



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

Utilización de la Resonancia Magnética Nuclear en el Diseño de Fármacos: "SAR by NMR"

Trabajo Fin de Grado

Curso 2015-16

Francisco Javier Guerrero García

Tutor: José Luis Espartero Sánchez

Sevilla, Septiembre 2016

Resumen del trabajo

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, *RMN* es una herramienta muy valiosa en el diseño de fármacos, ya que es un método a partir del cual se puede obtener muy diversa información, como conocer la información estructural de una molécula, distinguir entre dos conformaciones de un mismo compuesto o detectar interacciones entre distintas moléculas como es el caso de las interacciones fármaco-receptor. Toda esta información se obtiene gracias al estudio de las señales de los diferentes núcleos que se observan en el espectro de la molécula estudiada y las perturbaciones que se producen por la presencia de otras entidades. Por medio del desplazamiento químico y de otros parámetros, podemos conocer mejor a la molécula estudiada y obtener mayor información, con el objetivo de desarrollar nuevos ligandos para una diana farmacológica concreta.

Conocer la interacción entre ligando y proteína diana es clave en el diseño de fármacos. Aquí es donde juega un papel crucial la *RMN*, ya que permite correlacionar los cambios que se producen en una molécula diana cuando un ligando se une a ella, con los cambios en los desplazamientos químicos que se observan al comparar los espectros antes y después de la unión.

La interacción que se produce se puede estudiar centrándose en el ligando o en la diana, y aunque existen diversas técnicas dentro de cada tipo, son más numerosas las que estudian el ligando. En cambio, las técnicas que estudian la diana son más específicas y tienen mayor rendimiento. Uno de estos últimos métodos, que se centran en la proteína diana, es el que permite conocer las Relaciones Estructura-Actividad por medio de la *RMN*, conocido como *SAR by RMN*, que se basa en identificar cabezas de serie que interaccionen con el sitio activo de la diana y optimizarlos hasta conseguir un ligando de gran afinidad por la diana.

Palabras Clave: Diseño de fármacos; espectroscopia *RMN*; *SAR* (Structure-activity relationships); Diana; Cribado.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Objetivos | 3 |
| 3. Metodología | 4 |
| 4. Resultados | 5 |
| 4.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | 5 |
| 4.1.1. Utilidades..... | 7 |
| 4.1.2. Ventajas..... | 7 |
| 4.1.3. Inconvenientes | 8 |
| 4.1.4. Utilización de la RMN en metabolómica | 8 |
| 4.2. Diseño de Fármacos..... | 9 |
| 4.3. Utilización de la RMN en el Diseño de Fármacos | 14 |
| 4.3.1. Importancia del mapeo de desplazamiento químico en el diseño de fármacos | 18 |
| 4.3.2. La RMN en metabolómica para el diseño de fármacos | 24 |
| 4.4. Método SAR by NMR | 24 |
| 4.4.1. Ventajas del método SAR by NMR | 30 |
| 4.4.2. Ejemplos de aplicación del método SAR by NMR | 30 |
| 5. Conclusión | 33 |
| 6. Bibliografía | 34 |

1. Introducción

La Química Farmacéutica tiene como uno de sus temas fundamentales de estudio el diseño y desarrollo de fármacos. El diseño de nuevos fármacos es necesario para obtener tratamientos terapéuticos más eficaces frente a enfermedades que, o bien no tienen aún un tratamiento efectivo o, si lo tienen, éste presenta algunos efectos secundarios. Por ello, se hace necesario tener una variedad de métodos que permitan identificar, aislar y caracterizar un cabeza de serie con determinada actividad farmacológica. Tras una serie de optimizaciones y de modificaciones con el fin de mejorar la potencia, selectividad y propiedades farmacocinéticas y de disminuir la toxicidad, se consigue desarrollar un candidato a fármaco, que se someterá posteriormente a una serie de ensayos clínicos hasta que pueda ser comercializado. Por todo ello, las etapas iniciales de identificación de la diana concreta sobre la que se va a actuar y el conocer qué ligando se pretende obtener, son muy importantes en el proceso y deben realizarse de una manera racional, por el hecho de que una buena elección inicial permite tener un mayor porcentaje de éxito en el desarrollo de un nuevo fármaco, además de un menor gasto de tiempo y dinero.

Por este motivo, se han ido desarrollando distintos métodos que se basan en conocer la información que rodea al fármaco y/o al receptor, actualmente hay diversas técnicas que permiten obtener información estructural detallada de una molécula en poco tiempo (Galbis, 2000).

La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de estas técnicas, siendo de las más efectivas y con mayor reproducibilidad, todo ello con un coste adecuado (aunque este puede aumentar si se requieren mejores condiciones para conseguir el objetivo). Por medio de la RMN se puede obtener información de gran relevancia acerca de la diana sobre la que se quiere actuar. Además, se puede utilizar en casi todas las etapas del proceso del diseño del fármaco, por lo que es una de las herramientas de mayor utilidad actual en el campo de la Química Farmacéutica. Una de sus funciones importantes es que tiene la capacidad de detectar cuándo un

ligando interacciona con una diana, así como conocer por dónde y qué grupos funcionales actúan en esa interacción.

Otro de los métodos de gran importancia y con un gran desarrollo durante los últimos años, son aquellos métodos basados en las relaciones estructura-actividad (SAR), que permiten desarrollar sustancias con actividad farmacológica a partir de cabezas de serie conocidos que se van modificando y optimizando, con el fin de obtener un fármaco de calidad. Gracias a estos métodos, se ahorra mucho tiempo en el proceso debido a que se reduce la cantidad de fármacos a evaluar que interaccionen con la diana, ya que los derivados de estos cabezas de serie pueden obtenerse más adelante del proceso por medio de la optimización de los cabezas de serie que hayan tenido interacción.

A continuación destacaremos los aspectos más importantes del uso de la RMN en el diseño de fármacos, dando un enfoque actual del tema, centrándonos en el método conocido como SAR by RMN como técnica más concreta y eficaz para ello.

2. Objetivos

El objetivo principal al abordar el presente trabajo ha sido llevar a cabo una revisión bibliográfica de artículos y libros con el fin de tener una visión actual sobre el estudio de las relaciones estructura-actividad de ligandos potencialmente activos frente a una diana farmacológica, en el diseño de fármacos, mediante la utilización de la espectroscopía de RMN como herramienta esencial.

Para ello, en primer lugar se abordan brevemente los conceptos básicos de la RMN para pasar a continuación a recordar las etapas generales y las características a tener en cuenta en el diseño de fármacos. Con todo ello, se pasa posteriormente a relacionar ambos conceptos y a interpretar la función de la RMN en el diseño de fármacos. Para finalizar, se describe el método SAR by RMN, y se evalúa su función y capacidad para generar nuevos fármacos.

3. Metodología

Se ha utilizado una estrategia de búsqueda bibliográfica en bases de datos, concretamente de PUBMED y SCIFINDER, de artículos originales y revisiones que hacían referencia a una serie de palabras clave. Estas palabras clave fueron: **drug design** (diseño de fármacos), **SAR** (relaciones estructura-actividad), **NMR** (resonancia magnética nuclear) y **drug discovery** (descubrimiento de fármacos). La búsqueda se realizó tanto combinando estas palabras como por separado de las mismas. Se seleccionaron más de una veintena de artículos, que contenían la información que se quería obtener.

Además, a través del catálogo FAMA de la Universidad de Sevilla, se encontraron una serie de libros relacionados con el diseño de fármacos mediante la utilización de la RMN. Se seleccionaron aquellos que tratan de los métodos de diseño de fármacos basados en la relación estructura-actividad de la diana.

4. Resultados

4.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía de RMN es una técnica en la que se imbrican diversas ciencias, entre ellas las Matemáticas, la Química, la Física, la Biología, la Informática y la Medicina. El fenómeno de la RMN se basa en el hecho de que los núcleos de ciertos átomos pueden orientar su espín nuclear al aplicársele un campo magnético. Estas diferentes orientaciones tendrían diferentes energías asociadas y se podrían producir transiciones entre ellas al recibir pulsos de radiación. Estos cambios se recogen y se representan en un diagrama que relaciona la intensidad de la señal frente a la frecuencia a la que se registra. La frecuencia de resonancia de los núcleos depende de la especie química estudiada, del tipo de núcleo, de la intensidad del campo magnético aplicado y del ambiente químico que rodea a los núcleos estudiados. Este último factor puede inducir pequeñas modificaciones en la frecuencia de las señales, efecto que se conoce como **desplazamiento químico** (Pellecchia y cols., 2002).

Desde principios de los años 1920 se intentaba detectar el momento angular de espín asociado a los núcleos atómicos. Pero no fue hasta finales de 1945 cuando se detectó la primera señal de RMN, por E. Purcell y colaboradores en la Universidad de Harvard. En diciembre de ese mismo año y de forma independiente, F. Bloch y su equipo también consiguieron detectar señales de RMN de protón en la Universidad de Stanford. Ambos utilizaron equipos experimentales diferentes y por este descubrimiento recibieron el Nobel en 1952 de forma conjunta. Poco tiempo después, con el fin de mejorar la sensibilidad del método, se descubrió el fenómeno del desplazamiento químico antes mencionado, lo que hizo que la técnica perdiera interés para los físicos, pero que atrajo inmediatamente el de los químicos. Más tarde fue descubierto el **acoplamiento escalar espín-espín** entre núcleos cercanos, que provoca un desdoblamiento de las señales, y gracias al cual se puede obtener más información sobre el entorno del núcleo estudiado.

En 1966 se dio con algo que mejoró la rapidez del método: la introducción de la Transformada de Fourier. Esta mejora técnica permitía excitar simultáneamente todos los protones de la muestra, sin necesidad de un barrido secuencial de frecuencias y de forma independiente a cual fuera su desplazamiento químico. Esta excitación simultánea se consigue por medio de un único pulso de radiofrecuencia de gran intensidad y de muy corta duración, obteniéndose una mejora de la relación señal/ruido, dada la posibilidad de acumular la información de varios barridos, ampliando así el ámbito de aplicación de la RMN (Sánchez Ferrando, 2005). También pueden ocurrir otros fenómenos que ayudan en la determinación estructural de la molécula estudiada, como el tiempo de relajación de espín, que fueron descubriéndose a lo largo de los años. La **integral** de una señal es proporcional a la cantidad molar de núcleos implicados en ella, por lo que permite conocer la cantidad relativa que hay en la estructura (Cohen, 1996).

La técnica evolucionó y se convirtió en un método usado frecuentemente para determinar la estructura tridimensional de moléculas de diferentes tamaños, gracias a la introducción en la década de los 80 de imanes superconductores y nuevas técnicas de pulso más sofisticadas (Holzgrabe y cols., 1999). Las mejoras conseguidas en los últimos años son debidas a la utilización de diferentes tipos de software que permiten asignar todos los picos, así como a la aplicación de criosondas que mejoran la sensibilidad al mejorar la relación señal/ruido o de nuevas secuencias de pulso que mejoran la sensibilidad, la selectividad y la eficacia de este método.

Los isótopos estudiados suelen ser ^1H , ^{13}C , ^{15}N , pero también otros como ^{19}F o ^{31}P (en el estudio de fosfolípidos), así como una gran variedad de núcleos metálicos como Ni, Pt, Zn o Pb (Ronconi y Sadler, 2008). Las técnicas de etiquetado con ^{15}N o ^{13}C de núcleos en posiciones concretas de la molécula estudiada, permiten aumentar la sensibilidad y resolución, así como reducir la complejidad del espectro de RMN. Hoy en día, también se utilizan técnicas de atenuación de la relajación T_2 del núcleo o la polarización dinámica nuclear (Lee y cols., 2014). Las últimas mejoras en la espectroscopía RMN están basadas en mecánica cuántica, con el objetivo de aumentar la confianza al elucidar estructuras, ya que se realizan comparando el espectro

obtenido con otros espectros virtuales calculados por métodos computacionales (Everett, 2015).

4.1.1. Utilidades

La RMN es una técnica que tiene una gran reproducibilidad y estabilidad. Se puede utilizar para analizar fármacos y para realizar controles de calidad identificando y cuantificando posibles impurezas. También es útil para identificar y cuantificar la cantidad de fármaco o fármacos existentes en una forma de dosificación o en mezclas de compuestos. Otra de sus utilidades es la de poder determinar la composición isomérica, así como conocer las estructuras de tautómeros. También permite calcular el exceso enantiomérico de un fármaco, ya que mediante la adición de un agente quiral a una mezcla de enantiómeros, se pueden generar señales diferentes para cada isómero (Sanz y Giraldo, 1995). Por último, la RMN se puede utilizar para conocer las interacciones ligando-proteína, así como para investigar las propiedades fisicoquímicas de un compuesto determinado (Mantle, 2013).

Gracias a todas estas utilidades, la RMN se utiliza en el descubrimiento y diseño de nuevos fármacos de manera muy eficiente, como se verá a continuación, ya que revela información acerca de las interacciones moleculares que puedan existir a nivel atómico, gracias a los cambios producidos en los parámetros antes descritos.

4.1.2. Ventajas

Las ventajas del uso de RMN son numerosas en relación con sus limitaciones. Permite estudiar las interacciones directamente en diferentes medios, normalmente en solución acuosa, lo que es una gran ventaja, ya que es la única técnica que permite la identificación de la estructura en estas condiciones. También permite, en ciertas condiciones, detectar diversas conformaciones de un mismo compuesto. Una gran ventaja de este método es que permite detectar y cuantificar interacciones sin necesidad de conocer la función de la proteína a la que se unirá el fármaco. Permite incluso trabajar con quimiotecas (bibliotecas de compuestos químicos) de compuestos sintetizados mediante Química Combinatoria, obteniéndose información acerca de

qué molécula se une al receptor estudiado, de las partes que interactúan entre ellas y por dónde se unen (Pellecchia y cols., 2008).

4.1.3. Inconvenientes

Una de las limitaciones de este método es que sólo se puede utilizar para moléculas pequeñas o complejos de éstas con macromoléculas de un peso molecular (PM) máximo de 30kDa. Además, la conformación de la molécula es altamente dependiente del entorno, por lo que un pequeño cambio en el entorno puede llevar a grandes diferencias en la conformación. Esto se puede solucionar, realizando promedios de las mediciones de los parámetros, y así obtenemos una conformación media de la estructura.

Una limitación importante es la falta de sensibilidad en comparación con otros métodos. Para solucionarla, se introdujeron los imanes superconductores, aunque esto aumentó considerablemente los costes. Y más recientemente se han comercializado criosondas enfriadas a 20K con helio gas. Por otra parte, las sondas microespirales, de menor tamaño, consiguen aumentar la sensibilidad en gran medida (Everett, 2015).

4.1.4. Utilización de la RMN en metabolómica

Una de las aplicaciones más recientes de la RMN es la identificación y cuantificación de metabolitos producidos en el organismo, los cuales pueden estar alterados en ciertas enfermedades o producirse tras la metabolización de un fármaco. La metabolómica es la ciencia que se encarga de estudiar estos metabolitos y la RMN es una herramienta excelente para su identificación, ya que a las ventajas que tiene el método de por sí, se suma que es un método no destructivo, ya que la muestra puede ser reutilizada, algo significativo cuando hablamos de metabolitos. Otra ventaja en este sentido es la posibilidad de identificar los metabolitos y conocer su estructura sin necesidad de conocer sus propiedades (Leenders y cols., 2015).

4.2. Diseño de Fármacos

La búsqueda de remedios para curar las enfermedades y desórdenes que nos afectan es una aspiración tan antigua como la propia humanidad y sigue siendo uno de los retos fundamentales de la sociedad actual. Los gobiernos y los organismos reguladores, así como la industria, ven con preocupación que es necesario mejorar el proceso de descubrimiento de nuevos medicamentos, ya que en los últimos años se han aprobado menos fármacos, a pesar de que se ha producido un importante aumento de los recursos destinados a la investigación y el desarrollo. En la Figura 1 se ilustra este hecho, incluyéndose las nuevas entidades químicas registradas entre los años 1980-2010. De la misma se deduce una disminución continuada del número de nuevos fármacos introducidos en los mercados internacionales, a pesar del aumento sostenido de los costes y de la mejora de la tecnología. Muchos comentarios han surgido sobre estas cuestiones, siendo el más optimista el que se refiere a la comercialización de menos pero mejores fármacos, y que la reciente evolución en la tecnología todavía no ha suministrado su verdadero efecto (San Román, 2013).

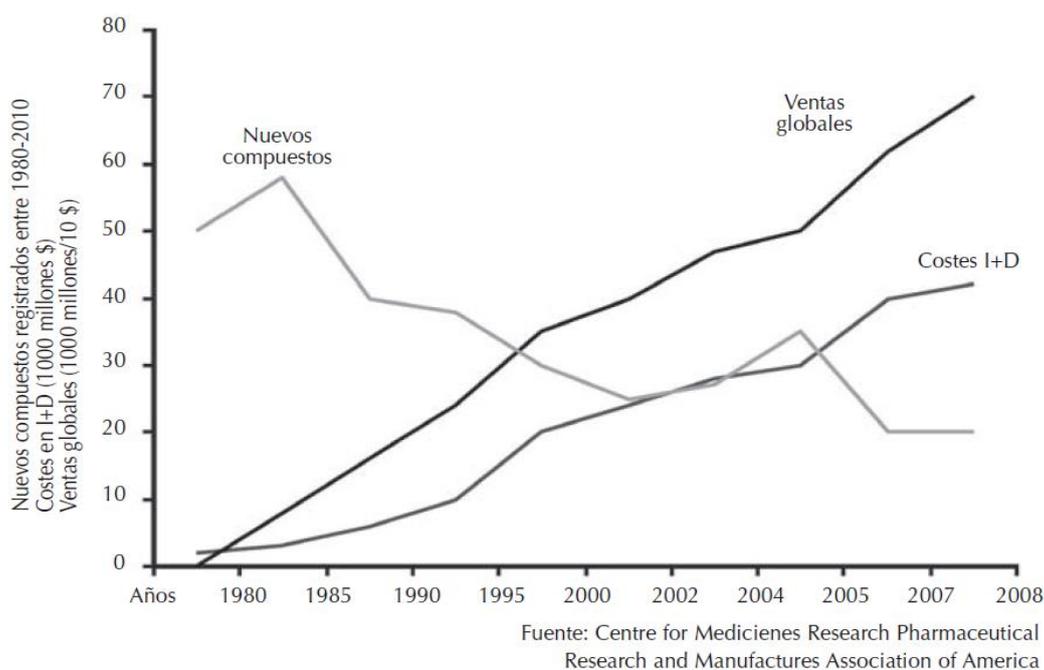


Figura 1

Gastos en investigación y desarrollo I+D, ventas y nuevos registros de fármacos entre 1980 y 2010 (San Román, 2013)

Inicialmente, el proceso de descubrimiento de un nuevo fármaco se realizaba de un **modo holístico** a partir del conocimiento de las propiedades biológicas de los productos naturales disponibles: una vez conocida la estructura del principio activo se proponía la síntesis de análogos y derivados con idea de mejorar su perfil farmacológico. Este procedimiento “clásico” resultaba generalmente lento, largo y costoso (tanto en medios humanos como técnicos) y los resultados eran, con frecuencia, pobres.

Con el advenimiento de una **aproximación racional** al proceso de descubrimiento de fármacos, los esfuerzos se han dirigido hacia la identificación de las dianas con las que los fármacos deben interactuar para producir su acción, de manera que la modulación de las mismas permitiera evitar la progresión de la enfermedad. Esta estrategia se ha visto facilitada por los grandes avances producidos en técnicas tales como las de ADN recombinante, que han permitido la producción de prácticamente cualquier diana en forma prácticamente pura y en las cantidades requeridas para su estudio. Paralelamente, la aparición de la **Química Combinatoria** y las técnicas de **cribado de alto rendimiento** (HTS, del inglés *High-Throughput Screening*) ha expandido enormemente el número de compuestos que se pueden analizar de manera simultánea en ensayos biológicos de una manera rápida y eficaz. Este método permite la identificación de cabezas de serie que, posteriormente, mediante síntesis química, son modificados para optimizar su interacción con la diana (Raghu y Murty, 2011).

En un principio, cuando se diseñaron los primeros fármacos mediante esta metodología, se tenían unas expectativas ilusionantes en cuanto a la cantidad de nuevos fármacos que se irían descubriendo. Y así fue durante los primeros años. A lo largo de los años, la cantidad de nuevos fármacos que sale al mercado se ha ido reduciendo, a pesar de los esfuerzos y del gasto en diseño y desarrollo para conseguirlos. Esto viene provocado porque los métodos empleados han ido perdiendo eficacia y por la falta de seguridad de los nuevos candidatos de fármacos. Hoy día, esta estrategia está siendo sustituida, o al menos complementada, con una aproximación que consiste en construir el cabeza de serie paso a paso, siendo guiado este proceso por diversos procedimientos, como veremos más adelante.

El diseño y desarrollo de fármacos es un proceso en varias etapas que van desde una hipótesis biológica hasta un nuevo fármaco aprobado. Estas etapas (Everett, 2015) son las siguientes (Figura 2):

1. Seleccionar la enfermedad que se va a intentar tratar.
2. Seleccionar la diana. Etapa crítica, ya que muchos proyectos fracasan en este punto, por lo que hay que elegirla correctamente. La razón de ello es que las dianas son impredecibles, por lo que siempre provocan efectos adversos en la fase 2, aun dando beneficio frente a la enfermedad estudiada. De ahí la importancia de esta fase, porque cuando son dianas de las cuales solo hay datos poco fiables, es decisión del equipo que la investiga, de seguir o no con el estudio de esa diana.
3. Descubrimiento del hit que se une a la diana.
4. Optimización del hit a cabeza de serie.
5. Optimización del cabeza de serie a fármaco. Estudios *in vitro* y en animales de experimentación.
6. Ensayos clínicos, toxicológicos y galénicos.
7. Lanzamiento del fármaco.
8. Apoyo post-lanzamiento.

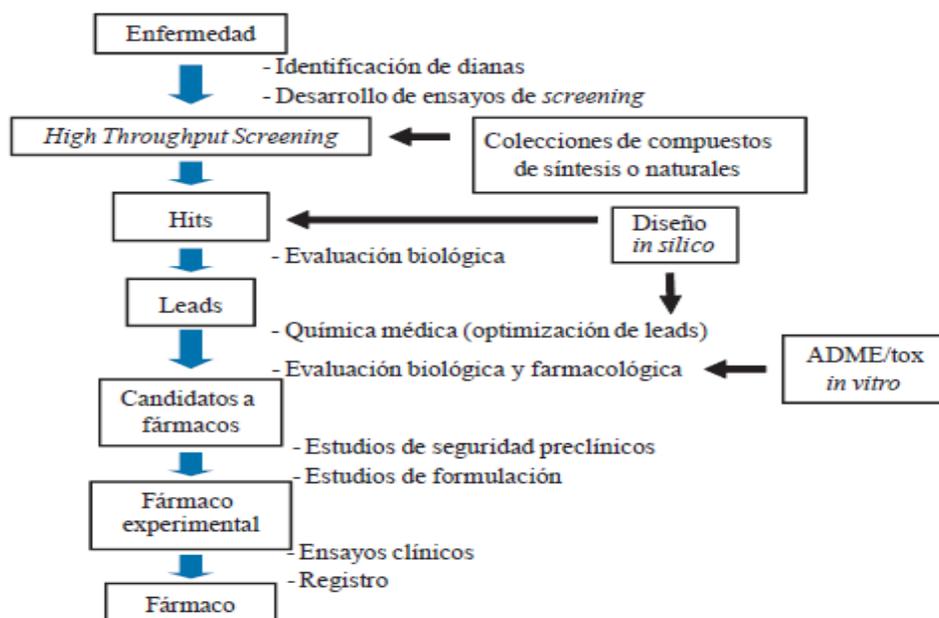


Figura 2

El proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Peláez, 2011)

Las interacciones ligando-proteína son determinantes en la actividad de un fármaco. El diseño de pequeños ligandos que causen un efecto deseado en la proteína diana es el enfoque más importante del descubrimiento y desarrollo de fármacos (Dean y cols., 1995). Uno de los parámetros a tener en cuenta en el diseño es la *druggability* de la diana (Owens, 2007), que es la capacidad de que una diana sea modulada por un ligando líder, ya que es crucial para determinar si un proyecto de descubrimiento de nuevos fármacos progresa desde el hit hasta el cabeza de serie. Sólo el 10% del genoma humano se considera como posible diana, y solo la mitad de éstas son relevantes para la enfermedad, por lo que es importante ser capaces de predecir hasta qué punto un posible objetivo puede ser considerado como diana en las etapas iniciales del proceso. Además se requieren unas propiedades fisicoquímicas y unas características ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) adecuadas para que el fármaco pueda ser desarrollado (Pellecchia y cols., 2008). Se buscan dianas con alta *druggability*, con un sitio de unión definido, un tamaño de hueco adecuado para un ligando pequeño y con cierta hidrofobicidad y flexibilidad. El sitio de unión puede y suele ser modificado tras la formación del complejo ligando-diana.

El diseño de moléculas cabezas de serie se realiza en la actualidad mayoritariamente por cribado de amplias quimiotecas de compuestos (HTS), como ya se ha comentado anteriormente. Este cribado está dirigido a seleccionar una serie de características comunes para que unan a un sitio activo de la diana determinada. Estas características pueden ser: pureza, reactividad, propiedades toxicológicas, peso molecular, solubilidad en agua o su facilidad para ser elaboradas. Por lo tanto, según estas características, se elige una u otra quimioteca para ser analizada y de esta manera se consigue reducir el número de compuestos a analizar. Además se eliminan aquellas moléculas que se sabe desde antes de comenzar que no van a tener éxito. Otra forma es utilizar quimiotecas de compuestos similares a fármacos conocidos para una diana concreta. En definitiva, lo que se quiere encontrar son ligandos pequeños, *hits*, con baja afinidad por macromoléculas. El peso molecular de estas dianas debe ser menor a 350KDa. Los *hits* también deben tener una solubilidad razonable, ya que a partir de ellos, se quieren obtener cabezas de serie de alta afinidad y fáciles de

elaborar. Posteriormente, serán optimizados hasta conseguir un fármaco concreto de alta afinidad (Stockman y Dalvit, 2002).

Actualmente, este proceso ofrece un rendimiento pobre, ya que tiene una serie de problemas:

- No se identifican dianas fiables con *druggability* para fármacos de uso humano, o simplemente porque no se pueden unir moléculas pequeñas a las dianas.
- Se consiguen réplicas de fármacos. Por ello hay que tener en cuenta las patentes y consultar base de datos para evitarlo. Trabajar con hits y cabezas de serie novedosos sería otra solución.
- Los hits identificados no suelen ser de calidad, por lo que los cabezas de serie posteriormente obtenidos carecen de propiedades fisicoquímicas adecuadas. Por ejemplo, un cabeza de serie grande y lipófilo tiene baja biodisponibilidad oral, por mucha potencia que tenga como ligando para una diana concreta.

Para solucionar este último inconveniente, actualmente, las industrias utilizan como base cabezas de serie de bajo PM, ya que así hay mayores posibilidades de obtener un fármaco tras la optimización. Esta se realiza con una monitorización de alto rendimiento del ADME. Se suelen buscar cabezas de serie que cumplan la Regla del 5 de Lipinski (Lipinski y cols., 1997), con el fin de obtener un líder con alta potencia, específico, con buena solubilidad en agua, con estructura sencilla y que no tenga grupos reactivos (Peláez, 2011). Aplicar esta regla, permite la filtración de las bases de datos y reducir el número de hits que realmente tienen utilidad, ya que en principio, el número de fármacos potenciales que se tendrían que escanear es enorme (Hajduk, 2006).

La identificación de la estructura del cabeza de serie se puede hacer por diferentes métodos:

- Identificación a partir de fármacos existentes, ya sea que tengan efecto para la misma enfermedad que la estudiada o que se utilicen para otras enfermedades con el fin de conseguir el mismo objetivo.
- Identificación tras analizar el complejo diana-ligando. Una vez que se analiza el complejo, la estructura del ligando se puede alterar o mantener, con el fin de obtener la mejor estructura para la estabilidad del complejo.
- Identificación por medio de síntesis combinatoria.
- Diseño virtual por ordenador. A partir de las estructuras conocidas de ligandos que están almacenadas en base de datos, se hacen modelados moleculares y se predice una estructura que pueda tener alta afinidad. Permiten realizar cribados y ensayos sin utilizar muestras reales. Ayudan a entender el mecanismo de acción de fármacos y mejoran su efecto terapéutico. Ya se han diseñado varios fármacos frente al SIDA con éxito.
- Obtenerlos por azar. Un ejemplo es que gracias al descubrimiento fortuito de la acción transportadora de la biotina, se han desarrollado fármacos a partir del ácido fólico, que es un ligando óptimo y selectivo frente a algunos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias (Low y cols., 2008).
- Identificación por RMN. A partir del análisis de los espectros obtenidos se pueden optimizar los cabezas de serie como veremos a continuación.

4.3. Utilización de la RMN en el Diseño de Fármacos

La RMN es una herramienta poderosa ya que permite identificar a cabezas de serie con bajo peso molecular y baja afinidad, pero que tienen un alto potencial para convertirse en ligandos de alta afinidad tras la optimización. Utiliza una “sinergia” entre química combinatoria, química medicinal, cribado de alto rendimiento (HTS), diseño de fármacos basado en la estructura, y genómica (Stockman y Dalvit, 2002).

Durante las tres últimas décadas, después del establecimiento firme de la espectroscopia de RMN de alta resolución en líquidos como la herramienta esencial para caracterizar la constitución molecular y la conformación de moléculas orgánicas

pequeñas, las contribuciones de la RMN al diseño y desarrollo de fármacos se han ampliado para abarcar otros aspectos importantes. Estos incluyen la caracterización de la estructura y la dinámica de proteínas solubles de tamaño medio y de ácidos nucleicos, y de sus complejos con moléculas pequeñas, así como la identificación y caracterización de la unión reversible de ligandos pequeños de afinidad débil a las macromoléculas. En este sentido, la RMN se ha convertido en una herramienta fundamental en el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que se utiliza en casi todas las etapas del mismo y permite la comprensión completa de las propiedades de las moléculas y de su comportamiento (Everett, 2015).

El proceso de diseño de un fármaco suele durar varios años. Comienza con la identificación del gen que expresa la proteína diana. La estructura 3D de esta diana se determina por medio de RMN (RMN macromolecular). A partir de aquí, se realizan escaneos por RMN de pequeñas moléculas, hits, y se diseñan compuestos que interaccionen con la diana estudiada. Más tarde se sintetizan cabezas de serie a partir de los hits y se cuantifica la relación unión/actividad *in vitro*. Si los resultados son favorables, se continúa con los ensayos *in vivo* y se puede observar su comportamiento gracias a la RMN *in vivo*. Este es un proceso cíclico (Figura 3), que se repite hasta encontrar compuestos lo suficientemente potentes para interaccionar a baja concentración con la diana estudiada. Una vez que obtenemos un candidato concreto a fármaco, se pasa a los ensayos preclínicos en animales, y finalmente, a los ensayos clínicos en diferentes grupos de personas. Estos 2 últimos pasos transcurren durante bastantes años y son los definitivos, ya que muchos de los posibles fármacos que se seleccionan son desechados en estas etapas y no llegan a comercializarse (Larson, 2012).

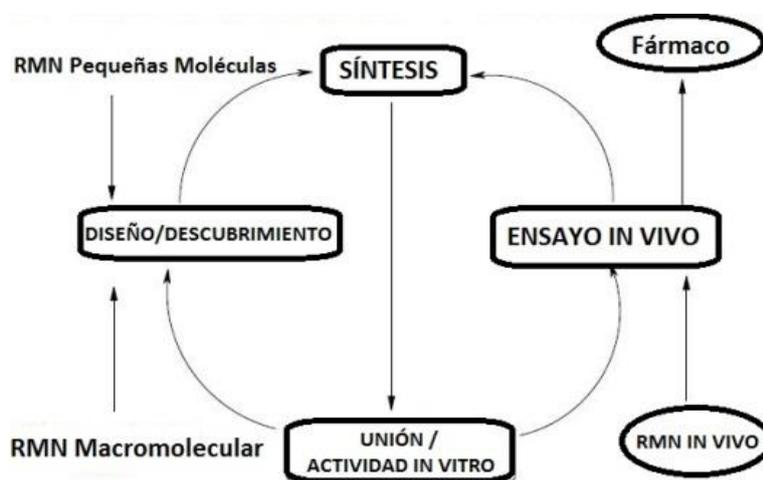


Figura 3

Esquema del proceso de desarrollo de fármacos usando RMN (Upmanyu y cols., 2007)

Las ventajas que ofrece la aplicación de la espectroscopía RMN al diseño de fármacos son numerosas (Pellecchia y cols., 2008):

- Permite identificar dianas sin necesidad de conocer su función,
- Permite obtener una información rápida sobre el sitio de unión, la distancia entre proteína-ligando y el modo de unión,
- Es un método muy robusto, fiable y reproducible, que se puede utilizar a lo largo de todo el proceso de diseño de fármacos, al tener diversas aplicaciones,
- Permite seleccionar moléculas con alta potencia, que tengan situaciones óptimas de unión, es decir, situaciones que contribuyan a una alta entalpía de unión. Por ello, fármacos que tengan alta libertad conformacional o que prefieran adoptar conformaciones distintas a la conformación de unión, no son buenas moléculas, ya que tienen baja entalpía de unión. Otras técnicas no obtienen moléculas de alta potencia con la fiabilidad que las consigue la RMN.

Los métodos actuales de RMN capaces de identificar y caracterizar la unión de moléculas pequeñas a una macromolécula se encuadran en dos categorías principales, dependiendo de las señales observadas:

1. Experimentos que detectan las señales del ligando y
2. Experimentos que detectan las señales del receptor.

Los métodos basados en la detección de las señales del ligando hacen uso frecuentemente de la espectroscopia RMN de ^1H y ^{13}C , aunque los espectros de ^{19}F y ^{31}P también se están utilizando en la industria farmacéutica. Por el contrario, generalmente los métodos basados en la detección de las señales del receptor suelen requerir la producción de proteína marcada isotópicamente y la adquisición de espectros 2D de correlación heteronuclear para monitorear los cambios de los desplazamientos químicos del receptor tras la unión del ligando. Estos últimos métodos están limitados a dianas con pesos moleculares menores de unos 30-40 KDa (a menos que se utilice la perdeuteración), aunque son más robustos que los primeros ya que permiten identificar los ligandos reales, incluso los que se unen de manera

irreversible, y permiten revelar información estructural crucial sobre el lugar de unión del receptor (Campos-Oliva, 2011).

Algunas de estas aproximaciones son más adecuadas para los métodos de screening y/o la validación de hits a partir de HTS (Tabla 1), mientras que otros son usados para guiar la optimización de hits en compuestos cabeza de serie más potentes y selectivos (Tabla 2) (Pellecchia y cols, 2008).

Tabla 1
Métodos de RMN para el screening de compuestos y/o validación de hits*

| Aproximación | Señal observada | Uso | Descripción |
|---|-----------------|---|--|
| Mapeo del desplazamiento químico | Receptor | Screening primario Validación de hit Lugar de unión | Identifica compuestos que se unen a la diana y modifican sus δ |
| STD | Ligando | Screening primario Validación de hit | Identifica compuestos que se unen débilmente |
| WaterLOGSY | Ligando | Screening primario | Identifica compuestos que se unen usando NOEs mediados por el agua |
| SLAPSTIC | Ligando | Screening primario | Detección de fragmentos que se unen. Muy sensible |
| TINS | Ligando | Screening primario Validación de hit | Identifica compuestos que se unen frente a dianas inmovilizadas |
| Relajación T_1 y T_2 | Ligando | Screening primario Validación de hit | Permite la estimación de la afinidad |
| NOE de transferencia | Ligando | Validación de hit Conformación ligandos flexibles | Permite determinar la conformación bioactiva del ligando |
| Medidas de Difusión | Ligando | Screening primario Validación de hit | Mide la diferencia en velocidades de difusión para ligandos en el estado unido frente al libre |

* NOE: nuclear Overhauser effect; SLAPSTIC: spin labels attached to protein side chains as a tool to identify interacting compounds; STD: saturation transfer difference; TINS: target immobilized NMR screening; T_1 y T_2 : tiempos de relajación longitudinal y transversal, respectivamente; waterLOGSY: water-ligand observed via gradient spectroscopy.

Tabla 2

Métodos de RMN para la optimización de hit a cabeza de serie*

| Aproximación | Señal observada | Uso | Descripción |
|-------------------------------|---------------------|---|---|
| SAR by NMR | Ligando Receptor | Información estructural FBDD Screening Optimización del ligando | Diseño de ligandos bidentados |
| SAR by ILOEs | Ligando-ligando | FBDD Screening Optimización del ligando | Detección sensible de fragmentos y compuestos que interaccionan débilmente |
| Pharmacophore by ILOEs | Ligando-ligando | FBDD Screening Optimización del ligando | Detecta interacciones ligando-ligando mediadas por proteína. Búsqueda basada en el farmacóforo |
| INPHARMA | Ligando-ligando | Caracterización de compuestos | Detecta interacciones ligando-ligando mediadas por proteína (competición por el mismo lugar de unión) |

* FBDD: fragment based drug design; ILOE: interligand nuclear Overhauser effect; INPHARMA: interligand NOEs para mapeo del farmacóforo; SAR: structure-activity relationship.

Entre los primeros métodos, quizás el más robusto e interesante sea el mapeo del desplazamiento químico de las señales de la diana, mientras que entre los segundos, es el denominado SAR by NMR el que se considera más potente como herramienta en el diseño de fármacos basado en fragmentos, el cual se tratará más adelante. Se presenta a continuación un breve resumen del primero de los métodos mencionados.

4.3.1. Importancia del mapeo de desplazamiento químico en el diseño de fármacos

El experimento de RMN más comúnmente utilizado en este método es la heterocorrelación bidimensional protón/nitrógeno-15, denominado ^1H - ^{15}N 2D HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), de proteínas marcadas con ^{15}N . Dado que este experimento observa las señales NH de los grupos amida, químicamente únicos en el contexto de la estructura terciaria de la proteína, permite el seguimiento de las interacciones en una manera específica del residuo que se modifica (Dias y Ciulli, 2014).

La interacción entre un determinado ligando y una posible proteína diana se puede poner de manifiesto gracias a la correlación de los cambios que se producen en

el desplazamiento químico de algunas señales NH de la diana, que se pueden observar en los espectros ^1H - ^{15}N 2D HSQC cuando el ligando se une al sitio activo de la diana, comparándose con el espectro que origina esa diana sin la adición del ligando. Por lo tanto, un mapeo de los desplazamientos químicos permite identificar de forma inequívoca la localización de los sitios de unión de un ligando a una proteína diana.

Este mapeo puede ser convencional, cuando se compara el espectro de la proteína con el del complejo proteína-ligando, o mapeo diferencial, comparando 2 espectros con una misma proteína unida en cada espectro a 2 ligandos distintos y detectando las diferencias que existen en los desplazamientos químicos de ambos. Para considerar una perturbación o cambio en el desplazamiento químico como significativa, la diferencia entre el pico en ausencia de ligando y el pico con el ligando unido, debe ser mayor que 0,1 ppm (Ecuación 1) (Stockman y Dalvit, 2002). Un inconveniente del método es que se requiere una alta concentración de proteína purificada para realizar este proceso (Larson, 2012). No obstante, se puede determinar la fuerza de la interacción ligando-proteína gracias a K_{eq} (constante de equilibrio del complejo formado) o K_D (constante de disociación) (Zou y Sadler, 2015).

$$\Delta\delta = \sqrt{\left[\left(\delta(^1\text{H}, \text{ppm})_{\text{libre}} - \delta(^1\text{H}, \text{ppm})_{\text{unido}} \right)^2 + 0,04 \times \left(\delta(^{15}\text{N}, \text{ppm})_{\text{libre}} - \delta(^{15}\text{N}, \text{ppm})_{\text{unido}} \right)^2 \right]}$$

Ecuación 1

Cálculo de la diferencia en el desplazamiento químico entre la señal producida en ausencia de ligando y la de en presencia del ligando. Si $\Delta\delta > 0,1 \text{ ppm}$, se considera cambio significativo (Stockman y Dalvit, 2002).

La K_D de un complejo ligado-proteína es la correlación de concentración de fracción de ligando que se une formando complejo frente a la concentración total de ligando presente. Es la constante de disociación del complejo, que indica el grado de afinidad del ligando por la proteína. Según el valor de K_D , la unión puede ser:

- $K_D < 1\mu\text{M} \Rightarrow$ Unión fuerte,
- $K_D \approx 1\mu\text{M} \Rightarrow$ Unión moderada,
- $K_D > 10\mu\text{M} \Rightarrow$ Unión débil,
- $K_D > 1\text{M} \Rightarrow$ No formación de complejo, no se observan efectos en RMN.

Para ligandos de unión fuerte es despreciable la concentración de proteína y ligando libre, por lo que se puede asumir que por completo están en estado de unión, por lo que el complejo se comporta como una molécula estable simple. Esto conlleva a que en el espectro no se aprecien señales de especies libres o de intercambios.

Para aquellos en los que la unión es moderada, coexisten especies libres de proteínas y ligandos y de ambas formando complejo. Dependiendo de la estabilidad del complejo, el intercambio podrá afectar al espectro o no. Si la $K_D = 1\text{mM}$, el 50% estarán en estado libre y el otro formando complejo, por lo que en esta situación es difícil analizar el espectro y es por ello por lo que se suele dirigir hacia la formación de complejo añadiendo exceso de ligando. Las señales de exceso pueden ser eliminadas del espectro, pero la solubilidad debe ser alta. Con esto se consiguen interacciones moderadamente fuertes que llevan a un equilibrio entre los estados libres y unidos de los compuestos, lo que permite obtener información estructural.

Para uniones débiles, no es posible forzar este estado, ya que sólo existe una pequeña cantidad en estado complejado, por lo que es imposible determinar la estructura tridimensional del complejo. En cambio, la RMN permite obtener cambios conformacionales que se producen tras la formación del complejo y las regiones que están implicadas en la unión.

Hay que tener en cuenta que la unión de otra molécula a una región cercana al sitio activo estudiado, puede perturbar los espines de los núcleos que se encuentren en el sitio de unión, sin necesidad de que la estructura cambie. En el caso de que así fuera y se produzca la reordenación, no se podría localizar el sitio de unión por medio de la RMN, aunque son pocos los casos en los que esto ocurre (Holzgrabe y cols., 1999). Según como se observe el cambio experimental en el desplazamiento químico, se puede cuantificar la afinidad de unión según la intensidad de las proteínas libres o unidas. Se diferencia entre:

- Intercambio lento: los ligandos tienen alta afinidad de unión, $K_D < 1\ \mu\text{M}$. Las señales de los ligandos aumentan de forma gradual a medida que se forma el complejo. Esto significa, que a medida que va desapareciendo del estado libre, aumenta de forma concomitante la forma unida, y por tanto, su

intensidad. Esto ocurre cuando la diferencia en valor absoluto de los cambios del desplazamiento químico entre las formas libres y unidas es mucho mayor que la constante de intercambio (k_{exc}): $|\delta_{libre} - \delta_{unido}| \gg k_{exc}$ (Figura 4, abajo, residuos 230 y 250).

- **Intercambio rápido:** los ligandos tienen baja afinidad de unión, $k_D > 10 \mu M$. Los cambios en el desplazamiento químico se producen de forma no lineal con la cantidad de proteína libre respecto a la que se encuentra en la forma de complejo. Se puede observar cuando la diferencia en el valor absoluto de los desplazamientos químicos en estado libre y en forma unida, es menor que k_{exc} : $|\delta_{libre} - \delta_{unido}| < k_{exc}$ (Figura 4, arriba, residuos 203 y 214).
- **Intercambio intermedio:** $|\delta_{libre} - \delta_{unido}| \approx k_{exc}$. (Figura 4, abajo, residuo 158).

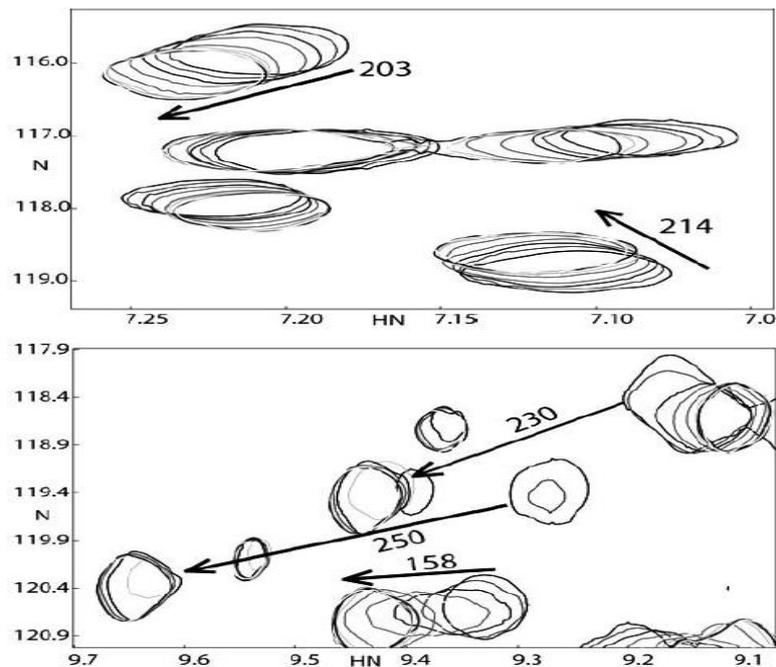


Figura 4

Desplazamientos de las señales amida de una proteína tras la unión de un ligando. Los dos paneles muestran regiones representativas con la superposición de trece espectros $^1H-^{15}N$ 2D-HSQC de PCNA, una proteína humana trimérica de 98 KDa, perdeuterada y marcada con ^{15}N , registrados con cantidades crecientes de un ligando. Las flechas indican el movimiento durante la titración de cinco residuos amidas seleccionadas: Arriba, los residuos 203 y 214 sufren intercambio rápido. Abajo, los residuos 230 y 250 sufren intercambio lento, mientras que el residuo 158 presenta intercambio intermedio (Campos-Olivas, 2011)

Como hemos visto anteriormente, cambios significativos en el desplazamiento químico entre el espectro de la proteína libre y cuando tiene unido un ligando, permiten obtener un mapeo con información estructural sobre el sitio de unión, e identificar y cuantificar la afinidad de unión de compuestos hits. La afinidad de unión depende de las propiedades termodinámicas y cinéticas de los compuestos. El mapeo del desplazamiento químico permite obtener información estructural, tanto de la diana como de los posibles líderes que se puedan unir, e información dinámica, sobre la flexibilidad del complejo y de los compuestos libres para conocer de forma más precisa las interacciones. Por ello, también puede ser utilizada para validar nuevos hit obtenidos por HTS y para guiar la optimización de ellos con el fin de que sean potentes y selectivos para la diana estudiada. En la identificación del cabeza de serie, se buscan hits con baja afinidad de unión, que en los espectros se aprecie intercambio rápido, lo que significa que las diferencias entre los cambios de desplazamiento químico son pequeñas. La afinidad para 2 ligandos que unen en el mismo sitio de unión puede estimarse comparando la magnitud relativa de los cambios en el desplazamiento químico. Después se llevará a cabo la optimización del cabeza de serie y con ello, el aumento de la afinidad del futuro fármaco por la diana.

Para que una molécula pueda ser analizada por RMN, debe cumplir una serie de requisitos. La muestra debe tener un pH ajustado, por lo que es necesario utilizar solución tampón fosfato, ya que no puede haber cambios en el pH, que podrían provocar cambios en el desplazamiento químico de las muestras, lo que conllevaría complicaciones en el análisis del espectro. En el caso de las dianas farmacológicas, no deben muy ser grandes, con un peso molecular no mayor de 40 KDa. Pero en la práctica pocas tienen ese tamaño, por lo que se puede llevar a cabo una perdeuteración (sustituir ^1H por ^2H) de la muestra para aumentar el rango de PM hasta los 100 KDa. En todo caso, se suelen utilizar proteínas marcadas isotópicamente con ^{15}N o ^{13}C para reducir la complejidad de los espectros 2D ^1H - ^{15}N o ^1H - ^{13}C (Pellecchia y cols., 2008). Sin embargo, este tipo de etiquetado aumenta enormemente el coste del método. Por otro lado, los etiquetados solo se han conseguido en sistemas bacterianos, por lo que es otra limitación (Huth y cols., 2005).

Se pueden analizar de 100 a 200 espectros de heterocorrelación 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ en un día, lo que se traduce a unos 1.000 compuestos analizados a lo largo del día. Una vez que se encuentran diferencias en el desplazamiento químico, se escanean los compuestos por separado para identificar qué compuestos son los responsables, los que se unen a la diana. La K_D se puede conseguir a partir de una valoración de un ligando con una solución de proteína, al medir los cambios en el desplazamiento químico en función de la proporción proteína/ligando. Sin embargo, con una técnica de alto rendimiento, utilizando criosondas, se puede llegar a escanear más de 100.000 compuestos por semana.

Uno de los problemas de este método para el diseño de fármacos es que la cantidad de proteína necesaria es relativamente alta, por lo que debe utilizarse de forma eficiente. Es por ello por lo que las muestras de ligandos van agrupadas en quimiotecas de mezclas de un gran número de compuestos (Pellecchia y cols., 2008). Estas quimiotecas de gran tamaño son un problema, ya que un mayor número de compuestos a analizar conlleva un mayor gasto de recursos. Este problema se puede solucionar eliminando compuestos que son demasiado similares de las bibliotecas, además de aquellos que no proporcionan información. Que estas moléculas desechadas en un primer momento no pasen por el primer cribado no tiene repercusión, ya que en las futuras optimizaciones se pueden llegar a obtener para conseguir un ligando (Everett, 2015). Otra posible solución es la inmovilización de las proteínas diana, que se pueden fijar a un sustrato y realizar el cribado de forma que los compuestos se van añadiendo y generando la señal correspondiente. Entre cada quimioteca analizada, la proteína se lava, eliminando los compuestos, y pudiendo ser reutilizada. En esta alternativa se utiliza una sonda de flujo dual para compensar las incertidumbres que surgen cuando las señales de las sucesivas muestras van recogiendo.

4.3.2. La RMN en metabolómica para el diseño de fármacos

La utilización de RMN en metabolómica también permite descubrir y diseñar nuevos fármacos. La RMN ayuda a conocer qué metabolitos son responsables de una

enfermedad, con el fin de sintetizar hit o líderes que se parezcan a ellos para el tratamiento de la enfermedad. También identifica aquellos metabolitos que son generados por los fármacos, para rediseñarlos en busca de reducir su toxicidad y aumentar su actividad (Pellecchia y cols., 2008).

4.4. Método SAR by NMR

En las últimas décadas, el diseño de fármacos basado en fragmentos (FBDD, del inglés *Fragment Based Drug Design*), ha emergido como una aproximación más racional que el método HTS (*High Throughput Screening*), ya comentado en el apartado 4.2, al proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. En este nuevo enfoque, un compuesto es construido paso a paso dentro del lugar de unión de la diana, basándose para ello en la identificación de pequeños fragmentos químicos, que pueden unirse de manera independiente débilmente a la diana, pero que tras su combinación mediante el espaciador adecuado, produce una molécula cabeza de serie con alta afinidad por la misma.

Este nuevo método FBDD se puede comparar ventajosamente con el screening HTS: en el método HTS las quimiotecas que se utilizan contienen hasta un millón de compuestos con pesos moleculares en torno a 500 Da y se buscan afinidades de unión (K_D) en la escala nanomolar. En contraste, en las primeras fases del proceso FBDD, se utilizan quimiotecas con sólo unos pocos miles de moléculas pequeñas, de gran diversidad estructural, con pesos moleculares de unos 150-300 Da (denominadas “fragmentos”) y se considera suficiente conseguir ligandos con una afinidad en la escala milimolar.

Similarmente a la conocida regla del 5 de Lipinski, se ha propuesto la regla del 3 (Congreve y cols., 2003) para guiar el diseño de estas quimiotecas de fragmentos, con los siguientes principios:

1. Peso molecular ≤ 300 Da,
2. LogP cercano a 3,
3. Donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno en número ≤ 3 ,

4. Enlaces con giro libre ≤ 3 , y
5. Alta solubilidad en agua.

Muchas compañías farmacéuticas y laboratorios de biotecnología han construido sus propias quimiotecas de fragmentos en los últimos años, como Sanofi y AstraZeneca o Apointech.

El factor clave en esta aproximación FBDD al diseño de fármacos es disponer de un método adecuado para detectar estas uniones tan débiles. Y es aquí donde entra en juego la RMN: la primera descripción de FBDD fue publicada por un grupo de los laboratorios Abbott en 1996, haciendo uso de espectros ^1H - ^{15}N HSQC de una proteína marcada isotópicamente (Shuker y cols., 1996). Esta estrategia recibió desde ese primer momento el nombre de **SAR by NMR** (*Structure-Activity Relationship by Nuclear Magnetic Resonance*).

Actualmente, compañías como Abbott y Evotec utilizan este método para el diseño de fármacos, a partir de la información de otros fármacos anteriores, o bien, diseñándolos desde cero, todo ello gracias a la diversa información que se puede obtener por medio de la espectroscopía RMN. Consta de los siguientes pasos (Huth y cols., 2005) (Figura 5):

1) Identificación de la diana

Identificar la diana, que es responsable de una enfermedad, con la cual hay que interactuar.

2) Conocer el sitio de unión

Detectar el sitio de unión del ligando en la superficie de la proteína diana. Hay relativamente pocas regiones en la superficie que intervienen en la mayoría de la energía libre que hay en la unión. Por lo que el resto de uniones solo sirven para modular la especificidad.

3) Cabezas de serie de primer sitio

Identificación de cabezas de serie con baja afinidad, por medio de un cribado de quimiotecas. Se utiliza la RMN bidimensional $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC. Se denominan

cabezas de serie de primer sitio. Para este cribado, a una muestra de proteína se le añade una mezcla de 10-30 compuestos con posibilidad de unirse. Una vez que se aprecian cambios en el desplazamiento químico de alguno/s de los grupos NH de la diana, se lleva a cabo la desconvolución de la mezcla de ligandos para concretar cuál o cuáles son los responsables de esas perturbaciones. Si no se aprecian cambios en el desplazamiento, se descartan todos los compuestos de la mezcla de fragmentos que se utilizó.

4) Optimización del ligando de primer sitio

Optimización de cabezas de serie por modificación química. Se persigue aumentar la afinidad y mejorar las propiedades fisicoquímicas, con el fin de obtener un ligando de alta afinidad.

5) Cabezas de serie de segundo sitio

Identificación de uniones con otros ligandos, en presencia de cantidades saturadas del primer ligando ya optimizado. También se utiliza la RMN 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC. Debe haber cantidades saturadas del primer ligando para que se ocupe el primer sitio, y con ello evitar que los compuestos que se utilizan para detectar el otro posible sitio de unión se agrupen en el primer sitio. Se deben utilizar los ligandos de primer sitio una vez optimizados, que además de ser de mayor calidad, tienen mayor afinidad por la diana, y evitar que haya falsos positivos por unión competitiva. En cambio, el tamaño del primer ligando ya optimizado debe ser pequeño, para evitar la oclusión del segundo sitio de unión.

Por otro lado, la unión del primer ligando puede alterar significativamente la energía potencial del sitio, además de permitir la identificación de mayor diversidad de cabezas de serie para el segundo sitio. Esta alteración suele ser favorable, de cooperación, por interacciones potenciales entre ligandos. Si es un cabeza de serie de unión simultánea al de primer sitio, en el espectro se observarán nuevas señales provocadas por la unión del segundo cabeza de serie y sus señales no se verán afectadas por el primer ligando. En cambio,

cuando ambos ligandos se unen al mismo sitio activo, aparecen resonancias perturbadas por la competencia entre ellos.

Para diferenciar de manera inequívoca si el ligando es de uno u otro tipo se realizan valoraciones para cada cabeza de serie, sólo y en presencia del ligando de primer sitio. En el caso de una unión simultánea, la K_D es independiente en presencia del otro ligando, incluso puede aumentar su valor si es una unión cooperativa. Este caso sería bastante beneficioso para aumentar el potencial de unión del fármaco definitivo. En caso de que sea una unión competitiva, la afinidad de unión de un ligando se ve reducida en presencia del otro.

6) Optimización del ligando de segundo sitio

Si se localiza el otro lugar de unión, se trata de identificar el cabeza de serie que interacciona y optimizarlo. Los ligandos de segundo sitio son aquellos que ocupan los sitios de unión periféricos y próximos al lugar de unión del primer ligando, en presencia de éste.

7) Conexión

La unión simultánea de los dos ligandos permite obtener un ligando final de alta afinidad. Para ello se inmovilizan los dos ligandos en la posición óptima de interacción y se unen químicamente por un conector que mantenga la orientación y la distancia entre ellos. El fragmento de unión se obtiene empíricamente según la información estructural obtenida por RMN. Hay que procurar que no haya cambios en la orientación de los 2 ligandos, ya que provocaría la pérdida de potencia. Diseñarlo *de novo* no es práctico, por ello existe una selección de compuestos que se suelen utilizar para obtener buenos conectores, que son simples y que se pueden obtener fácilmente por síntesis química. Se puede modificar su longitud, su flexibilidad, etc., con el fin de unir los ligandos y que tengan máxima afinidad, por lo que tienen gran libertad conformacional, aunque pequeños cambios pueden provocar efectos significativos en la afinidad del compuesto final.

Se pueden hacer simulaciones sencillas, que permiten un modelado estructural del conector más fácil, utilizando paquetes de software, como por ejemplo, LUDI, ALLEGROW o QXP. Cambios y estructuras comunes que se suelen utilizar en la formación de los conectores son los siguientes:

- a. Inclusión de átomos de O/S para mejorar la flexibilidad,
- b. Evitar conectores alifáticos, ya que disminuyen la diversidad conformacional,
- c. Para conectores de 3 átomos, el hidroxietil (CCO), es el que ofrece mayor rango de diversidad conformacional. En cambio, de los utilizados, el propil (CCC) es el que menos ofrece,
- d. Para conectores de 4 átomos, metiletiltioéter (CCSC) es el que ofrece mayor rango de diversidad conformacional, seguido de hidroxipropil (CCCO). La acilsulfonamida (ASULF) y el butil (CCCC) son los que menos ofrecen,
- e. Los dobles enlaces ayudan a tener una mayor variedad al tener menor impedimento estérico, aunque por otro lado pierde rotación por el enlace. Una vez que se produce la conexión con éxito, se refina y rigidiza según la información estructural del ligando.

El objetivo de la conexión de los fragmentos es aprovechar la gran afinidad que pueden llegar a tener los compuestos bidentados y se consigue aumentando las interacciones entre proteína-ligando, es decir, aumentando su entalpía, y evitando la pérdida de entropía en posibles traslaciones y rotaciones que puedan ocurrir tras la unión.

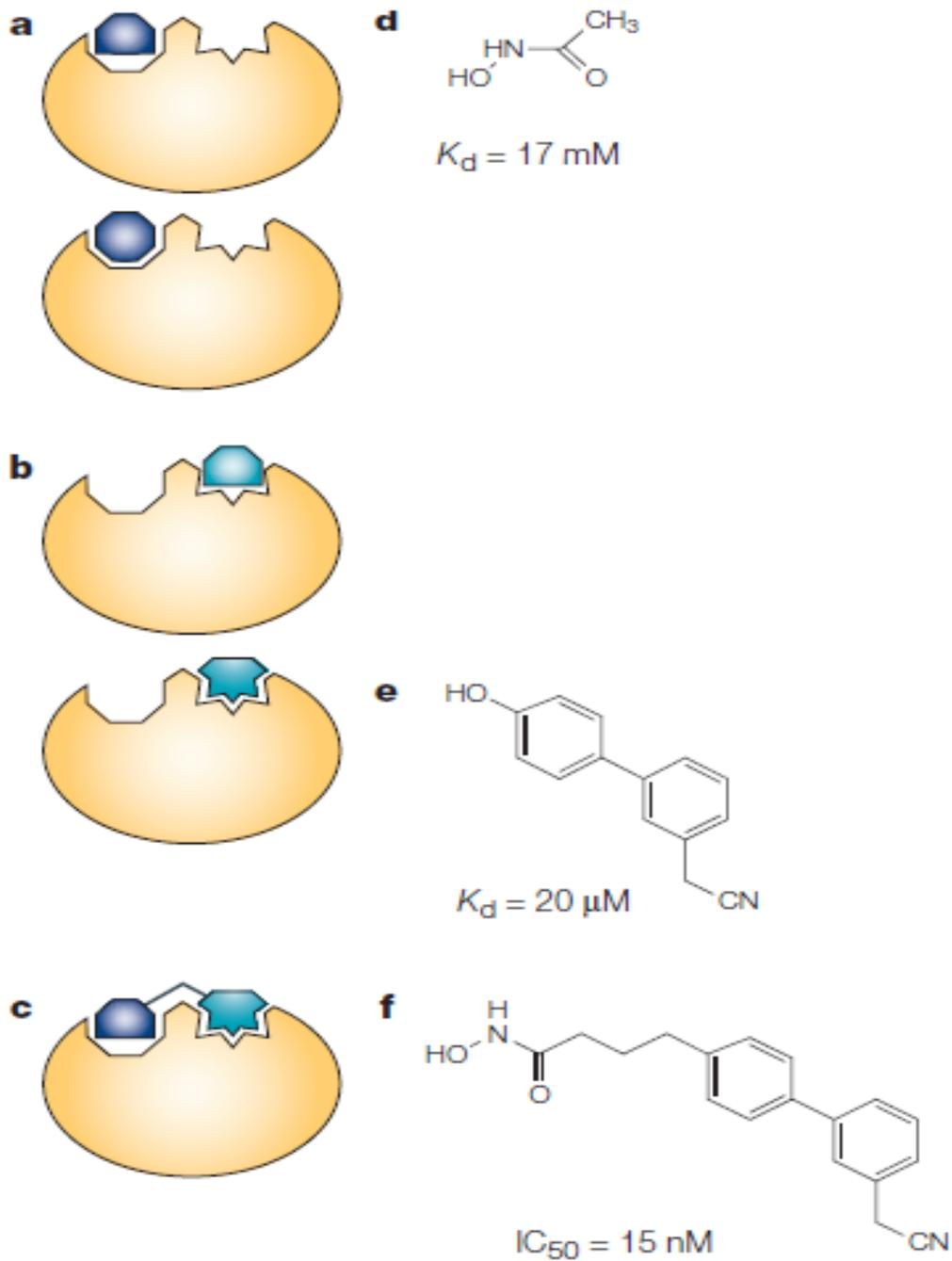


Figura 5. SAR by NMR

a-c) Se aprecian los pasos para obtener un ligando a partir de este método. **d-f)** Ejemplo de fármaco diseñado a partir de este método, un inhibidor de la estromelisina (Pellecchia y cols., 2002)

4.4.1. Ventajas del método SAR by NMR

Aunque tiene un coste mayor que otros métodos de cribado, este método ofrece muchas ventajas (Huth y cols., 2005; Holzgrabe y cols., 1999):

- Tiene un alto rendimiento. Esto se debe a la alta sensibilidad al utilizarse el espectro bidimensional $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC y la fácil evaluación de compuestos, ya que se pueden llegar a analizar unos 1.000 compuestos al día,
- Los cambios apreciados son la evidencia más determinante de que se produce una unión bien definida y específica,
- Tiene alta sensibilidad para ligandos de baja afinidad,
- Permite la cuantificación fácil de K_D ,
- Es una técnica inmune a falsos positivos que pueden producirse por uniones no específicas,
- Si aparecen artefactos, pueden ser detectados fácilmente,
- Un cambio en el desplazamiento químico producido por la unión de un ligando permite detectar que hay unión, identificar el sitio de unión y orientar al ligando en la diana. Es decir, que ofrece mucha información y que esta puede ser utilizada como huella digital,
- Aumenta el espacio químico exponencialmente al tamaño de la quimioteca, por lo que se pueden escanear una mayor diversidad de compuestos en menos tiempo,
- La edición espectral es capaz de eliminar señales del ligando. Por ello, se pueden realizar experimentos a altas concentraciones de un ligando, como por ejemplo, al detectar el segundo cabeza de serie en presencia de cantidad saturada de ligando de primer sitio,
- Para mejorar su rendimiento se pueden utilizar criosondas o etiquetado ^{13}C de metilos de aminoácidos, por lo que, actualmente, es de aplicación rutinaria sobre dianas con un peso molecular mayor incluso de 40 KDa.

4.4.2. Ejemplos de aplicación del método SAR by NMR

Uno de los primeros fármacos sintetizados por este método fue un inhibidor del receptor FK506, que es el encargado de la activación de las células T. Una de las

utilidades de FKBP, que fue como se llamó a este inmunosupresor, es la de suprimir las reacciones típicas que se dan como rechazo tras un trasplante. Como ligando de primer sitio de unión se identificó un derivado del ácido pipecolínico, con una $K_D=2 \mu\text{M}$. En condiciones saturadas de éste, se obtuvo que un derivado de la benzamilida, con $K_D=0,8 \mu\text{M}$, se unía a un sitio de unión próximo al del primer ligando. Se hizo un muestreo de ligandos similares a este último obtenido, que tuviera mayor afinidad por FK506. Se eligió un compuesto con $K_D=100 \mu\text{M}$ como segundo ligando. Para desarrollar el conector entre ambos, se encontraron cinco con buena afinidad por el receptor. Finalmente se eligió uno de ellos y se generó el compuesto FKBP de alta afinidad con $K_D= 19 \text{ mM}$ (Shuker y cols., 1996).

Otro ejemplo de fármaco obtenido por SAR by NMR es un inhibidor de la estromelisin, una metaloproteasa que se asocia con inflamación en sujetos asintomáticos con factores de riesgo cardiovascular. Este fármaco actúa como inhibidor de artritis y de metástasis de tumores. En este caso, el ligando de primer sitio se escoge de antemano al ser una autoproteasa. Es ácido acetohidroxámico, con $K_D= 15 \text{ mM}$, ya que muchos inhibidores de las metaloproteasas contienen restos de este ácido. En condiciones de saturación de este ligando, se busca por RMN un segundo ligando. Es una búsqueda focalizada en compuestos hidrofóbicos, ya que se uniría a subsitios de este mismo tipo. Se eligen análogos de bifenilos, que presentan buena afinidad. Tras optimización de éste, se determina un conector de 2 C de longitud. Y con ello se obtiene el ligando bidentado definitivo, con $K_D=20 \text{ mM}$.

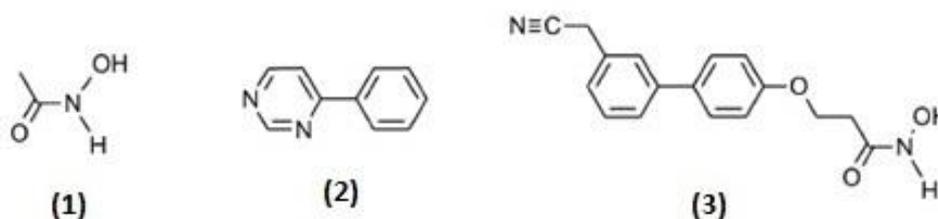


Figura 6

Ligandos obtenidos (1 y 2) por SAR by NMR y su posterior conexión (3), de un inhibidor de la enzima estromelisin (Stockman y Dalvit, 2002).

También se pueden identificar fármacos que interactúen con receptores acoplados a proteína G, como el GPR40. Este es un receptor de ácidos grasos de las células β -pancreáticas, que se encarga de aumentar la secreción de insulina cuando es activado. En caso de que no se secrete bien la insulina, siempre y cuando no sea por la afectación de las células β , se pueden sintetizar fármacos que actúan activando este receptor, a partir de ligandos que interactúen con esta diana (Bartoschek y cols., 2010).

Para finalizar, indicar que, dado que el proceso global de poner en el mercado un nuevo fármaco es cuestión de bastantes años como ya se comentó, todavía se tardará algún tiempo en ver los resultados netos de la aplicación de esta nueva aproximación al diseño de fármacos, pero se espera que en el futuro inmediato, más candidatos derivados de esta estrategia FBDD estarán comercialmente disponibles para beneficio de los pacientes (Ma y cols., 2016).

5. Conclusión

Debido a los grandes avances que se han realizado a lo largo de las últimas décadas, el proceso de descubrimiento y diseño de nuevos fármacos a partir de espectroscopía RMN ha vuelto a aumentar las probabilidades de encontrar y comercializar nuevos medicamentos. Aun así, el método no obtiene actualmente la misma gran cantidad de compuestos que cuando se desarrolló. En un principio, se observaron proteínas conocidas estructural o funcionalmente. Gracias a ello, se analizaron muchos ligandos y se asociaron a señales RMN, creando así bases de datos. El enfoque actual de esta práctica es el de obtener información de dianas consideradas sin *druggability*, sobre todo a través de los genes que las codifican, con el fin de sintetizar fármacos que interaccionen con ellas. También se utiliza para obtener nuevos fármacos que tengan mayor potencia sobre enfermedades graves, como puede ser el cáncer o el VIH.

El SAR by RMN, es el método más selectivo y con mayor rendimiento y sensibilidad de todos los que utilizan espectroscopía RMN. Por ello es el método más utilizado, de los que incluyen RMN, en la industria para el diseño de nuevos fármacos. El cribado de ligandos de baja afinidad para después optimizarlos y la formación de ligandos bidentados, de forma que se obtienen ligandos de alta afinidad y potencia por la diana, respaldan a este método.

Uno de los enfoques futuros de este método es la determinación de fármacos a partir de información genética de la proteína a la cual se unirá. Otro sería su papel en la metabolómica, desarrollando compuestos relacionados con metabolitos, ya sean para reducir el efecto de estos en caso de que sean perjudiciales para el organismo, o para sintetizar análogos a ellos cuando estos metabolitos provocan un efecto beneficioso en el organismo.

Por último, el desarrollo de nuevos espectros que analizan núcleos metálicos e inorgánicos, permite desarrollar más y mejores fármacos que contienen este tipo de núcleos, como el Pt en fármacos utilizados frente al cáncer.

6. Bibliografía

Bartoschek, S., Klabunde, T., Defossa, E., Dietrich, V., Stengelin, S., Griesinger, C., et al. Drug design for G-protein-coupled receptors by a ligand-based NMR method. *Angew Chem. Int. Ed.* 2010; 49(8):1426–9.

Campos-Olivas, R. NMR screening and hit validation in fragment based drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011; 11(1):43–67.

Cohen, N. (Editor). *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*, 1st Edition. Academic Press Ltd; 1996.

Congreve M., Carr R., Murray C., Jhoti H. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discov. Today*, 2003; 8, (19), 876–7.

Dean, P.M., Jolles, G., Newton, C.G. *New Perspectives in Drug Design*. Dean, P.M., Jolles, G., Newton CG, (Eds). San Diego: Academic Press Ltd; 1995.

Dias D.M., Ciulli, A. NMR approaches in structure-based lead discovery: Recent developments and new frontiers for targeting multi-protein complexes. *Progress Biophys. Mol. Biol.*, 2014; 116, 101-112.

Galbis, J.A. *Panorama actual de la Química Farmacéutica*. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2000.

Everett, J.R. Drug Discovery and Development: the Role of NMR. *eMagRes.* 2015; 4:137–50.

Hajduk, P.J. SAR by NMR: putting the pieces together. *Mol. Interv.* 2006; 6(5):266–72.

Holzgrabe, U., Wawer, I., Diehl, B. *NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis*. Weinheim (Alemania): Wiley-Vch; 1999.

Huth, J.R., Sun, C., Sauer, D.R., Hajduk, P.J. Utilization of NMR-derived fragment leads in drug design. *Methods Enzymol.* 2005; 394(1999):549–71.

Larson, R.S. (Ed). *Bioinformatics and Drug Discovery*, Second Edition. Vol. 910, Springer Science+Business Media. New York; 2012.

Lee, J.H., Okuno, Y., Cavagnero, S. Sensitivity enhancement in solution NMR: Emerging ideas and new frontiers. *J. Magn. Reson.* 2014; 241(1):18–31.

Leenders, J., Frédérick, M., de Tullio, P. Nuclear magnetic resonance: a key metabolomics platform in the drug discovery process. *Drug Discov. Today Technol.* 2015; 13:39–46.

Lipinski, C.A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997; 23, 3–25.

Low, P.S., Henne, W.A., Doorneweerd, D.D. Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and In ammatory Diseases. *Acc. Chem. Res.* 2008; 41(1):120–9.

Ma R., Wang P., Wu J., Ruan K. Process of Fragment-Based Lead Discovery—A Perspective from NMR. *Molecules*, 2016; 21, 854.

Mantle, M.D. NMR and MRI studies of drug delivery systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2013; 18(3):214–27.

Owens J. Determining druggability. *Nature Rev. Drug Discov.*, 2007; 6, 187.

Peláez, F. Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. *An. Quím.* 2011; 107(1):36–45.

Pellecchia, M., Bertini, I., Cowburn, D., Dalvit, C., Giralt, E., Jahnke, W., et al. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nature Rev. Drug Discov.* 2008; 7(9):738–45.

Pellecchia, M., Sem, D.S., Wüthrich, K. NMR in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1(3):211–9.

Raghu P. M. and Murty D. NMR-A Gate Way to Drug Discovery. In *Structure-Activity Relationship Studies in Drug Development by NMR Spectroscopy*. Atta-ur-Rahman and Choudhary M. Iqbal (Eds.), Bentham Science, 1-35. 2011

Ronconi, L., Sadler, P.J. Applications of heteronuclear NMR spectroscopy in biological and medicinal inorganic chemistry. *Coord. Chem. Rev.* 2008; 252(21-22):2239–77.

Sánchez Ferrando, F. Breve resumen histórico de la Resonancia Magnética Nuclear. Lección pronunciada en la escuela de verano "Curso avanzado de Resonancia Magnética Nuclear", organizado por el Grupo Especializado de RMN (GeRMN) de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ). Jaca (España). 2005. Obtenido de internet en abril de 2016: ([Lección 01: Historia de la RMN](#))

San Román Del Barrio, L. *Desarrollo de nuevos fármacos: desde la invención a la Farmacia*. Lección Inaugural del Curso 2013/14, Universidad de Salamanca. 2013.

Sanz, F., Giraldo, J. QSAR and Molecular Modeling: Concepts, Computational Tools and Biological Applications. Sanz, F., Giraldo, J., Manaut F, (Ed). Barcelona: J.R. Prous Science Publishers; 1995.

Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., Fesik, S.W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* (80). 1996; 274(5292):1531–4.

Stockman, B.J., Dalvit, C. NMR screening techniques in drug discovery and drug design. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2002; 41(3-4):187–231.

Upmanyu, N., Garg, G., Dolly, A., Mishra, P. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy an Evolutionary Approach to Drug Design. *E-Journal Chem.* 2007; 4(3):294–301.

Zou, T., Sadler, P.J. Speciation of precious metal anti-cancer complexes by NMR spectroscopy. *Drug Discov. Today Technol.* 2015; 16:7–15.

Bases de datos:

Medline. Información de salud para usted [en línea]. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish>

Pubmed. US National Library of Medicine [en línea]. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Scifinder. Chemical Abstracts Services [en línea]. [Consultado en Marzo 2016]. Disponible en: <https://scifinder.cas.org>