



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

EL MODELADO MOLECULAR COMO HERRAMIENTA PARA
EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS QUE
INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS

Autor: Luis Checa Ruano

Tutor: Giorgio Giorgi

Convocatoria: Junio

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| 1 Descubrimiento de nuevos fármacos | 4 |
| 2 ROCK | 5 |
| 3 Monoamino oxidasas | 7 |
| 4 Radicales libres y estrés oxidativo | 9 |
| 5 Fármacos multidiana y enfermedades neurodegenerativas | 10 |
| Objetivos: | 12 |
| Material y métodos | 12 |
| 1 Para la realización del docking: | 12 |
| Resultados | 14 |
| 1 Diseño de fármacos asistido por ordenador | 14 |
| 2 Resultados del docking | 17 |
| Conclusiones | 20 |
| Bibliografía | 21 |

Resumen

Existen dos enfoques para predecir la actividad biológica de una colección de compuestos *in silico*: en uno, conocido como diseño basado en la estructura, las moléculas candidatas son enfrentadas a una diana proteica de estructura conocida gracias a la técnica del *docking*; en el otro, conocido como diseño basado en ligando, no se dispone de la estructura de la proteína, pero se busca un compuesto basándose en su similitud con ligandos conocidos o con modelos de fármaco. Ambos permiten cribar de forma virtual grandes colecciones de compuestos.

En el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson, el uso de fármacos multidiana es una estrategia prometedora porque permite modular diferentes dianas terapéuticas implicadas en la patología. Entre ellas se encuentran: la kinasa ROCK, la MAO y las especies reactivas de oxígeno. Mediante la técnica del *docking* se han ensayado una serie de fármacos multidiana. Los siguientes han mostrado mejor capacidad de unión a sus respectivas dianas: fasudil 6-cafeico como inhibidor de ROCK con actividad antioxidante, y fasudil-propargilo como inhibidor de ROCK y de MAO. Por lo que, de confirmarse su actividad *in vitro*, fasudil 6-cafeico y fasudil-propargilo serían dos buenos *hits*.

Introducción

En la presente introducción se expondrá brevemente el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos, a continuación, se hablará de tres dianas terapéuticas de interés para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas para, finalmente, proponer una serie de fármacos multidiana en el tratamiento de estas enfermedades.

1 DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS(1)

El desarrollo de un nuevo principio activo es un proceso largo y costoso. El principal objetivo a alcanzar es descubrir una molécula con la actividad biológica deseada. Aunque hay muchas vías que permiten alcanzar este punto, hoy en día, existe un procedimiento básico.

En primer lugar, se identifica la necesidad terapéutica que se quiere cubrir, para así poder identificar la diana apropiada. Después, se establece el procedimiento por el cual se van a ensayar los posibles candidatos a nuevos fármacos. Actualmente, gracias al desarrollo de técnicas *in vitro*, como el cribado de alto rendimiento, se pueden ensayar grandes colecciones de compuestos. Las colecciones se generan gracias a la química combinatoria, que permite la síntesis de forma rápida y automatizada de gran cantidad de compuestos.

El cribado de alto rendimiento permite automatizar el proceso de ensayo de la actividad biológica de una molécula frente a la diana de interés. Los compuestos que presentan actividad en este cribado son los llamados *hits*. A partir de estos, se sintetizan análogos para maximizar su actividad y selectividad. Uno de ellos, el más adecuado, sirve como cabeza de serie o *lead*. La síntesis de análogos también permite establecer la relación estructura-actividad (SAR).

Una vez identificado el cabeza de serie, se optimiza su perfil de toxicidad y sus propiedades farmacocinéticas. Llegado este punto, si el principio activo cumple los requerimientos necesarios, se puede continuar hasta llegar al desarrollo clínico.

1.1 DISEÑO DE FÁRMACOS ASISTIDO POR ORDENADOR

Los métodos computacionales son especialmente útiles en la fase de identificación de los *hits*. Por ejemplo, cualquier diana biológica de estructura conocida, o que simplemente tenga ligandos conocidos, puede ser evaluada computacionalmente para identificar *hits*, ya sea utilizando el diseño *de novo*, en el que las nuevas moléculas se diseñan de cero; o haciendo un cribado virtual de una biblioteca de compuestos.(2)

Una herramienta indispensable en la búsqueda *in silico* de nuevos fármacos es el modelado molecular. Se utiliza para representar la estructura tridimensional de las moléculas. De esta forma, es posible: elaborar un modelo tridimensional de la unión de un fármaco a su diana biológica, visualizar las interacciones fármaco-receptor, establecer una relación estructura-actividad, y desarrollar así, de forma racional, nuevos medicamentos con actividad optimizada.(3)

2 ROCK(4)

La proteína ROCK o también conocida como Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase es un importante punto de confluencia de las vías de señalización celular responsables de regular el citoesqueleto y la contractilidad de la miosina. Interviene en el crecimiento axonal y la estabilidad de las sinapsis.

Existen dos isoformas de esta enzima: ROCK-I y ROCK-II. La ROCK-II se expresa mayoritariamente en sistema nervioso central, y la ROCK-I en tejidos no neuronales como en corazón o pulmón.

2.1 ESTRUCTURA

La proteína ROCK es una enzima dimerica con actividad serina/treonina kinasa. Cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde la molécula de ATP hasta el hidroxilo de un residuo de serina o treonina de una proteína sustrato. Por ello, tiene un sitio de unión al sustrato y otro al ATP. En la proteína sustrato, la adición de un grupo fosfato provoca la desaparición o formación de interacciones; induciendo así, un cambio conformacional que puede exponer o cerrar, según la proteína, el centro activo (Fig. 2). (5)

El centro catalítico de la ROCK se encuentra en el extremo amino terminal y está seguido por el dominio de unión a la proteína RhoGTPasa. Por otro lado, el dominio carboxi terminal es capaz de doblarse sobre el centro activo, formando una estructura autoinhibitoria que mantiene a la enzima en un estado inactivo. (Fig. 3)

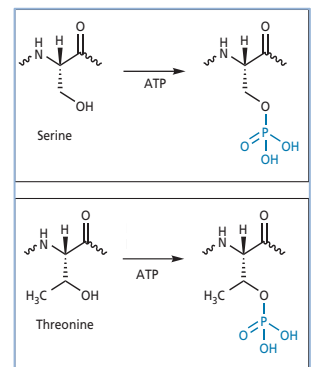


Fig. 1 Fosforilación de los residuos de serina y treonina de las proteínas sustrato

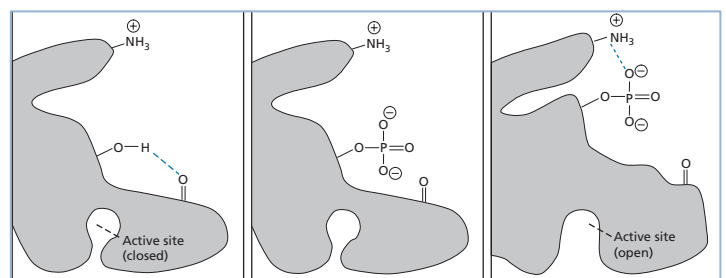
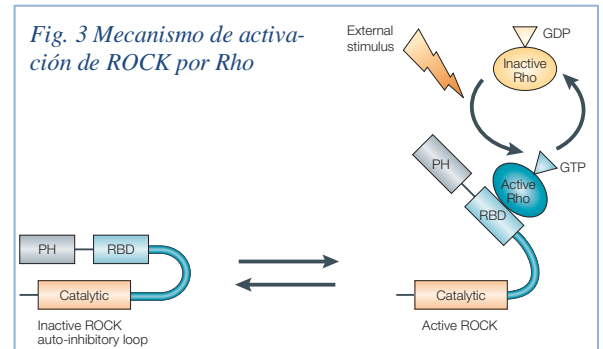


Fig. 2 Cambio conformacional en una proteína inducido por fosforilación

2.2 ACTIVACIÓN DE ROCK

ROCK es un efector de la RhoGTPasa, una subfamilia dentro del grupo de las GTPasas RAS. Estas GTPasas intervienen en múltiples vías de señalización, pasando de un estado inactivo (unido a GDP) a uno activo (unido a GTP). Cuando están activas, las RhoGTPasas activan múltiples efectores, entre ellos la ROCK.



ROCK también puede activarse independientemente de RhoGTPasa; gracias a segundos mensajeros, como el ácido araquidónico, o durante la apoptosis, cuando la caspasa 3 escinde el extremo C-terminal autoinhibitorio dando lugar a una ROCK constitutivamente activada.

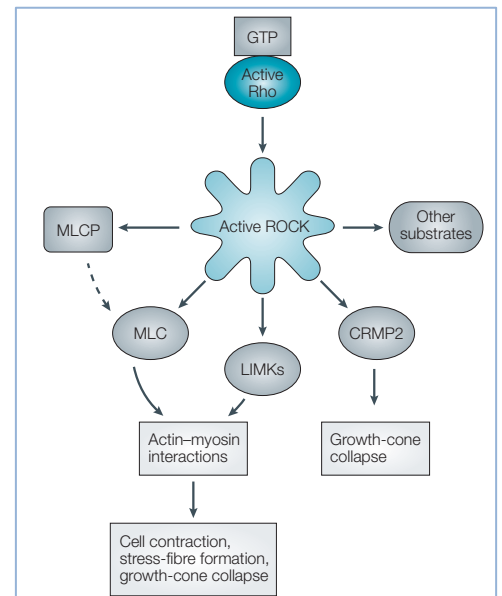
2.3 FUNCIÓN (6)

ROCK activada regula la función de las cadenas ligeras de miosina (MLC) por:

- Fosforilación directa de MLC permitiendo la contracción.
- Fosforilación e inhibición de la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCP).
- Fosforilación de la quinasa LIM (LIMK).

De esta forma, la ROCK, al regular la contractilidad de la actina y de la miosina, es determinante en la contracción muscular y en la organización del citoesqueleto. El efecto global de su actividad es:

- En tejido muscular, aumenta la contracción.
- En tejido tumoral, aumenta la invasividad.
- En tejido nervioso, provoca el colapso del crecimiento axonal, influyendo negativamnete en la neuroregeneración y en la supervivencia neuronal.



Además, gracias a la supresión de la expresión de ROCK o a la inhibición de su actividad mediante pequeñas moléculas en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, se vió una mejoría en el fenotipo de la enfermedad. Por ello, la ROCK es una diana para el tratamiento de estas enfermedades.(4)

2.4 INHIBIDOR DE ROCK: FASUDIL

Fasudil es el único inhibidor de ROCK aprobado para uso clínico. Desde 1995, se usa en Japón como vasodilatador en el tratamiento del vasoespasm cerebral después de una hemorragia.(4)

Fasudil es un inhibidor competitivo del sitio de unión a ATP de ROCK. Su principal metabolito hidroxifasudil tiene mayor capacidad inhibitoria frente a ROCK.

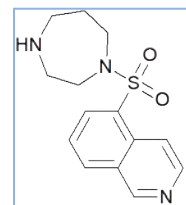


Fig. 5 Fasudil

Fasudil se une al sitio activo de la ROCK de la siguiente forma:(7)

- El fragmento de isoquinolina ocupa el mismo lugar que el de la adenina del ATP.
- La sulfamida y el anillo de homopiperazina se alojan en la región donde se une la ribosa. La sulfamida interacciona con el Asp²¹⁶ vía una molécula de agua.
- El nitrógeno de la isoquinolina actúa como aceptor en el enlace de hidrógeno con el nitrógeno de la amida de la Met¹⁵⁶, mientras que el Carbono 1 de la isoquinolina actúa como donador en el enlace de hidrógeno con el carbonilo de la amida del Glu¹⁵⁴. Este último enlace de hidrógeno entre el CH de un anillo aromático heterocíclico y un oxígeno no es común, pero hay estudios que avalan su existencia (8).
- La amina secundaria del anillo de homopiperazina actúa como aceptor en el enlace de hidrógeno formado con el Asp¹⁶⁰.

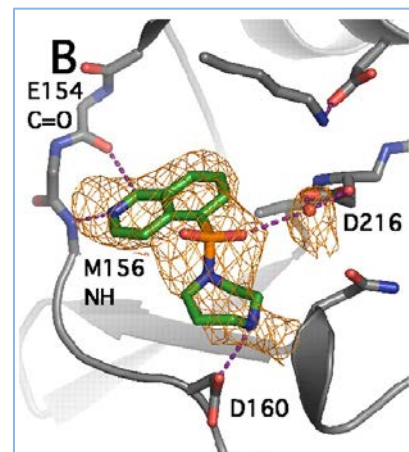


Fig. 6 Fasudil unido al sitio de unión a ATP de ROCK, estructura obtenida por difracción de rayos X. Código PDB: 2ESM

3 MONOAMINO OXIDASAS(3)

Las monoamino oxidasas (MAO), son flavoenzimas que catalizan reacciones de desaminación oxidativa de neurotransmisores (noradrenalina, dopamina y serotonina) y también de aminas primarias exógenas. Su cofactor, flavina adenina-dinucleótido (FAD), interviene en un proceso de transferencia de un solo electrón. Existen dos isoformas:

- MAO A: degrada noradrenalina y serotonina, sus inhibidores son antidepresivos
- MAO B: degrada dopamina, sus inhibidores son antiparkinsonianos.

3.1 MECANISMO DE LA DESAMINACIÓN OXIDATIVA CATALIZADA POR MAO

La desaminación oxidativa se lleva a cabo de la siguiente forma:

1. La amina sustrato cede un electrón al sistema de flavina.
2. La enzima desprotona la amina oxidada.

3. Los radicales derivados de la flavina y la amina reaccionan entre sí para dar una α,α -diamina inestable.
4. Regeneración de la forma oxidada de la flavina a partir de la forma reducida procedente del paso 3.
5. Hidrólisis de la imina protonada procedente del paso 3.

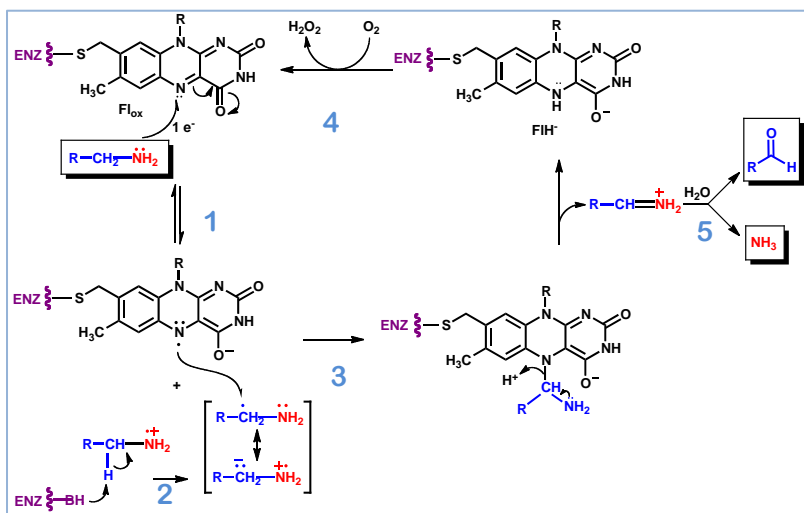


Fig. 7 Mecanismo de la desaminación oxidativa catalizada por MAO

3.2 INHIBIDORES DE MAO

La inhibición de la MAO es una estrategia utilizada en el tratamiento de algunas patologías. Por ejemplo, inhibir la MAO A puede resultar interesante en el tratamiento de la depresión, ya que esta patología está relacionada con un déficit en serotonina y noradrenalina en sistema nervioso central (SNS). Su inhibición, con la clorgilina por ejemplo, aumenta los niveles de dichos neurotransmisores en SNS.

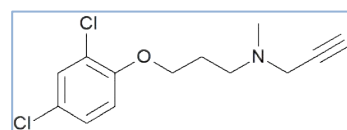


Fig. 8 Clorgilina

La enfermedad de Parkinson, relacionada con una disminución de la actividad dopaminérgica en la sustancia de negra en SNS, sigue una estrategia terapéutica similar. Al inhibir la MAO B selectivamente, con rasagilina por ejemplo, se consigue aumentar los niveles de dopamina.

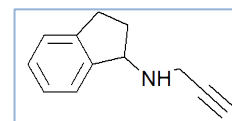


Fig. 9 Rasagilina

Por otra parte, en la reacción catalizada por la MAO se generan radicales libres que, como se explicará más adelante, están implicados en procesos neurodegenerativos como los que se producen en la enfermedad de Parkinson o Alzheimer. Por ello, inhibir la MAO tiene también un efecto neuroprotector que resulta interesante para el tratamiento de estas enfermedades.

El mecanismo de inhibición de la MAO por la clorgilina y la rasagilina es el que se muestra en la Fig. 10.

Se trata de una inhibición suicida, donde el farmacóforo de propargilamina reacciona con el cofactor FAD uniéndose covalentemente a él.

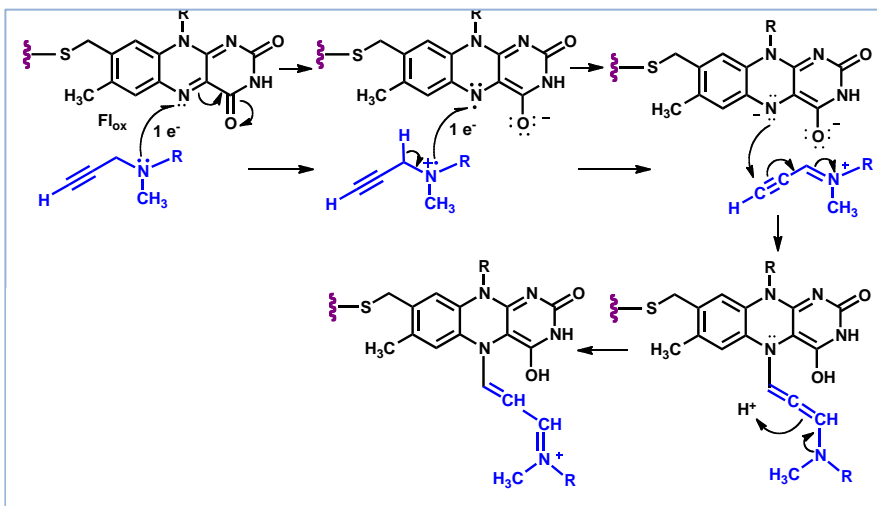


Fig. 10 Mecanismo de inhibición de la MAO

4 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO⁽³⁾

Un radical o radical libre es una especie química con un electrón desapareado. Suelen ser muy reactivos y, por tanto, difíciles de aislar.

En los sistemas biológicos, el oxígeno es el principal promotor de radicales libres por su capacidad de aceptar electrones de uno en uno. De esta forma, la adición del

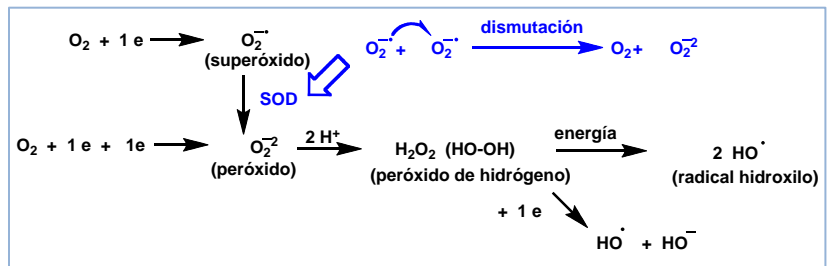


Fig. 11 Formación de las especies reactivas de oxígeno

primer electrón forma el radical superóxido; y la del segundo, el anión peróxido que se protona y forma el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno también se puede formar por permutación de dos moléculas de superóxido gracias a la superóxido dismutasa (SOD).

A partir del peróxido también se puede formar el radical hidroxilo por catálisis de iones metálicos, reacción conocida como reacción de Fenton. En los organismos aerobios, estos electrones provienen de la cadena respiratoria, donde el oxígeno es el aceptor último. También se generan radicales

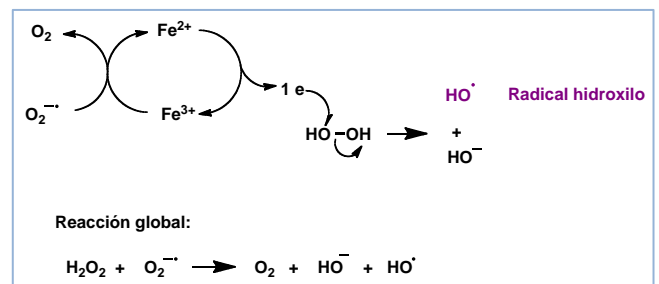


Fig. 12 Reacción de Fenton

durante la actuación de ciertas enzimas como la Ciclooxygenasa o la MAO.

Los radicales generados, se denominan especies reactivas de oxígeno. Estas especies al ser altamente reactivas, en especial el radical hidroxilo, van a generar una serie de daños en las estructuras celulares. Destaca la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana celular. Al ser una reacción radicalaria, el proceso se mantiene a si mismo (fase de propagación), extendiéndose a zonas cada vez mayores de la membrana, produciendo finalmente la muerte celular.

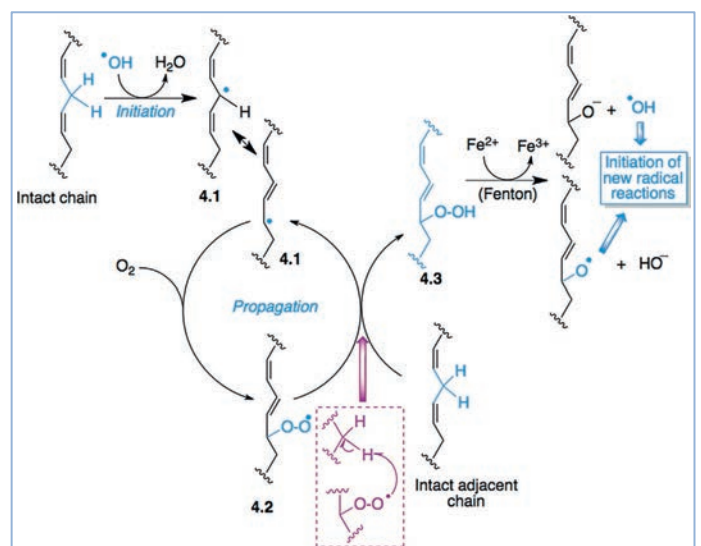


Fig. 13 Peroxidación de fosfolípidos de membrana

4.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS (9)

El estrés oxidativo es resultado de la producción desregulada de especies reactivas de oxígeno y juega un papel importante en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, pues colabora en la muerte y disfunción de las neuronas que contribuye a la patogenia de la enfermedad. Además, el tejido cerebral es bastante vulnerable al daño oxidativo a causa de: su alto consumo de oxígeno, su relativamente bajo nivel de antioxidantes, su baja capacidad regenerativa y la gran presencia de lípidos insaturados susceptibles de sufrir peroxidación.

4.2 TERAPIA ANTIOXIDANTE

Una forma de contrarrestar el estrés oxidativo es la utilización de antioxidantes captadores de radicales (*radical scavengers*). Son moléculas que, al reaccionar con las especies radicalarias, son capaces de estabilizar el electrón desapareado evitando que se inicie una nueva fase de propagación.

Esta estabilización ocurre en los derivados fenólicos como el ácido cafeico o el resveratrol, que pueden tener electrones desapareados sobre átomos de oxígeno y sobre átomos de carbono vecinos a un doble enlace. Sus radicales son estables gracias a la deslocalización del electrón desapareado sobre la nube π aromática.

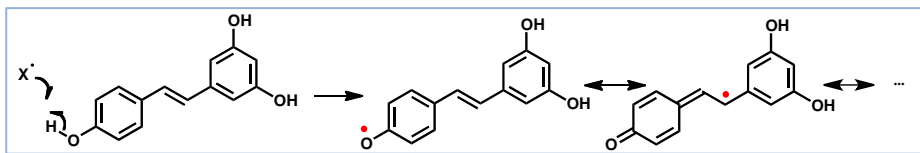


Fig. 14 Captación y estabilización de un radical por el resveratrol

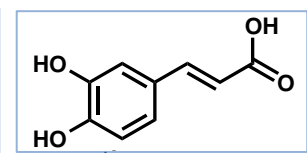


Fig. 15 Ácido cafeico

5 FÁRMACOS MULTIDIANA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS(10)

Los fármacos multidiana son aquellos que se han diseñado racionalmente para unirse de forma específica a dos o más dianas biológicas. Tienen su utilidad en enfermedades multifactoriales, como las neurodegenerativas, en las que redes complejas de proteínas se encuentran desreguladas, por lo que la aproximación tradicional un fármaco una diana no es efectiva. Además, en los sistemas biológicos existen funciones redundantes y mecanismos compensatorios que hacen difícil alterar un fenotipo apuntando a una sola diana.

Por todo ello, los fármacos multidiana presentan una serie de ventajas:(11)

- Aumento de la eficacia gracias a efectos sinérgicos o aditivos al modificar varias dianas terapéuticas de forma específica y simultánea.

- Las propiedades farmacocinéticas se simplifican, ya que no es necesario sincronizar varias especies químicas.
- Los estudios toxicológicos y los ensayos clínicos se simplifican, ya que sólo se desarrolla una sola especie química.
- Se facilita el cumplimiento terapéutico por parte del paciente pues se reduce el número de formas farmacéuticas.

Una forma de desarrollar un fármaco multidiana es la fusión de dos especies químicas con actividad frente a dos dianas terapéuticas conocidas.

5.1 POSIBLES EJEMPLOS DE FÁRMACOS MULTIDIANA

Fasudil tiene un grupo amino en su anillo de homopiperazina susceptible de ser funcionalizado. Por otra parte, cuando se une a la ROCK, este grupo amino queda orientado hacia el exterior del bolsillo de unión (Fig. 16), por lo que sería posible fusionar fasudil con otra molécula a través del grupo amino para obtener un fármaco multidiana.(7)

Después de haber visto tres dianas terapéuticas de interés en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, es posible plantear varios fármacos multidiana:

- Mediante la fusión de fasudil con ácido cafeico se puede obtener un inhibidor de ROCK con actividad antioxidante (Fig. 18).
- Mediante la fusión de fasudil con el fragmento de propargilo, se puede obtener un inhibidor de ROCK y de MAO (Fig. 17).

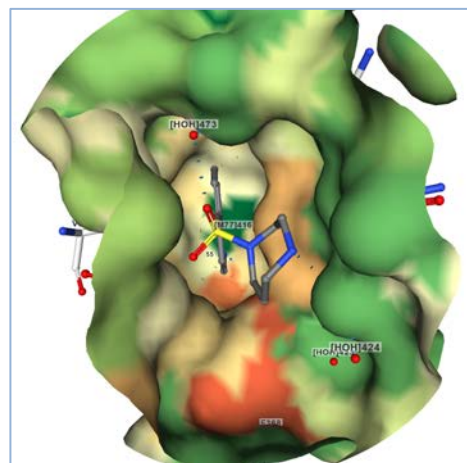


Fig. 16 Fasudil unido a ROCK, estructura obtenida por difracción de rayos X. Código PDB: 2ESM

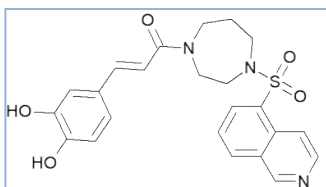


Fig. 18 Fármaco multidiana derivado de la fusión de fasudil y ácido cafeico

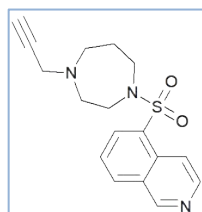


Fig. 17 Fármaco multidiana derivado de la fusión de fasudil y fragmento de propargilo

Objetivos:

- Exponer y explicar las diferentes aproximaciones en el descubrimiento de fármacos asistido por ordenador, haciendo especial hincapié en el cribado virtual y la técnica del *docking*.
- Aplicar el *docking* a moléculas derivadas de la fusión entre fasudil, fragmentos de propargilamina, y ácido cafeico. Para así determinar si presentan actividad como inhibidores de ROCK, de MAO-A, de MAO-B, y efecto antioxidante, es decir, si se pueden conseguir fármacos multidiana para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Material y métodos

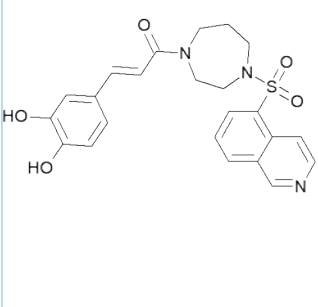
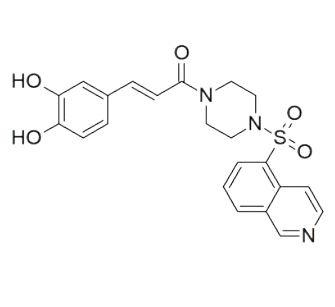
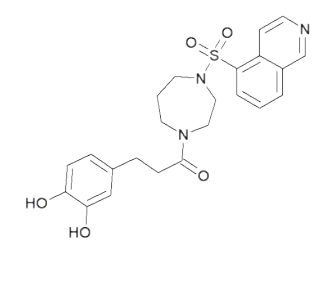
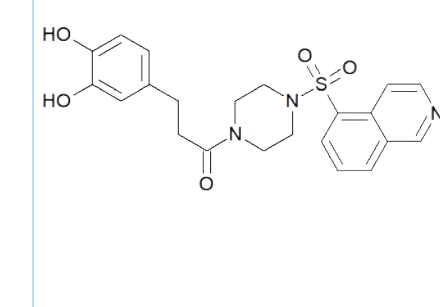
Se realizó una búsqueda de revisiones en el buscador Pubmed y en la revista Nature reviews Drug discovery, utilizando combinaciones de los siguientes términos: “docking”, “virtual screening”, “structure-based”, “ligand-based” y “drug discovery”. Además, se consultaron libros de química farmacéutica.

Se utilizaron los artículos que expusiesen de forma general los fundamentos de las diferentes técnicas de diseño de nuevos fármacos *in silico*, así como los que explicasen una técnica en particular, con especial interés en el cribado virtual y el *docking*.

1 PARA LA REALIZACIÓN DEL DOCKING:

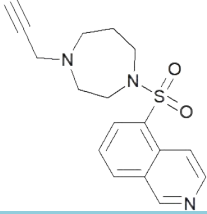
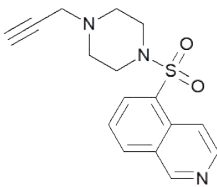
Las moléculas a ensayar son las siguientes:

1.1 FASUDIL, ÁCIDO CAFEICO Y DERIVADOS:

| | | | |
|--|---|--|--|
|  |  |  |  |
| Fasudil-cafeico: fusión entre fasudil y ácido cafeico | Fasudil 6-cafeico: fusión entre un análogo de fasudil con anillo de piperazina (6 miembros) y ácido cafeico | Fasudil-cafeico saturado: fusión entre fasudil y un análogo del ácido cafeico que no presenta α,β insaturación. | Fasudil 6-cafeico saturado: fusión entre un análogo de fasudil con anillo de piperazina (6 miembros) y un análogo del ácido cafeico que no presenta α,β insaturación. |

Estas moléculas se ensayan frente a la ROCK, y se utiliza el Fasudil como referencia. El posible efecto antioxidante derivado del fragmento del ácido cafeico o de su análogo saturado no se mide, ya que la técnica del *docking* no lo permite.

1.2 FASUDIL, PROPARGILAMINA Y DERIVADOS:

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>Fasudil-propargilo: fusión entre fasudil y fragmento propargílico a través de la amina secundaria del anillo de homopiperazina.</p> | <p>Fasudil 6-propargilo: Fusión entre un análogo de fasudil con anillo de piperazina y fragmento propargílico a través de la amina secundaria del anillo de piperazina.</p> |

Se ensayan frente a la ROCK, y se utiliza fasudil como referencia. También se ensayan frente a la MAO-A y MAO-B, y se toma clorgilina y rasagilina, respectivamente para cada isoforma, como inhibidores de referencia.

Para la realización del *docking* se siguieron los siguientes pasos:

- Utilización de la base de datos Protein Data Bank para descargar en formato .pdb la estructura, obtenida por difracción de rayos X, de las siguientes proteínas:
 - PDB ID: 2ESM. “Crystal Structure of ROCK 1 bound to fasudil”(7)
 - PDB ID: 1S2Q. “Crystal structure of MAOB in complex with N-propargyl-1(R)- aminoindan (Rasagiline)” (13)
 - PDB ID: 2BXR. “Human monoamine oxidase A in complex with clorgyline, crystal form A”(14)

Las tres enzimas están unidas a un inhibidor, lo que permite saber cuál es el centro activo.

- Preparación de la proteína para el *docking* gracias al software Chimera. Se elimina el ligando unido y el disolvente, y se añaden las cargas. Luego se transforman a formato .pdbqt en AutoDock Tools.
- Búsqueda de las coordenadas que sitúan al inhibidor dentro de la proteína gracias al software AutoDock Tools y la funcionalidad “Grid Box”. Lugar donde se realizará el *docking* con las moléculas a ensayar.
- Preparación de las moléculas a ensayar. Se dibujan las moléculas en ChemSketch, luego se preparan para el *docking* en el programa Chimera, donde se añaden las cargas y se protonan

- los grupos amino básicos. A continuación, en AutoDock Tools, se transforman a formato .pdbqt con el que se realizará el *docking*.
- Creación del archivo en formato .gpf (Grid Parameter File) con los parámetros de la cuadrícula en la cual se realizará el *docking*. Está definida por las coordenadas y su tamaño.
 - Creación del archivo en formato .dpf (Dock Parameter File) con los parámetros para la realización del *docking*. Se realizará un *docking* en 10 conformaciones diferentes de la molécula a ensayar, la estructura de la proteína quedará rígida.
 - Ejecución del *docking* gracias a los dos archivos generados.
 - Análisis de resultados. Obtención de la energía de unión de las conformaciones más estables. Visualización de la estructura tridimensional del complejo proteína-ligando y de las interacciones que intervienen.

Resultados y discusión

1 DISEÑO DE FÁRMACOS ASISTIDO POR ORDENADOR

Cabe destacar que existen dos enfoques para la identificación de *hits* asistida por ordenador: uno busca un compuesto capaz de unirse a una proteína diana conociendo su estructura (*structure-based*), y el otro busca un compuesto basándose en su similitud con ligandos conocidos o con modelos de farmacóforo (*ligand-based*).⁽²⁾

Por otra parte, el cribado virtual es una herramienta útil para cualquiera de estos dos enfoques. Consiste en puntuar y clasificar las moléculas de una colección según su probabilidad de presentar actividad biológica. Por tanto, reduce el número de candidatos a testar por cribado de alto rendimiento, lo que disminuye costes y tiempo, ya que al ser una herramienta computacional, no es necesario sintetizar la molécula ni aislar la diana terapéutica. (15)(16)

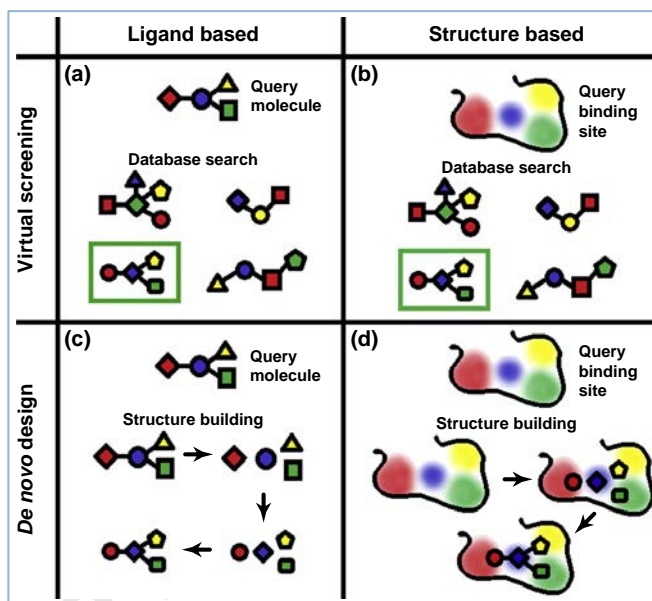


Fig. 19 Diferentes aproximaciones en la identificación de *hits* asistida por ordenador: (a) Cribado virtual basado en el ligando, (b) cribado virtual basado en la estructura, (c) diseño “de novo” basado en el ligando y (d) diseño “de novo” basado en la estructura

1.1 CRIBADO VIRTUAL BASADO EN EL LIGANDO (LIGAND-BASED VIRTUAL SREENING) (17)

El método *ligand-based* se usa cuando no se conoce la estructura tridimensional de la proteína diana. Por lo que se intenta recabar información a partir de los ligandos con actividad biológica conocida. Ejemplo de ello es el método QSAR (relación estructura actividad cuantitativa), que busca relacionar la actividad biológica de una serie de compuestos, con sus propiedades estructurales y fisicoquímicas (lipofilia, polaridad, volumen...). Estas propiedades, denominadas descriptores moleculares, se expresan de forma cuantitativa, por ejemplo, la lipofilia se cuantifica mediante Log P y la polaridad mediante el momento dipolar. Para llevarlo a cabo se siguen los siguientes pasos:

- Se identifican una serie de moléculas con actividad farmacológica conocida frente a una diana.
- Se identifican y determinan los descriptores moleculares asociados a las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las moléculas estudiadas.
- Se buscan correlaciones cuantitativas entre los descriptores moleculares y la actividad biológica de las moléculas estudiadas, de esta forma se genera el modelo QSAR.
- El modelo QSAR se utiliza para generar nuevos compuestos con una actividad biológica optimizada y para cribar colecciones de compuestos.
- Los nuevos compuestos que se postulan se sintetizan y se ensayan experimentalmente.

1.2 CRIBADO VIRTUAL BASADO EN LA ESTRUCTURA (STRUCTURE-BASED VIRTUAL SCREENING) (18) (19)

Este método se basa en hacer un cribado computacional de grandes colecciones de compuestos de estructura conocida frente a una diana de estructura también conocida.

El cribado virtual basado en la estructura se realiza mediante una técnica llamada *docking*. Para llevarla a cabo, se parte de la estructura tridimensional del complejo ligando-receptor obtenida experimentalmente mediante espectroscopia de rayos X, se identifica el sitio de unión, así como las interacciones que se producen entre el ligando y la proteína. A partir de dichos complejos, se pueden diseñar nuevos ligandos con igual o mayor afinidad. Para ello, es necesario modelizar el acoplamiento al receptor de las nuevas estructuras que se postulan, proceso conocido como *docking*. Así, el ligando estudiado experimentalmente se sustituye por el que se está diseñando y se analiza su capacidad de unión a la proteína. (3)

A diferencia del cribado de alto rendimiento, se pueden modelizar las interacciones que permiten la unión entre la molécula candidata y la diana. Esto convierte al descubrimiento de fármacos en un proceso más eficiente, donde el método de ensayo y error del cribado de alto rendimiento va dejando paso a métodos racionales.

En la práctica el proceso consta de las siguientes fases:

- 1) Procesamiento de la estructura tridimensional de la diana de interés, se identifica el sitio de unión, así como la conformación de la macromolécula más adecuada. También se prepara la colección de compuestos a ensayar, teniendo en cuenta tautomerías, estados de protonación, etc.
- 2) Realización del *docking*, en inglés acoplamiento. Consiste en enfrentar cada compuesto de la colección frente a la diana para poder evaluar su grado de unión. Este proceso se divide en dos etapas:
 - **Posing**: un algoritmo de búsqueda genera una serie de posibles conformaciones y orientaciones con las que se puede unir la molécula dentro del sitio de unión al receptor.
 - **Scoring**: estimación cuantitativa de la energía libre de unión del ligando, en una conformación determinada, a partir de las interacciones que se establecen entre el compuesto y la diana. Para ello, los programas de *docking* utilizan una función de puntuación (*scoring function*), que permite clasificar las diferentes conformaciones generadas durante el *posing* en función de su energía de unión al sitio activo. (16)

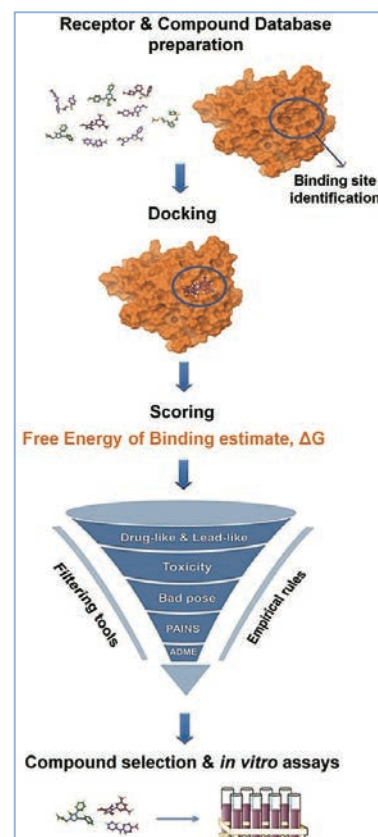
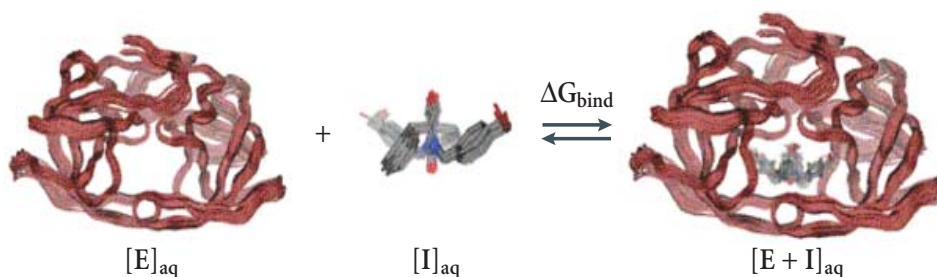


Fig. 20 Fases en el cribado virtual basado en la estructura

En el caso de una enzima (E) y un inhibidor (I), el *docking* intenta predecir la estructura del complejo [E+I] en el equilibrio: (20)



La energía libre de unión se relaciona con la afinidad de unión mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G = -RT \ln K_A \qquad K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

La energía libre de unión estimada por la función de puntuación permite cuantificar la fuerza de unión fármaco-diana. Gracias a ello, es posible comparar y clasificar una serie de compuestos en función de su capacidad de unión a la diana, y así seleccionar a los mejores candidatos a futuros fármacos.

1.2.1 Limitaciones del *docking* estático

Actualmente, el *docking* permite realizar de forma rápida un cribado de bibliotecas de cientos de miles de compuestos. Sin embargo, esta velocidad computacional se obtiene a costa de la exactitud, especialmente cuando se requiere un cambio conformacional de la proteína diana durante el proceso de unión del ligando. Así, el *docking* presenta una serie de características que limitan su capacidad predictiva: la falta de flexibilidad de las dianas o de los ligandos, y no tener en cuenta ni la solvatación, ni efectos entrópicos que intervienen en el proceso de unión. Además, como este método solo da una imagen estática del proceso de unión, no informa sobre magnitudes cinéticas. En muchos casos, las cinéticas de unión son mejores predictores de la eficacia del fármaco *in vivo* que la afinidad de unión.

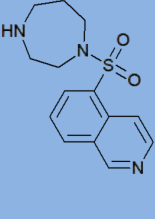
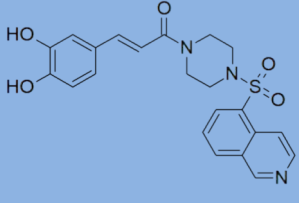
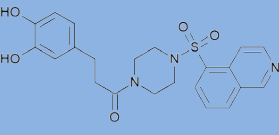
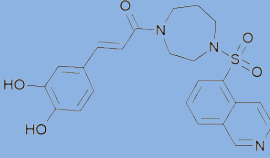
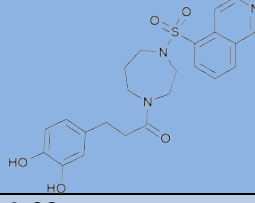
Todas estas limitaciones se pueden abordar mediante simulaciones de dinámica molecular. Gracias a este método, se puede tener en cuenta la flexibilidad estructural del sistema ligando-diana a nivel atómico. Además, las simulaciones son suficientemente largas como para cubrir todo el proceso de unión del ligando a su diana (desde la desolvatación completa del compuesto hasta el estado de unión completa a la proteína diana). De esta forma, se tiene en cuenta la termodinámica y la cinética del proceso de unión. El inconveniente del proceso es su gran complejidad computacional. Por ello, su utilización a gran escala, como en procesos de *hit-to-lead* u optimización de un *lead*, en muchos casos no es factible. Sin embargo, gracias al esfuerzo que se está realizando para optimizar el proceso y al incremento de la potencia computacional, este método llamado *docking* dinámico está muy bien posicionado para sustituir al tradicional *docking* estático.(19)

2 RESULTADOS DEL DOCKING

Se obtuvieron las siguientes energías de unión para las siguientes proteínas:

En la primera línea de cada tabla, se presenta la energía de enlace (kJ/mol) de la conformación de menor energía, y en la segunda línea, la energía de la conformación de mayor energía de las 10 conformaciones ensayadas.

ROCK:

| Fasudil | Fasudil 6-cafeico | Fasudil 6-cafeico saturado | Fasudil-cafeico | Fasudil-cafeico saturado |
|---|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| -9,93 | -10,25 | -8,47 | -9,81 | -9,38 |
| -9,78 | -7,42 | -6,64 | -7,68 | -6,12 |

Cabe destacar que las moléculas ensayadas tienen una energía de enlace en su conformación de menor energía similar fasudil, por lo que todas ellas tendrían buena capacidad de unión al centro activo de la ROCK.

La única que tiene una energía de unión más baja que la de fasudil es fasudil 6-cafeico. Esto se debe a que existen nuevas interacciones entre los hidroxilos del fragmento del ácido cafeico con los residuos de Asp³⁶⁹ y Asn¹⁶³ de un bolsillo hidrófilo de la proteína (Fig. 21). Por otro lado, el anillo de isoquinolina se desplaza del bolsillo original y desaparecen los enlaces de hidrógeno presentes en fasudil.

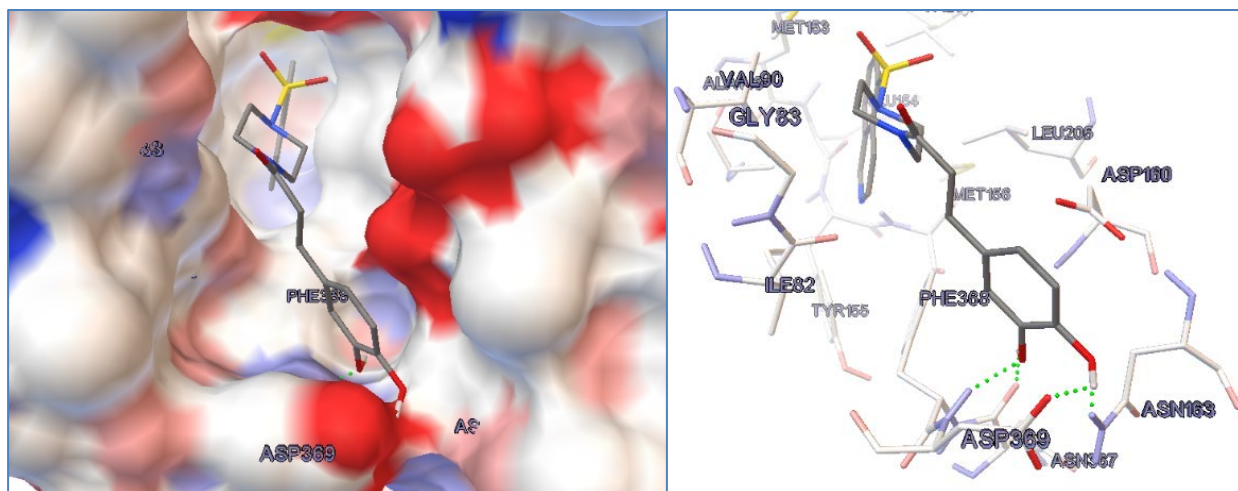
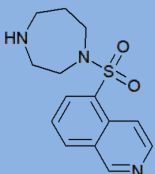
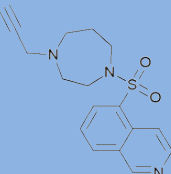
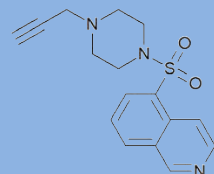


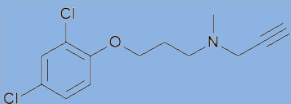
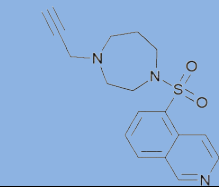
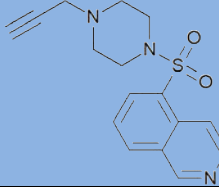
Fig. 21 Docking de fasudil 6-cafeico con ROCK: izquierda, vista de superficie de la proteína con colores según polaridad; derecha, se muestran los residuos próximos y los enlaces de hidrógeno en verde. Captura de AutoDock Tools.

Por lo tanto, fasudil 6-cafeico y fasudil-cafeico son dos buenos candidatos a fármacos multidiana. No solamente por tener mejores energías de enlace, sino por su capacidad de deslocalizar un electrón desapareado a través del enlace α,β insaturado. Esta característica, que les diferencia de sus análogos saturados (fasudil 6-cafeico saturado y fasudil-cafeico saturado), es muy probable que aumente su capacidad antioxidante. No obstante, esta hipótesis tendría que ser verificada experimentalmente.

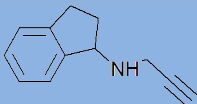
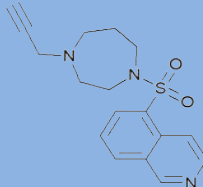
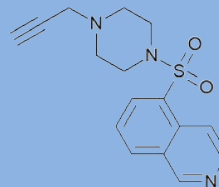
ROCK:

| Fasudil | Fasudil-propargilo | Fasudil 6-propargilo |
|---|---|---|
|  |  |  |
| -9,93 | -10,43 | -9,85 |
| -9,78 | -9,92 | -9,28 |

MAO-A:

| Clorgilina | Fasudil-propargilo | Fasudil 6-propargilo |
|---|---|---|
|  |  |  |
| -7,52 | -10,24 | -9,43 |
| -5,62 | -8,72 | -8,90 |

MAO-B:

| Rasagilina | Fasudil-propargilo | Fasudil 6-propargilo |
|---|---|---|
|  |  |  |
| -7,00 | -10,19 | -9,6 |
| -6,75 | -9,16 | -8,81 |

Si se buscan fármacos multidiana con capacidad de inhibir la ROCK y la MAO, sin duda, fasudil-propargilo y fasudil 6-propargilo son buenos candidatos. Presentan en todos los casos, salvo en fasudil 6-propargilo frente a ROCK, energías de enlace inferiores a los inhibidores de referencia.

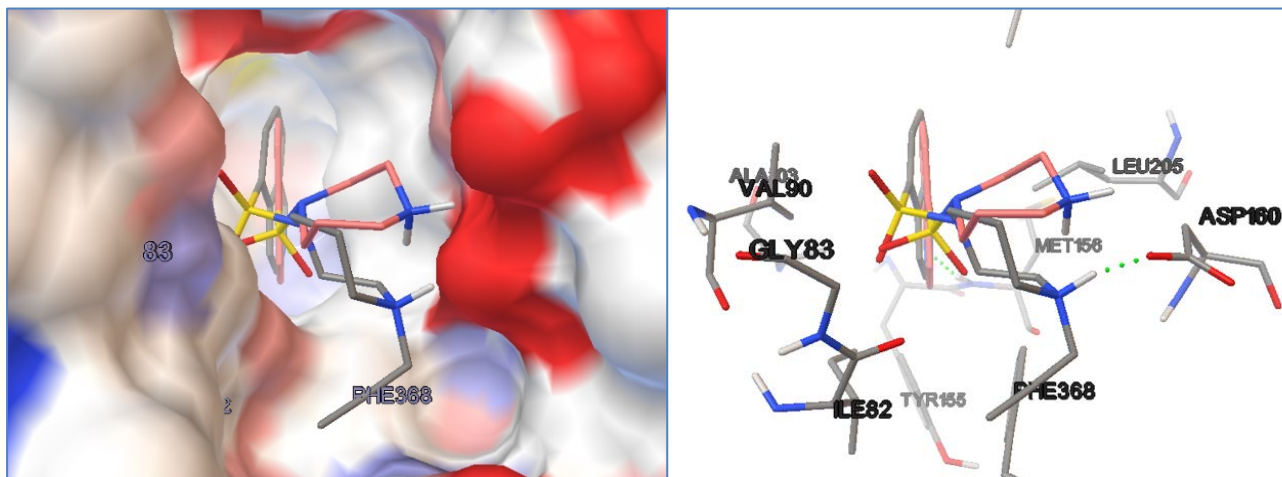


Fig. 20 Superposición del docking de fasudil-propargilo (gris) y fasudil (rosa) con ROCK. Izquierda, vista de superficie de la proteína con colores según polaridad; derecha, se muestran los residuos próximos y los enlaces de hidrógeno en verde. Captura de AutoDock Tools.

Cabe destacar que la unión fasudil-propargilo con la ROCK es la más estable (-10,43 kJ/mol). Esto se debe a la interacción entre el grupo amino protonado del anillo de homopiperazina y el residuo de Asp¹⁶⁰(Fig. 20). Por el contrario, la interacción en el caso del Fasudil no es tan fuerte porque la distancia con este residuo de Asp¹⁶⁰ es mayor.

Conclusiones

El diseño de fármacos asistido por ordenador es un método en auge por dos motivos principalmente:

1. Permite hacer un cribado de grandes colecciones de compuestos de una forma totalmente virtual, reduciendo así costes y tiempo en las siguientes etapas de desarrollo. En efecto, gracias a la alta disponibilidad de estructuras tridimensionales de potenciales dianas terapéuticas y a la técnica del *docking*, actualmente es posible ensayar cualquier molécula frente a una proteína.
2. El desarrollo *in silico* abre la puerta al diseño racional de nuevas estructuras, gracias al estudio de las interacciones diana-ligando.

Ejemplo de ello son los fármacos multidiana diseñados en el presente trabajo como potenciales tratamientos contra las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson. De entre los fármacos multidiana producidos a partir de la fusión entre fasudil y ácido cafeico, fasudil 6-cafeico es el que muestra mayor afinidad frente a la ROCK durante el *docking*. Por lo que es un buen candidato como inhibidor de ROCK con posible actividad antioxidante.

De entre los fármacos multidiana ideados a partir de fasudil y el fragmento de propargilo, fasudil-propargilo es el que muestra mayor afinidad de unión a ROCK y a las dos isoformas de la MAO. Por lo que, de confirmarse su actividad *in vitro*, fasudil 6-cafeico y fasudil-propargilo serían dos buenos *hits*.

Bibliografía

1. Lombardino JG, Lowe JA. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(10):853-62.
2. Lolli M, Narramore S, Fishwick CWG, Pors K. Refining the chemical toolbox to be fit for educational and practical purpose for drug discovery in the 21st Century. *Drug Discov Today.* 1 de agosto de 2015;20(8):1018-26.
3. Avendaño Lopez C, editor. *Introducción a la química farmacéutica.* 2. ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana; 2001. 930 p.
4. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov.* mayo de 2005;4(5):387-98.
5. Patrick GL. *An introduction to medicinal chemistry.* Fifth edition. Oxford: Oxford University Press; 2013. 789 p.
6. Hensel N, Rademacher S, Claus P. Chatting with the neighbors: crosstalk between Rho-kinase (ROCK) and other signaling pathways for treatment of neurological disorders. *Front Neurosci* [Internet]. 2015 [citado 1 de abril de 2018];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00198/full>
7. Jacobs M, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, et al. The Structure of Dimeric ROCK I Reveals the Mechanism for Ligand Selectivity. *JBiolChem.* 2006;281:260-8.
8. Pierce AC, Sandretto KL, Bemis GW. Kinase inhibitors and the case for CH...O hydrogen bonds in protein-ligand binding. *Proteins Struct Funct Genet.* 1 de diciembre de 2002;49(4):567-76.
9. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* marzo de 2004;3(3):205-14.
10. Nikolic K, Mavridis L, Djikic T, Vucicevic J, Agbaba D, Yelekci K, et al. Drug Design for CNS Diseases: Polypharmacological Profiling of Compounds Using Cheminformatic, 3D-QSAR and Virtual Screening Methodologies. *Front Neurosci.* 2016;10:265.
11. Fármacos multidiana como una nueva estrategia contra las enfermedades degenerativas · 8 de febrero de 2018 [Internet]. *Webtv RANF.* [citado 5 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.ranf.tv/index.php/video/512/farmacos-multidiana-como-una-nueva-estrategia-contra-las-enfermedades-degenerativas--8-de-febrero-de-2018/>
12. Binda C, Li M, Herzig Y, Sterling J, Edmondson DE, Mattevi A. Crystal Structures of Monoamine Oxidase B in Complex with Four Inhibitors of the N-Propargylaminoindan Class. *JMedChem.* 2004;47:1767-74.
13. RCSB PDB - 2BXR: Human Monoamine Oxidase A in complex with Clorgyline, Crystal Form A [Internet]. [citado 31 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/2BXR>
14. Hert J, Willett P, Wilton DJ, Acklin P, Azzaoui K, Jacoby E, et al. Enhancing the Effectiveness of Similarity-Based Virtual Screening Using Nearest-Neighbor Information. *J Med Chem.* noviembre de 2005;48(22):7049-54.
15. Hawkins PCD, Skillman AG, Nicholls A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. *J Med Chem.* enero de 2007;50(1):74-82.
16. Acharya C, Coop A, E. Polli J, D. MacKerell A. Recent Advances in Ligand-Based Drug Design: Relevance and Utility of the Conformationally Sampled Pharmacophore Approach. *Curr Comput Aided-Drug Des.* 1 de marzo de 2011;7(1):10-22.
17. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Curr Top Med Chem.* 2014;14(16):1923-38.
18. Gioia D, Bertazzo M, Recanatini M, Masetti M, Cavalli A. Dynamic Docking: A Paradigm Shift in Computational Drug Discovery. *Mol Basel Switz.* 22 de noviembre de 2017;22(11).
19. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* noviembre de 2004;3(11):935-49.