes de hidrógeno entre el grupo HYNIC y Tyr21, Ser415, Glu418 del receptor CXCR4, un puente de hidrógeno adicional está conformado por la interacción de la His175 y el oxígeno del anillo aromático de Tirosina en el ligante, implicando total de 4 puentes de hidrógeno respecto a la interacción del receptor con CXCR4-L, además la repulsión electrostática se desaparece al agregar el agente bifuncional HYNIC al ligante. Con ello se comprueba que el grupo funcional HYNIC propicia un sitio adicional de anclaje para garantizar la afinidad del ligante por el receptor.

## 5.2. Dinámica Molecular (DM)

La configuración para cada sistema CXCR4-L, HYNIC-CXCR4-L se presentan en la siguiente sección.

En el proceso de minimización de energía se busca una conformación molecular de energía mínima para considerar que el sistema se encuentra relajado

(energéticamente), es decir que no presenta tensiones estructurales que afecten las interacciones intramoleculares debido a, una inestabilidad molecular, el archivo de configuración denominado em.mdp como se ajustó como lo muestra en la Figura 7.

```
-----  
; LINES STARTING WITH ';' ARE COMMENTS  
title           = Minimization           ; Title of run  
  
; Parameters describing what to do, when to stop and what to save  
integrator      = steep                  ; Algorithm (steep = steepest descent minimization)  
emtol          = 1000.0                 ; Stop minimization when the maximum force < 10.0 kJ/mol  
emstep         = 0.01                   ; Energy step size  
nsteps         = 50000                  ; Maximum number of (minimization) steps to perform  
  
; Parameters describing how to find the neighbors of each atom and how to calculate the interactions  
nstlist        = 1                      ; Frequency to update the neighbor list and long range forces  
cutoff-scheme  = Verlet  
ns_type        = grid                   ; Method to determine neighbor list (simple, grid)  
rlist          = 1.2                    ; Cut-off for making neighbor list (short range forces)  
coulombtype    = PME                    ; Treatment of long range electrostatic interactions  
rcoulomb       = 1.2                    ; long range electrostatic cut-off  
vdwtype        = cutoff  
vdw-modifier   = force-switch  
rvdw-switch    = 1.0  
rvdw           = 1.2                    ; long range Van der Waals cut-off  
pbc            = xyz                     ; Periodic Boundary Conditions  
DispCorr       = no
```

*Figura 7. Fichero em.mdp para configuración del proceso de minimización de energía de cada sistema molecular con su receptor*

Es importante denotar que se utilizó un esquema de corte tipo Verlet como lo manejó Huang, X. *et al*, 2003 (40) y considerar las interacciones electrostáticas de largo alcance se empleó la malla de partículas de Ewalds (PME).

Como paso subsecuente, una vez que se determinó la conformación de mayor estabilidad en el sistema, se ejecutó un equilibrio NPT para encontrar una fase de temperatura y presión adecuadas para la asignación de ecuaciones de movimiento a cada átomo y que no se ocasionara una ruptura molecular por exceso de presión en el sistema. Se empleó como baróstato el modelo de Parrinello-Rahman como lo utilizó Cutolo, et al. 2016 (41) con su ligando endógeno CXCL12.

El archivo de configuración para este proceso se ajustó como lo indica la figura 8.

```

title = Protein-ligand complex MD simulation
; Run parameters
integrator = md ; leap-frog integrator
nsteps = 10000000 ; 1 * 10000000 = 10000 ps (10 ns)
dt = 0.001 ; 1 fs
; Output control
nstenergy = 5000 ; save energies every 10.0 ps
nstlog = 5000 ; update log file every 10.0 ps
nstxout-compressed = 5000 ; save coordinates every 10.0 ps
energygrps = Protein CXL1
; Bond parameters
continuation = yes ; continuing from NPT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = h-bonds ; bonds to H are constrained
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4 ; also related to accuracy
; Neighbor searching and vdW
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid ; search neighboring grid cells
nstlist = 20 ; largely irrelevant with Verlet
rlist = 1.2
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
rcoulomb = 1.2
pme_order = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein CXL1 Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl = Parrinello-Rahman ; pressure coupling is on for NPT
pcoupltype = isotropic ; uniform scaling of box vectors
tau_p = 2.0 ; time constant, in ps
ref_p = 1.0 ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Dispersion correction is not used for proteins with the C36 additive FF
DispCorr = no
; Velocity generation
gen_vel = no ; continuing from NPT equilibration

```

Figura 8. Fichero ie.mdp para configuración de proceso de equilibrio NPT

```

|title = Protein-ligand complex MD simulation
; Run parameters
integrator = md ; leap-frog integrator
nsteps = 10000000 ; 1 * 10000000 = 10000 ps (10 ns)
dt = 0.001 ; 1 fs
; Output control
nstenergy = 5000 ; save energies every 10.0 ps
nstlog = 5000 ; update log file every 10.0 ps
nstxout-compressed = 5000 ; save coordinates every 10.0 ps
; Bond parameters
continuation = yes ; continuing from NPT
constraint_algorithm = lincs ; holonomic constraints
constraints = h-bonds ; bonds to H are constrained
lincs_iter = 1 ; accuracy of LINCS
lincs_order = 4 ; also related to accuracy
; Neighbor searching and vdW
cutoff-scheme = Verlet
ns_type = grid ; search neighboring grid cells
nstlist = 20 ; largely irrelevant with Verlet
rlist = 1.2
vdwtype = cutoff
vdw-modifier = force-switch
rvdw-switch = 1.0
rvdw = 1.2 ; short-range van der Waals cutoff (in nm)
; Electrostatics
coulombtype = PME ; Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics
rcoulomb = 1.2
pme_order = 4 ; cubic interpolation
fourierspacing = 0.16 ; grid spacing for FFT
; Temperature coupling
tcoupl = V-rescale ; modified Berendsen thermostat
tc-grps = Protein_CXL1 Water_and_ions ; two coupling groups - more accurate
tau_t = 0.1 0.1 ; time constant, in ps
ref_t = 300 300 ; reference temperature, one for each group, in K
; Pressure coupling
pcoupl = Parrinello-Rahman ; pressure coupling is on for NPT
pcoupltype = isotropic ; uniform scaling of box vectors
tau_p = 2.0 ; time constant, in ps
ref_p = 1.0 ; reference pressure, in bar
compressibility = 4.5e-5 ; isothermal compressibility of water, bar^-1
; Periodic boundary conditions
pbc = xyz ; 3-D PBC
; Dispersion correction is not used for proteins with the C36 additive FF
DispCorr = no
; Velocity generation
gen_vel = no ; continuing from NPT equilibration

```

Figura 9. Fichero md.mdp de configuración para la ejecución de la Dinámica molecular

Para la ejecución de la dinámica molecular se utilizó el archivo de configuración llamado md.mdp, como describe la figura 9. Se realizó la dinámica molecular durante 10 ns con diferencia de tiempo pasos de 1 fs. Para determinar la componente de Van de Waals se utilizó el algoritmo de tipo Verlet con radio de 1.0 a 1.2 nm. El potencial electrostático se calculó como partícula de Mesh Ewald para interacciones de largo alcance, el acoplamiento térmico se utilizó el termostato modificado de Berendsen, y como barómetro se usó Parrinello-Rahman. Como condiciones periódicas de límite se utilizó el modelo 3-D PBC.

En el cálculo de la minimización, la energía potencial de HYNIC-CXCR4-L cuyo valor fue de  $-2.68\text{E}+06$  kJ/mol mostrando una unión de mayor estabilidad en comparación con las energías potenciales de CXCR4-L y Pentixafor los cuales fueron de  $-2.57\text{E}+06$  kJ/mol y  $-2.59\text{E}+06$ , respectivamente, los diagramas se muestran en la Figura 10. El comportamiento de diferencias de un orden de magnitud en la afinidad del ligando HYNIC-CXCR4-L en comparación con el ligando CXCR4 no aparece visible en la minimización energética, como se esperaba respecto al análisis de acoplamiento molecular, Tabla 1. Sin embargo, el comportamiento energético es coherente con que el agente bifuncional HYNIC aporta un sitio más de anclaje, mejorando su afinidad por el receptor CXCR4.

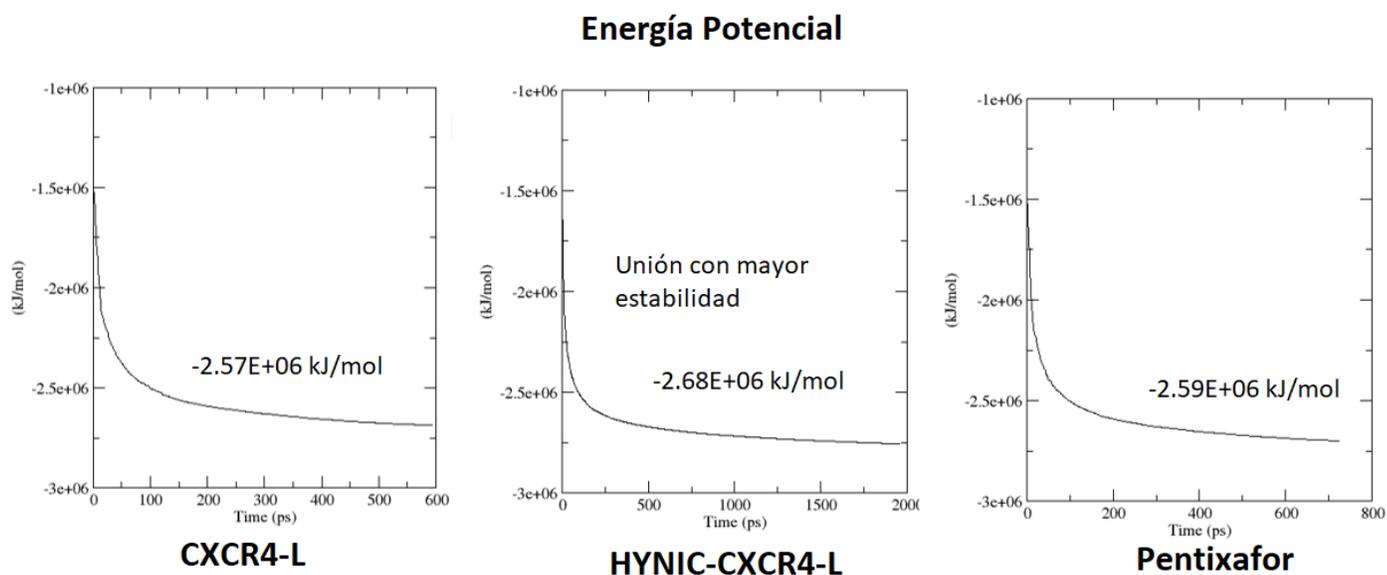
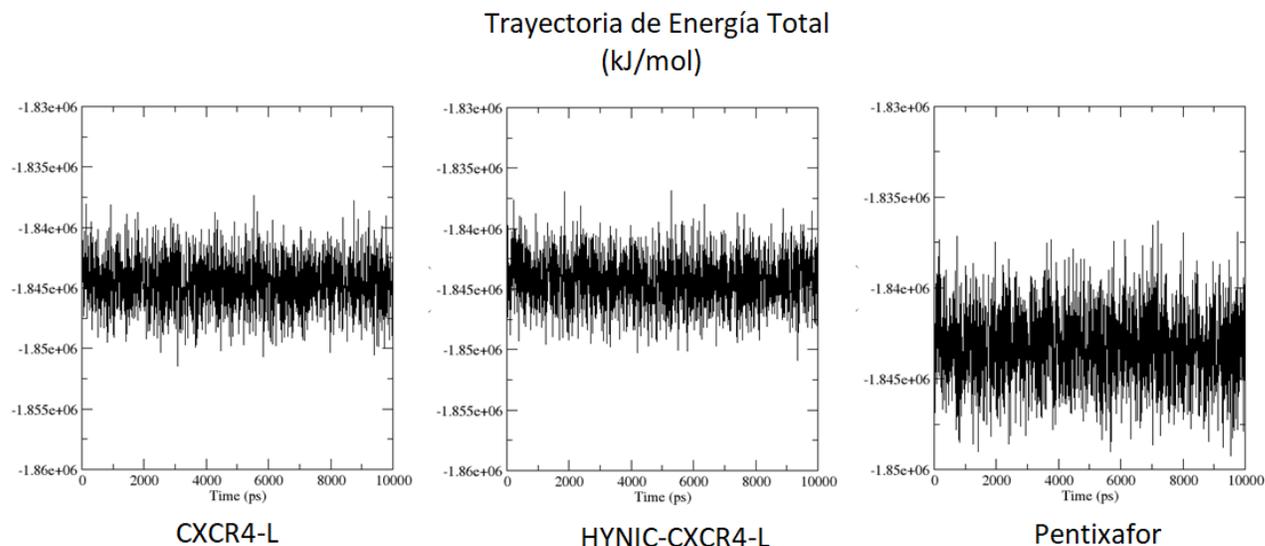


Figura 10 Energía potencial vs tiempo para cada ligando con el receptor CXCR4.

El seguimiento a la trayectoria de energía total del sistema (representada por la suma de la energía potencial y la energía cinética) para determinar la ausencia de cambios drásticos en el comportamiento energético para demostrar la estabilidad del sistema durante la dinámica molecular, se muestra figura 11 muestra el comportamiento de la trayectoria.



*Figura 11 Trayectoria de energía total en la dinámica molecular de CXCR4 con los ligandos CXCR4-L, HYNIC-CXCR4-L, Pentixafor*

A lo largo de la trayectoria, se muestra una estabilidad molecular para el aducto formado conformado por el receptor CXCR4 con los grupos CXCR4-L, HYNIC-CXCR4-L y Pentixafor. En los tres casos la energía total se cuantifica en un promedio de  $-1.84E+06$  kJ/mol comparando con la energía total reportada por Malgija, B., 2019 para CXCR4 con un antagonista para bloquear la entrada celular de VIH, el cual tiene una trayectoria de energía total entorno a un valor promedio de  $-2.91E+04$  kJ/mol (42), en contraste con el ligando CXCR4-L que tiene una mayor afinidad por el receptor con estabilidad favorable.

Un parámetro adicional que nos permite evaluar la estabilidad del complejo proteína-ligando y validar que no existe una disociación espontánea del mismo, es el radio de giro (Rg) de la molécula el cual nos indica la compacidad de la proteína y si durante la dinámica molecular el sistema está plegándose de manera estable o bien se rompe espontáneamente (43). Este parámetro Rg se presenta en la Figura 12.

### Radio de giro $R_g$ del receptor CXCR4

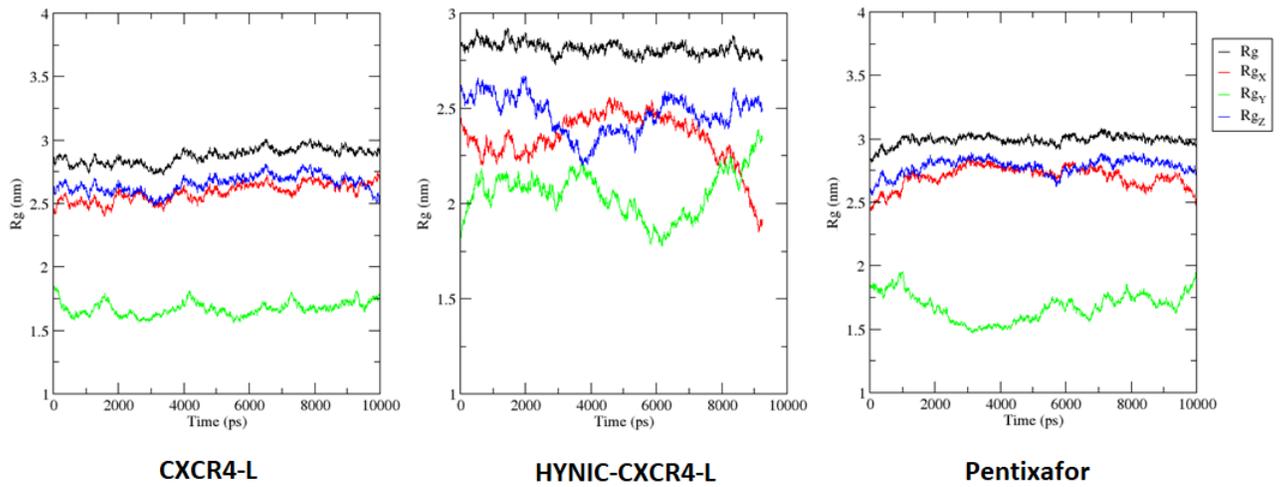


Figura 12 Radio de giro ( $R_g$ ) de CXCR4 durante la dinámica molecular con los ligandos CXCR4-L, HYNIC-CXCR4-L y Pentixafor. Las gráficas en color rojo, verde y azul representan el análisis en los ejes  $x$ ,  $y$ ,  $z$ , respectivamente. La gráfica en color negro indica el valor promedio de  $R_g$  por los tres planos, y denota un valor poco cambiante indicando que el complejo proteína-ligando se mantiene estable durante ejecución de la dinámica molecular.

### 5.3. Perfil biocinético y dosimétrico

Tabla 2. Datos de pesos de órganos de modelos murinos de 25 g (37).

Datos de Ratón y sus órganos	
Órgano	Peso (g)
Sangre	2.003
Pulmones	0.150
Hígado	1.050
Bazo	0.090
Riñones	0.265
Intestino Delgado	0.878
Tumor	0.024
Peso total de Ratón	25.000

Tabla 3. Factores de conversión de dosis total de  $^{99m}\text{Tc}$ , manejados por el software OLINDA para modelos tumorales murinos de 25g (44).

Factores de conversión de dosis total [mSv/MBq-s] Radionúclido: Tc-99m (6.01 h) para ratón de 25g						
Órgano	Sangre	Pulmones	Hígado	Bazo	Riñones	Intestino delgado
Sangre	1.19E-04	1.25E-04	1.28E-04	1.23E-04	1.28E-04	1.26E-04
Pulmones	1.44E-04	2.53E-02	1.23E-04	1.71E-05	1.69E-05	1.16E-05
Hígado	1.47E-04	1.26E-04	1.66E-03	3.34E-05	4.94E-05	3.65E-05
Bazo	1.41E-04	1.70E-05	3.42E-05	2.36E-02	1.16E-04	2.54E-05
Riñones	1.47E-04	1.65E-05	5.05E-05	1.23E-04	8.90E-03	5.90E-05
Intestino delgado	1.47E-04	1.13E-05	3.62E-05	2.43E-05	5.79E-05	1.67E-03

El factor de dosis (DF) para  $^{99m}\text{Tc}$  en un tumor de 1g de acuerdo con OLINDA es  $2.63\text{E}-03$  mSv/MBq-s.

La biodistribución del radiotrazador se realizó en tumores inducidos por dos cepas celulares en un total de 3 ratones. Se calculó el porcentaje de dosis por gramo de órgano (%ID/g) y se calcularon los porcentajes de dosis (%ID) para modelos murinos de 25 g empleando la tabla 2. La tabla 4 muestra los resultados para ratones con tumores inducidos por la cepa Du-4475. La tabla 5 muestra los resultados para ratones con tumores inducidos por la cepa C6.

Tabla 4. Porcentajes de dosis por gramo de órgano (%ID/g) y por órgano (%ID) para tumores inducidos con Du-4475.

Du-4475	Porcentaje de dosis							
	%ID/g				%ID			
	Tiempo (h)				Tiempo (h)			
<b>Órgano</b>	<b>0.33</b>	<b>1.00</b>	<b>3.00</b>	<b>24.00</b>	<b>0.33</b>	<b>1.00</b>	<b>3.00</b>	<b>24.00</b>
Sangre	1.84	0.84	0.18	0.00	3.6855	1.6825	0.3605	0.0000
Pulmones	2.60	1.40	0.22	0.04	0.3900	0.2100	0.0330	0.0060
Hígado	4.63	2.04	1.43	0.03	4.8615	2.1420	1.5015	0.0315
Bazo	2.48	1.14	0.61	0.08	0.2232	0.1026	0.0549	0.0072
Riñones	8.56	5.32	3.76	0.42	2.2684	1.4098	0.9964	0.1113
Intestino Delgado	2.46	2.76	2.24	0.11	2.1599	2.4233	1.9667	0.0966
Tumor	4.80	3.17	2.89	4.80	3.17	2.89	4.80	3.17
<b>* Sangre se considera como Remanente</b>								

Tabla 5. Porcentajes de dosis por gramo de órgano (%ID/g) y por órgano (%ID) para tumores inducidos con C6.

C6	Porcentaje de dosis							
	%ID/g				%ID			
	Tiempo (h)				Tiempo (h)			
<b>Órgano</b>	<b>0.33</b>	<b>1.00</b>	<b>3.00</b>	<b>24.00</b>	<b>0.33</b>	<b>1.00</b>	<b>3.00</b>	<b>24.00</b>
Sangre	1.98	0.95	0.22	0.00	3.9659	1.9029	0.4407	0.0000
Pulmones	2.23	1.57	0.17	0.07	0.3345	0.2355	0.0255	0.0105
Hígado	4.42	2.25	1.62	0.10	4.6410	2.3625	1.7010	0.1050
Bazo	1.98	1.29	0.56	0.02	0.1782	0.1161	0.0504	0.0018
Riñones	7.24	4.84	4.06	0.24	1.9186	1.2826	1.0759	0.0636
Intestino Delgado	2.21	2.37	1.98	0.13	1.9404	2.0809	1.7384	0.1141
Tumor	4.03	2.93	2.52	1.44	4.03	2.93	2.52	1.44

Se ajustaron los perfiles biocinéticos por órgano siguiendo una cinética de primer orden mediante el programa OLINDA/EXM resolviendo de manera iterativa la suma de 3 componentes exponenciales:

$$A(t) = Ae^{-(a+\lambda_{99mTc})t} + Be^{-(b+\lambda_{99mTc})t} + Ce^{-(c+\lambda_{99mTc})t}$$

Se calculó la integral definida para determinar el número de desintegraciones totales en cada órgano y poder calcular las dosis equivalentes y efectiva.

$$N = A_0 \int_0^{\infty} e^{-\lambda t} dt = \frac{A}{a + \lambda_{99mTc}} + \frac{B}{b + \lambda_{99mTc}} + \frac{C}{c + \lambda_{99mTc}}$$

Tabla 6. Perfil biocinético por órgano de tumores inducidos con Du-4475, Obtenidos con OLINDA.

Valores de coeficientes biocinéticos Tumor Du-4475						
Órgano	A	a	B	b	C	c
Sangre	16.5000	66.9000	5.0200	1.4200	0.5940	0.2390
Pulmones	13.5000	74.0000	0.3040	10.1000	0.5090	0.8900
Hígado	11.4000	4.4600	2.1300	0.1530	0.2210	0.1530
Bazo	13.5000	67.3000	0.9010	6.7300	0.1390	0.3080
Riñones	41.6000	16.9000	1.6400	2.1800	1.3600	0.1040
Intestino delgado	16.7000	67.3000	0.7960	0.0967	1.6800	0.0967
Tumor	6.6200	4.2800	2.1000	0.0382	1.1200	0.0407

Tabla 7. Perfil biocinético por órgano de tumores inducidos con C6, Obtenidos con OLINDA.

Valores de coeficientes biocinéticos Tumor C6						
Órgano	A	a	B	b	C	c
Sangre	16.5000	66.9000	5.0200	1.4200	0.5940	0.2390
Pulmones	13.5000	74.0000	0.3040	10.1000	0.5090	0.8900
Hígado	98.0000	14.6000	4.4100	3.4200	2.5300	0.1330
Bazo	13.5000	67.3000	0.9010	6.7300	0.1390	0.3080
Riñones	41.6000	16.9000	1.6400	2.1800	1.3600	0.1040
Intestino delgado	16.7000	67.3000	0.7960	0.0967	1.6800	0.0967
Tumor	2.9000	2.4500	2.0100	0.0184	0.7550	0.0678

A través de OLINDA, se obtuvo la gráfica del perfil biocinético para cada órgano como se muestra un ejemplo en la figura 13, para el caso de los valores correspondientes a hígado.

## Perfil Biocinético del Hígado

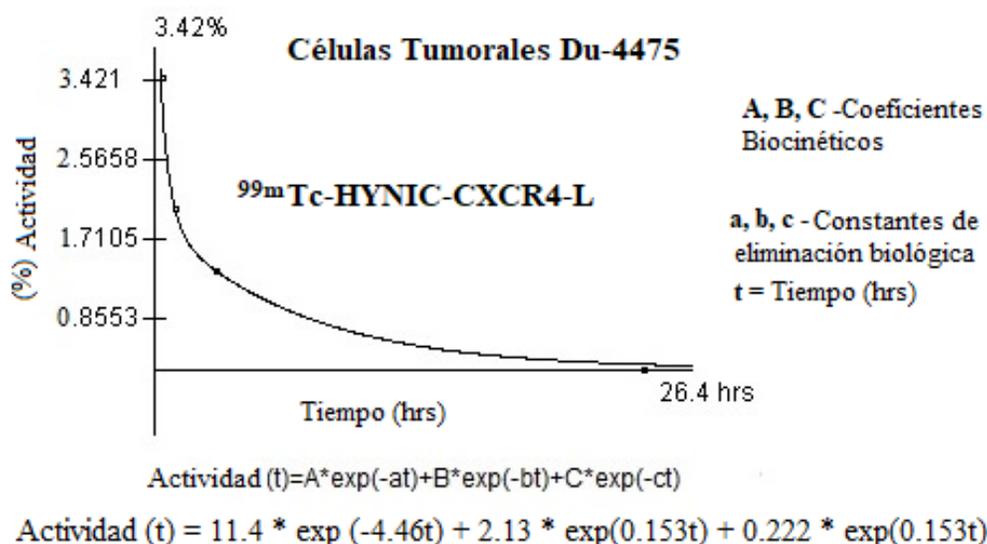


Figura 13 Gráfica del perfil biocinético en hígado para el modelo tumoral murino de células DU-4475. Los coeficientes A, B, C representan coeficientes biocinéticos y las constantes de eliminación biológica se representan por letras minúsculas a, b, c, respectivamente.

Tabla 8. Número de desintegraciones totales por órgano para tumores inducidos con Du-4475 y C6.

Órgano	N (MBq-s/MBq)	
	Du-4475	C6
Sangre	186.84	810.72
Pulmones	25.92	26.28
Hígado	405	651.60
Bazo	23.76	19.44
Riñones	336.96	540.36
Intestino delgado	429.48	369.00
Tumor	805.32	730.44

Para calcular el perfil dosimétrico se calcularon las dosis equivalentes por órgano en función de los valores S para modelos murinos de 25g tomados de la tabla 3. La dosis equivalente en el tumor inducido se calculó de acuerdo con el modelo esférico para tumores de 0.2g en el programa OLINDA. En la tabla 9 se enlistan los datos

correspondientes a la dosis equivalente por órgano y tumor para el radiotrazador  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-CXCR4-L en los modelos tumorales inducidos con células Du-4475 y C6. La figura 14 muestra gráficamente el comportamiento de las dosis por órgano, es posible apreciar que en cada caso el tumor recibe una mayor dosis de radiación en comparación con los órganos extraídos.

Tabla 9. Cálculo de dosis equivalente por órgano.

Órgano	Dosis equivalente (mSv/MBq)	
	Du-4475	C6
Sangre	0.14	0.61
Pulmones	0.66	0.67
Hígado	0.67	1.08
Bazo	0.57	0.47
Riñones	2.12	1.92
Intestino delgado	0.84	0.72
Tumor	3.13	5.02

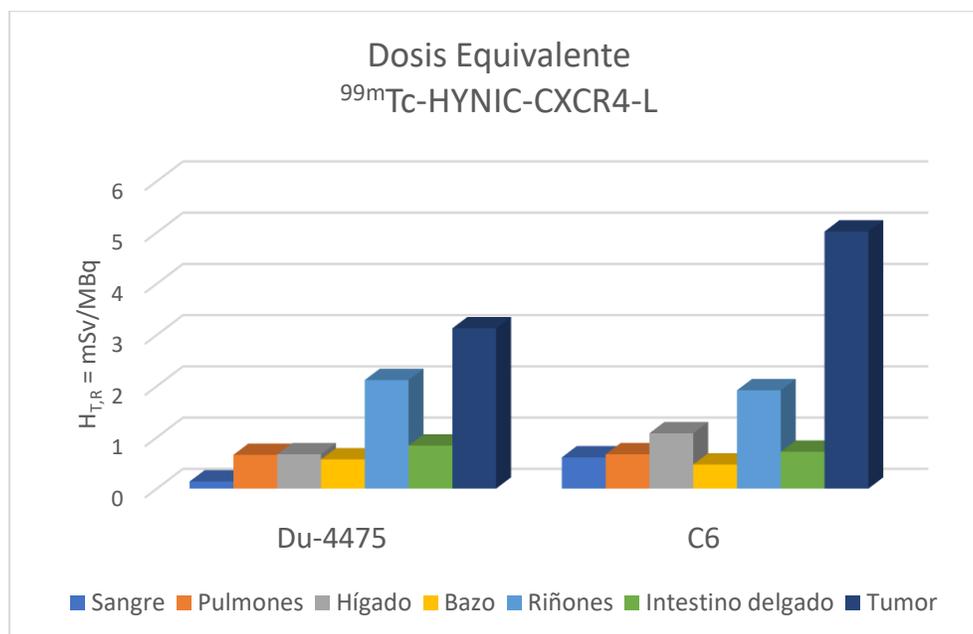


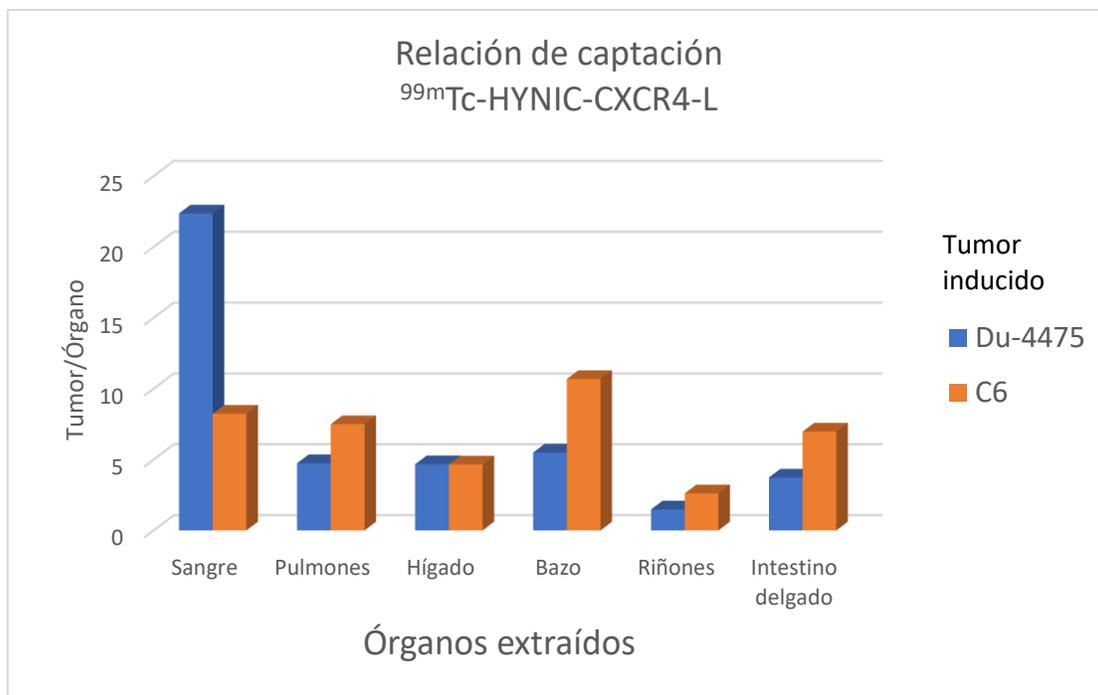
Figura 14 Cálculo de dosis equivalente para cada órgano en los modelos de tumor inducido con células Du-4475 y C6, respectivamente. La tendencia pone de manifiesto que cada tumor inducido recibe la mayor dosis de radiación, esto es consistente con un comportamiento localizado y específico para la obtención de imágenes moleculares nucleares.

Se determinó la relación de captación tumor-órgano para cada tipo de tumor inducido, lo resultados se presentan en la tabla 10.

*Tabla 10. Relación de captación tumor-órgano en modelos murinos de 25g para tumores inducidos con células Du-4475 y C6.*

<b>Relación tumor/órgano</b>		
<b>Órgano</b>	<b>Du-4475</b>	<b>C6</b>
<b>Sangre</b>	22.36	8.23
<b>Pulmones</b>	4.74	7.49
<b>Hígado</b>	4.67	4.65
<b>Bazo</b>	5.49	10.68
<b>Riñones</b>	1.48	2.61
<b>Intestino delgado</b>	3.73	6.97

En la tabla 10, se refleja la relación tumor/órgano mayor a 1, esto indica que el radiotrazador HYNIC-CXCR4-L marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  tiene mayor captación en el tumor respecto a los demás órganos y confirma que puede utilizarse como agente indicador para imagen nuclear molecular por SPECT. Gráficamente este comportamiento se muestra en la figura 15.



*Figura 15. Gráfica de la relación de captación tumor/órgano para el radiotrazador <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-CXCR4-L en modelos tumorales murinos para tumores inducidos con células D4-4475 y C6, respectivamente. El radiotrazador muestra una mayor captación en el tumor respecto a los demás órganos y confirma que puede utilizarse como agente indicador para imagen nuclear molecular por SPECT.*

## Capítulo 6: Discusión

El acoplamiento molecular demostró que HYNIC-CXCR4-L interactúa en la cavidad de unión del ligando CXCR4 con una afinidad adecuada. Existen interacciones considerables que ocurren en el sitio de acción del receptor con el agente bifuncional HYNIC, una de ellas con el residuo no polar y neutral Trp94 (Van der Waals), y la otra con Asp188 a través de un enlace de hidrógeno convencional. La interacción con Trp94 sugiere que HYNIC podría actuar como un sitio de anclaje adicional a las regiones hidrofóbicas de la molécula CXCR4, lo que posiblemente explicaría la mayor afinidad teórica observada por HYNIC-CXCR4-L en comparación con otros ligandos de quimiocina hasta ahora reportados, como CVX15 y CXCR4-L [9 y 10]. El valor de  $K_i$  encontrado para el ligando CVX15 (Tabla 1) es bastante similar al informado por Wu et al. [9], lo que significa una validación indirecta de los cálculos. También es posible que la interacción con Asp188 esté relacionada con la carga de resonancia positiva neta generada por el anillo aromático heterocíclico HYNIC [9]. En este punto, es importante recordar que los grupos químicos cargados y los anillos aromáticos en las cadenas laterales del ligando tienen una participación importante en la unión de los receptores peptidérgicos acoplados a la proteína G [14].

La energía potencial de HYNIC-CXCR4-L cuyo valor fue de  $-2.68E+06$  kJ/mol mostrando una unión de mayor estabilidad en comparación con las energías potenciales de CXCR4-L y Pentixafor los cuales fueron de  $-2.57E+06$  kJ/mol y  $-2.59E+06$ , respectivamente.

Como se esperaba respecto al análisis de acoplamiento molecular no es perceptible la diferencia de un orden de magnitud en la afinidad del ligando HYNIC-CXCR4-L en comparación con el ligando CXCR4 hacia el receptor CXCR4, esto se debe a que, en el análisis de acoplamiento molecular, las entalpías de formación no son consideradas para fines de optimizar los tiempos de cálculo. Sin embargo, el comportamiento energético es coherente con que el agente bifuncional HYNIC aporta un sitio más de anclaje, mejorando su afinidad por el receptor CXCR4.

A lo largo de la trayectoria energética, se muestra una estabilidad molecular para el aducto formado por el receptor CXCR4 con los grupos CXCR4-L, HYNIC-CXCR4-L con un valor energético de  $-1.84E+06$  kJ/mol, la diferencia manifestada entre la energía potencial en la minimización y la energía total, radica principalmente en que se ve involucrada la energía cinética debido a la simulación dinámica molecular. A pesar de que el valor de la energía total es menor comparado con la energía potencial, el orden de magnitud se mantiene refinando el cálculo energético. Recordemos que los valores de energía negativos representan valores de la energía libre de Gibbs que indica que es posible la reacción espontánea entre el receptor y el ligando.

El comportamiento del radio de giro ( $R_g$ ) nos indica que la dinámica molecular se ejecuta de manera correcta en cada paso y que los resultados pueden validarse.

La internalización fue menor en las células DU-4475 y C6 para  $^{177}\text{Lu}$  CXCR4-L, en comparación con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CXCR4-L, posiblemente debido al efecto químico de DOTA en la estructura, como propusieron Wüstemann et al. [17]. No obstante, la internalización fue significativamente mayor en las células de glioblastoma C6 en comparación con las células de cáncer de mama DU-4475, lo que quizás esté asociado a la formación de heterómeros CXCR4 con otros receptores de quimiocinas e incluso con otros receptores acoplados a proteínas G, que pueden modular su afinidad e internalización [18]. En las células de cáncer de mama, se ha confirmado la co-normalización del heterómero CXCR4-CXCR7 [19]. En las células C6, se ha encontrado que la presencia de algunos metales de transición como el cobre, el níquel y el zinc modifican la absorción de CXCL2 en 9, 7 y 3 veces, respectivamente [4]. Las diferencias en la captación e internalización del complejo CXCR4-ligando pueden deberse a la formación de heterómeros que provocan una dilución del sitio de reconocimiento y, al mismo tiempo, modifican la tasa de re-sensibilización. Cabe mencionar que, en general, las células de cáncer de mama expresan un mayor número de subtipos de receptores de quimiocinas (CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR7, CCR2, CCR4, CCR5, CCR7 y CCR9), en comparación con las detectadas en gliomas (CXCR4, CCR3 y CCR5) (18).

Desde la parte de análisis teórico computacional que se desarrolló en el presente trabajo, hasta el perfil dosimétrico obtenido, es importante resaltar que los resultados y tendencias observadas en el progreso del análisis han sido consistentes con respecto a predecir una unión estable entre el ligando HYNIC-CXCR4-L y el receptor de quimiocina-4, cuya puntuación de afinidad en el análisis de acoplamiento molecular fue de -10.8 kcal/mol y si  $K_i = 12$  nM, sugiriendo así una formación estable del complejo proteína ligando, más tarde con la ejecución de la dinámica molecular se evalúa la estabilidad del complejo a través del tiempo de duración de la simulación (10 ns) dónde la energía total del sistema (-1.84E+06 kJ/mol) refuta la premisa de que el ligando se mantiene en la cavidad del sitio de acción del receptor. Con respecto a la parte experimental se comprueba que el radiotrazador  $^{99m}\text{Tc}$ -CXCR4-L se mantiene localizado en el tumor que expresa al receptor de quimiocina-4, al evaluar el perfil biocinético y dosimétrico se corrobora que el radiotrazador se queda unido al receptor CXCR4 manteniendo una relación señal ruido adecuada permitiendo la obtención de imágenes nucleares moleculares por técnica de SPECT.

## Capítulo 7: Conclusiones

- El ligando CXCR4-L mantiene un comportamiento de afinidad equivalente a la molécula CVX15 y al análogo comercial Petixafor.
- El agente bifuncional HYNIC actúa como un sitio adicional de anclaje en el sitio activo del receptor CXCR4 permitiendo una unión favorable entre el ligante y el receptor.
- La relación de captación tumor órgano fue favorable (mayor a uno) indicando que el HYNIC-CXCR4-L tiende a retenerse en el tejido tumoral diferenciándose de la señal de fondo, lo que permite su uso como radiotrazador en imagen molecular por SPECT
- La bioinformática es una herramienta fiable para implementarse en la búsqueda de biomarcadores que permitan realizar diagnóstico y terapia molecular dirigida dentro del campo de acción de la Física Médica.

## Capítulo 8: Trabajo a Futuro

Como trabajo a futuro se prospecta continuar con la línea de investigación sobre la aplicación de HYNIC-CXCR4-L y su optimización en la obtención de imágenes nucleares moleculares SPECT para su aplicación clínica.

## Capítulo 7: Referencias

1. Döring Y, Pawig L, Weber C, Noels H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol.* 2014;5 JUN(June):1–23.
2. Lapa C, Schreder M, Schirbel A, Samnick S, Kortüm KM, Herrmann K, et al. [68Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [18F]FDG and laboratory values. *Theranostics.* 2017;7(1):205–12.
3. Ávila-Sánchez M, Ferro-Flores G, Jiménez-Mancilla N, Ocampo-García B, Bravo-Villegas G, Luna-Gutiérrez M, et al. Synthesis and preclinical evaluation of the 99mTc-/177Lu-CXCR4-L theranostic pair for in vivo chemokine-4 receptor-specific targeting. *J Radioanal Nucl Chem [Internet].* 2020;324(1):21–32. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10967-020-07043-6>
4. Ferro-Flores G, Ocampo-García B, Gutiérrez ML, Cuevas CS, Jiménez-Mancilla N, Azorín-Vega E, et al. Radiolabeled protein-inhibitor peptides with rapid clinical translation towards imaging and therapy. *Curr Med Chem [Internet].* 2019 Dec 23 [cited 2020 Jan 21];27. Available from: <http://www.eurekaselect.com/177703/article>
5. Fani M, Maecke HR. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. Vol. 39, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2012.
6. Lamberts SWJ, Barker WH, Reubi JC, Krenning EP. Somatostatin-receptor imaging in the localization of endocrine tumors. *N Engl J Med.* 1990 Nov 1;323(18):1246–9.
7. Krenning EP, Breeman WAP, Kooij PPM, Lameris JS, Bakker WH, Koper JW, et al. LOCALISATION OF ENDOCRINE-RELATED TUMOURS WITH RADIOIODINATED ANALOGUE OF SOMATOSTATIN. *Lancet.* 1989 Feb 4;333(8632):242–4.
8. Giordano C, Marchiò M, Timofeeva E, Biagini G. Neuroactive peptides as putative mediators of antiepileptic ketogenic diets. *Front Neurol [Internet].* 2014 [cited 2019 Jun 3];5:63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24808888>
9. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today [Internet].* 2015 Jan 1 [cited 2019 Jun 2];20(1):122–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644614003997>
10. Padhi A, Sengupta M, Sengupta S, Roehm KH, Sonawane A. Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects. *Tuberculosis [Internet].* 2014;94(4):363–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2014.03.011>
11. Rose GD, Gierasch LM, Smith JA. Turns in Peptides and Proteins. Vol. 37, *Advances in Protein Chemistry.* 1985. 1–109 p.
12. Pinilla G, Muñoz LC, Salazar LM, Navarrete J, Guevara A. Design of peptides based on similar sequence of negative repressor icar of staphylococcus sp . *Rev Colomb Quim [Internet].* 2015;44(2):5–9. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

84961246461&doi=10.15446%2Frev.colomb.quim.v44n2.55213&partnerID=40&md5=773adf8672eac1c4b031e3a217f0797d

13. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharm Res.* 2010;27(4):544–75.
14. Hamley IW. Peptide fibrillization. *Angew Chemie - Int Ed.* 2007;46(43):8128–47.
15. Armañanzas R, Inza I, Santana R, Saeys Y, Flores JL, Lozano JA, et al. A review of estimation of distribution algorithms in bioinformatics. *BioData Min.* 2008;1(1):1–12.
16. Papadakis VG. Estimation of Estimation of. 2005;899–928.
17. Kahl G. Molecular docking. *Dict Genomics, Transcr Proteomics.* 2015;443:1–1.
18. Hu L, Benson ML, Smith RD, Lerner MG, Carlson HA. *Proteins.* [Internet]. John Wiley & Sons; 2005 [cited 2019 Jun 3]. Available from: <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/48691>
19. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2019 Jun 3];28(1):235–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592235>
20. Hendlich M. Databases for protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 1998;54(6 I):1178–82.
21. Vyas VK, Ukawala RD, Ghate M, Chintha C. Homology modeling a fast tool for drug discovery: Current perspectives. Vol. 74, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012. p. 1–17.
22. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. Vol. 9, *Biophysical Reviews.* Springer Verlag; 2017. p. 91–102.
23. Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys Rev.* 2014;6(1):75–87.
24. Huang SY, Grinter SZ, Zou X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. *Phys Chem Chem Phys.* 2010 Oct 28;12(40):12899–908.
25. Antes I. DynaDock: A now molecular dynamics-based algorithm for protein-peptide docking including receptor flexibility. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2010;78(5):1084–104.
26. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc* [Internet]. 2016 May [cited 2019 Jun 2];11(5):905–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27077332>
27. Ewing TJA, Kuntz ID. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening [Internet]. Vol. 18, *Journal of Computational Chemistry.* John Wiley & Sons, Ltd; 1997 [cited 2019 Jun 3]. p. 1175–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291096-987X%2819970715%2918%3A9%3C1175%3A%3AAID-JCC6%3E3.O.CO%3B2-O>
28. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking

- with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2010 Jan 30 [cited 2019 Jun 2];31(2):455–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499576>
29. Alafort LM. Radiomarcado de péptidos para diagnóstico y terapia. 2002;22–6.
  30. Fischman AJ, Babich JW, Strauss HW. A ticket to ride: peptide radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* [Internet]. 1993 Dec [cited 2019 Jun 3];34(12):2253–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254420>
  31. Lapa C, Lückerath K, Kleinlein I, Monoranu CM, Linsenmann T, Kessler AF, et al. 68Ga-pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor 4 expression in glioblastoma. *Theranostics*. 2016;6(3):428–34.
  32. Gourni E, Demmer O, Schottelius M, D'Alessandria C, Schulz S, Dijkgraaf I, et al. PET of CXCR4 expression by a 68Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *J Nucl Med*. 2011 Nov 1;52(11):1803–10.
  33. Herrmann K, Lapa C, Wester HJ, Schottelius M, Schiepers C, Eberlein U, et al. Biodistribution and radiation dosimetry for the chemokine receptor CXCR4-targeting probe 68Ga-pentixafor. *J Nucl Med*. 2015 Mar 1;56(3):410–6.
  34. Hartimath S V., Van Waarde A, Dierckx RAJO, De Vries EFJ. Evaluation of N-[11C]methyl-AMD3465 as a PET tracer for imaging of CXCR4 receptor expression in a C6 glioma tumor model. *Mol Pharm*. 2014;11(11):3810–7.
  35. Tamamura H, Omagari A, Oishi S, Kanamoto T, Yamamoto N, Peiper SC, et al. Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2000 Dec 4;10(23):2633–7.
  36. Fujii N, Oishi S, Hiramatsu K, Araki T, Ueda S, Tamamura H, et al. Molecular-size reduction of a potent CXCR4-chemokine antagonist using orthogonal combination of conformation- and sequence-based libraries. *Angew Chemie - Int Ed* [Internet]. 2003 Jul 21 [cited 2020 Jan 20];42(28):3251–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200351024>
  37. Demmer O, Gourni E, Schumacher U, Kessler H, Wester HJ. PET Imaging of CXCR4 Receptors in Cancer by a New Optimized Ligand. *ChemMedChem*. 2011 Oct 4;6(10):1789–91.
  38. Thoma G, Streiff MB, Kovarik J, Glickman F, Wagner T, Beerli C, et al. Orally bioavailable isothioureas block function of the chemokine receptor CXCR4 in vitro and in vivo. *J Med Chem*. 2008 Dec 25;51(24):7915–20.
  39. Wu B, Chien EYT, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Vol. 330, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2010. p. 1066–71.
  40. Huang X, Shen J, Cui M, Shen L, Luo X, Ling K, et al. Molecular dynamics simulations on SDF-1 $\alpha$ : Binding with CXCR4 receptor. *Biophys J*. 2003 Jan 1;84(1):171–84.
  41. Pérez A, Santamaria EK, Operario D, Tarkang EE, Zotor FB, Cardoso SR de SN, et

al. Title. BMC Public Health [Internet]. 2017;5(1):1–8. Available from:  
<https://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/siklus/article/view/298>  
<http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jana.2015.10.005>  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/12/58>  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&P>

42. Malgija B, C JP, Sandhaanam SD, David HA. In Silico Exploration of HIV Entry Co-receptor Antagonists : A combination of Molecular Modeling , Docking and Molecular Dynamics Simulations Acta Scientific Pharmaceutical Sciences ( ISSN : 2581-5423 ) In Silico Exploration of HIV Entry Co-receptor Antag. 2019;(February).
43. Lobanov MY, Bogatyreva NS, Galzitskaya O V. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. Mol Biol. 2008;42(4):623–8.
44. Miller WH, Hartmann-Siantar C, Fisher D, Descalle MA, Daly T, Lehmann J, et al. Evaluation of beta-absorbed fractions in a mouse model for  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , and  $^{177}\text{Lu}$  radionuclides. Cancer Biother Radiopharm [Internet]. 2005 [cited 2020 Jun 26];20(4):436–49. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16114992/>