

Tesis doctoral

TÉCNICAS COMPUTACIONALES APLICADAS AL DESCUBRIMIENTO DE NEUROFÁRMACOS

Carlos Roca Magadán

Madrid, 2018

ÍNDICE

Tabla de abreviaturas	
-----------------------------	--

PRÓLOGO

Las enfermedades neurodegenerativas	1
---	---

INTRODUCCIÓN

1.1 El nacimiento de un fármaco	5
1.2 Sentando las bases del modelado	11
1.3 Fundamentos del modelado molecular	14
1.3.1 Mecánica cuántica.....	14
1.3.2 Mecánica molecular	16
1.4 Modelado molecular y química médica: un tándem ganador	17
1.4.1 Diseño de fármacos basado en el ligando	20
1.4.1.1 QSAR	20
1.4.1.2 Farmacóforo	21
1.4.1.3 Redes neuronales.....	23
1.4.1.4 Cálculos <i>ab initio</i>	23
1.4.1.5 Predicción de propiedades fisicoquímicas.....	23
1.4.2 Diseño de fármacos basado en la estructura	24
1.4.2.1 Identificación de dianas.....	24
1.4.2.2 Modelado de proteínas	25
1.4.2.3 <i>Docking</i>	27
1.4.2.4 Dinámica molecular	29
1.4.2.5 Cribado virtual.....	30
1.5 REFERENCIAS.....	33

OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS	41
--	-----------

CAPITULO 1. ALOSTERISMO EN ALZHEIMER

1. INTRODUCCIÓN.....	45
1.1 Alosterismo.....	48

1.2	Acetilcolinesterasa	50
2.	OBJETIVOS	54
3.	RESULTADOS	55
3.1	Antecedentes.....	55
3.2	Estudio y análisis de posibles sitios alostéricos en <i>hAChE</i>	58
3.3	Identificación de los posibles puntos de interacción ligando-proteína	63
3.4	Estudio del modo de unión de híbridos de donepezilo y tacrina	64
3.4.1	Búsqueda del sitio de unión	64
3.4.2	Estudios de <i>docking</i> y dinámica molecular.....	67
3.4.3	Ensayos celulares y modulación de las funciones no hidrolíticas.....	72
3.5	Identificación de nuevos moduladores alostéricos.....	75
3.5.1	Cribado virtual en el <i>Sitio 2</i>	76
3.5.2	Cribado virtual en el <i>Sitio 3</i>	79
3.5.3	Dinámica molecular	83
4.	CONCLUSIONES.....	89
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	90
5.1	Búsqueda de bolsillos	90
5.2	Análisis de los posibles puntos de unión ligando-proteína.....	90
5.3	Estudio del modo de unión de híbridos de donepezilo y tacrina	91
5.3.1	Búsqueda de bolsillos de unión.....	91
5.3.2	Estudios de <i>docking</i>	92
5.3.3	Dinámica molecular	92
5.4	Identificación de nuevos moduladores alostéricos.....	93
5.5	Ensayos biológicos	94
5.6	Dinámica molecular.....	94
6.	REFERENCIAS.....	96
CAPITULO 2. INHIBIDORES DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA PARA EL SÍNDROME DE FRAGIL-X		
1.	INTRODUCCIÓN.....	103
1.1	Antecedentes del grupo de investigación.....	109

2.	OBJETIVOS	111
3.	RESULTADOS	112
3.1	Estudio del mecanismo de inhibición de la interacción proteína-proteína	112
3.1.1	Cambios conformacionales de NCS-1	112
3.1.2	Estudio del mecanismo de acción de FD44 y FD16	116
3.2	Experimentos de NCS-1 y FD44 en solución	122
3.3	Identificación de nuevos inhibidores de la interacción NCS-1/Ric8a	125
4.	CONCLUSIONES	132
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	134
5.1	Análisis del movimiento de la hélice H10	134
5.2	Estudio del mecanismo de acción de FD44 y FD16	135
5.3	Ensayo de diferencia en la transferencia de saturación (STD-RMN)	136
5.4	Identificación de nuevos inhibidores de la interacción NCS-1/Ric8a	136
5.5	Ensayo de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y western blot	137
5.6	Experimentos de emisión de fluorescencia	137
5.7	Cristalización, colección de datos de difracción y resolución estructural	138
6.	REFERENCIAS	140

CAPITULO 3. CRIBADO VIRTUAL EN LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE JNK3

1.	INTRODUCCIÓN	143
2.	OBJETIVOS	150
3.	RESULTADOS	151
3.1	Modelado y refinamiento	151
3.2	Identificación de nuevos inhibidores de MLK3	160
3.2.1	Validación del protocolo	160
3.2.2	Cribado virtual y selección de compuestos	162
3.2.3	Evaluación biológica	166
3.3	Protección en motoneuronas derivadas de iPSC	169
4.	CONCLUSIONES	171
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	172
5.1	Modelado y refinamiento	172
5.1.1	Construcción del modelo del dominio quinasa de MLK3	172

5.1.2	Refinamiento y validación del modelo	173
5.2	Identificación de nuevos inhibidores de MLK3.....	174
5.2.1	Validación del protocolo.....	174
5.2.2	Cribado virtual y selección de compuestos.....	174
5.2.3	Evaluación biológica.....	175
5.3	Protección en motoneuronas derivadas de iPSC.....	175
6.	REFERENCIAS.....	176
 CONCLUSIONES		183
 DIFUSIÓN DE RESULTADOS		187

Tabla de abreviaturas

Las siguientes abreviaturas han sido utilizadas en esta tesis.

A β : β -Amiloide
Ach: Acetilcolina
AChE: Acetilcolinesterasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AME: Atrofia muscular espinal
APP: Proteína precursora de amiloide
ARN: Ácido ribonucleico
ASK1: del inglés *Apoptosis signal-regulating kinase 1*
ATP: Adenosintrifosfato
BHE: Barrera Hematoencefálica
CAS: Sitio Aniónico Catalítico
Cdc42: del inglés *Cell Division Cycle protein 42*
CSD: del inglés *Cambridge Structural Database*
DMSO: Dimetilsulfóxido
*d*NCS-1: Sensor de calcio neuronal de *Drosophila*
DUD: del inglés *Database of Useful Decoys*
EA: Enfermedad de Alzheimer
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
EMA: del inglés *European Medicines Agency*
EP: Enfermedad de Parkinson
ERK: Quinasa regulada por señal extracelular
EtOH: etanol
FDA: del inglés *Food and Drug Administration*
FHM: del inglés *Fragment Hotspot Maps*
FMR1: del inglés *Frágile-X Mental Retardation 1*
GABA: Ácido gamma-aminobutírico
GB: Generalized-Born
GBSA: Generalized-Born Surface Area
GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G
GSK-3: Glucógeno sintasa quinasa 3
*h*AChE: Acetilcolinesterasa humana
*h*BuChE: Butirilcolinesterasa humana
HTS: del inglés *High-throughput screening*
*i*PSC: del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*
JNK: Quinasa c-Jun N-terminal
LBDD: del inglés *Ligand-Based Drug Design*
MAPK: Quinasa activadas por mitógeno
MBC: del inglés *Medicinal and Biological Chemistry library*
MD: Dinámica molecular
MEKK1: del inglés *MAPK/ERK kinase kinase 1*
ML: del inglés *Machine Learning*
MLK: del inglés *Mixed-Lineage Kinase*
MM-GBSA: del inglés *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area*
NAM: Moduladores alostéricos negativos
NCS-1: Sensor de calcio neuronal 1
PAM: Moduladores alostéricos positivos

PAS: Sitio Aniónico Periférico
PB: Poisson-Boltzmann
PBS: Solución tampón fosfato
PBSA: Poisson-Boltzmann Surface Area
PDB: del inglés *Protein Data Bank*
PDE: Fosfodiesterasa
PI3K: Fosfoinositol-3 quinasa
PPI: Interacción proteína-proteína
QM/MM: del inglés *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*
QSAR: del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationship*
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
RMSD: del inglés *Root-Mean Square Deviation*
RMSF: del inglés *Root-Mean Square Fluctuation*
RRNN: Redes neuronales
SAPK: Quinasa activada por estrés
SASA: del inglés *Surface Accesible Solvent Area*
SBDD: del inglés *Structure-Based Drug Design*
SFX: Síndrome de frágil-X
SMD: del inglés *Scaled Molecular Dynamics*
SMN: del inglés *Survival Motor Neuron*
SNC: Sistema Nervioso Central
STD: del inglés *Saturation Transfer Difference*
TDP-43: del inglés *Transactive response DNA-binding Protein 43kDa*
tr-NOESY: del inglés *transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
VdW: Van der Waals
VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

PRÓLOGO

*“El sentido común es el
menos común de los sentidos”*

Séneca

PRÓLOGO

Las enfermedades neurodegenerativas

Los trastornos neurodegenerativos, caracterizados por la pérdida progresiva de poblaciones de neuronas, presentan un gran impacto social en la actualidad¹. Los trastornos neurodegenerativos más comunes como la enfermedad de Alzheimer y la demencia frontotemporal se engloban habitualmente bajo el término demencia. La demencia describe un conjunto de síntomas que incluyen pérdida de memoria, cambios de humor y problemas de comunicación y razonamiento. En todo el mundo, alrededor de 47 millones de personas tienen demencia, y hay casi 10 millones de casos nuevos cada año. La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia y puede contribuir al 60-70% de los casos. Se espera que en el año 2050, dicha enfermedad afecte a 1 de cada 85 personas en todo el mundo². La demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores en todo el mundo, teniendo un gran impacto físico, psicológico, social y económico en los pacientes, familias, cuidadores y en la sociedad³.

Las enfermedades neurodegenerativas se pueden clasificar de acuerdo con características clínicas primarias (por ejemplo, demencia, trastorno del movimiento o debilidad y atrofia muscular), distribución anatómica de la neurodegeneración (degeneraciones frontotemporales, trastornos extrapiramidales o degeneraciones espinocerebelosas) o anomalía molecular principal. Los trastornos neurodegenerativos más comunes son amiloidosis (Alzheimer), tauopatías (Alzheimer), α -sinucleinopatías (Parkinson, atrofia sistémica múltiple) y proteínopatías TDP-43 (demencia frontotemporal, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria). Estas patologías están típicamente definidas por la acumulación anómala de diversas proteínas en el sistema nervioso central (SNC) y la muerte neuronal, y comparten varios procesos fundamentales asociados con la progresiva disfunción y muerte neuronal, como lo son el estrés proteotóxico (disfunción de los

mecanismos del proteosoma y sistemas de autofagia y lisosomas), estrés oxidativo, muerte celular programada y neuroinflamación⁴. Es crítico el hecho de que las anomalías que definen las enfermedades neurodegenerativas están presentes antes de la aparición de la sintomatología clínica y que un sujeto puede sufrir varios de estos procesos de neurodegeneración al mismo tiempo, por lo que su diagnóstico en la actualidad resulta muy complejo. De hecho, la mayoría de enfermedades neurodegenerativas solo pueden ser diagnosticadas *post-mortem*⁵. Hay descritas algunas mutaciones genéticas causantes de estas enfermedades, por lo que su diagnóstico puede intentar realizarse de forma prematura a la aparición de la sintomatología clínica, pero, de manera general, la influencia genética en estas patologías no suele ser mayor de un 5-10%.

Actualmente, las aproximaciones farmacológicas que existen en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas son terapias encaminadas a la sintomatología clínica, sin existir a día de hoy fármacos capaces de revertir o curar estas enfermedades. Algunos de ellos como carbodopa y levodopa en el caso de la enfermedad de Parkinson, o donepezilo y tacrina en el caso de la enfermedad de Alzheimer, son paliativos, ralentizando la sintomatología clínica en fases iniciales de la enfermedad, pero que tras el avance de ésta dejan de tener un efecto en la sintomatología clínica⁶. Es por ello que, la búsqueda y desarrollo de fármacos que actúen en estas enfermedades, al menos paralizando su avance, es un objetivo fundamental tanto de la industria farmacéutica como de la academia.

INTRODUCCIÓN

*“La verdad es la hija del tiempo,
no de la autoridad”*

Francis Bacon

INTRODUCCIÓN

1.1 El nacimiento de un fármaco

La química médica es una de las consideradas ciencias farmacéuticas, con profundas raíces en la química y biología. Esta ciencia se centra en la identificación y/o diseño, síntesis, optimización y desarrollo de compuestos bioactivos de naturaleza orgánica, biotecnológica o inorgánica, que resulten adecuados para el uso terapéutico, conocidos como fármacos o principios activos. La combinación de un fármaco, o varios, y los excipientes que le den una forma farmacéutica determinada, con el fin de mejorar el efecto farmacológico, se denomina medicamento.

El desarrollo de fármacos es un proceso largo, que va desde el descubrimiento y validación de una diana terapéutica, el descubrimiento, diseño y optimización de un candidato, pasando por ensayos pre-clínicos y clínicos, hasta la aprobación de su comercialización (**Figura 1**). Dentro de este proceso, la primera etapa en química médica es la identificación y/o diseño de las moléculas candidatas a fármaco. Estos compuestos deben tener una actividad biológica de interés, y un conjunto de propiedades fisicoquímicas y *ADME-Tox* (*Absorción-Distribución-Metabolismo-Excreción-Toxicidad*) que le hagan ser un compuesto químico adecuado como fármaco para el uso en humanos⁷. La farmacología clásica está basada en los productos naturales, sustancias de origen animal y vegetal, que históricamente han tenido una acción y uso como fármacos. Gracias a ellos, se ha desarrollado y obtenido un conocimiento básico y fundamental, sobre el que se apoya a día de hoy el descubrimiento y diseño de nuevos fármacos. La obtención de nuevos fármacos se puede llevar a cabo tanto por el descubrimiento de nuevos productos naturales como por el diseño racional de nuevas entidades químicas y biológicas y la síntesis de éstas.

IDENTIFICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN	FASE PRECLÍNICA	FASE CLÍNICA	APROBACIÓN Y LANZAMIENTO
<ul style="list-style-type: none"> - Identificación y validación de una diana terapéutica - Descubrimiento de compuestos bioactivos - Diseño <i>de novo</i> - Síntesis, análisis y optimización - Ensayos de actividad - Estudios SAR - Propiedades ADMET 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios en modelos animales - Propiedades ADMET - Seguridad - Eficacia 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios en pacientes humanos - 3 fases - Propiedades ADMET - Seguridad - Efectividad - Dosificación - Formulación - 6-7 años 	<ul style="list-style-type: none"> - Aprobación por las diferentes agencias regulatorias - Fase 4: Farmacovigilancia
<p>15 años</p> <p>1000 millones €</p>			

Figura 1. Esquema resumen del proceso de descubrimiento de fármacos, desde la investigación básica, identificación y optimización hasta su aprobación para comercialización.

La hipótesis fundamental en el diseño de fármacos clásico es que la acción exitosa de un fármaco en el cuerpo humano depende de interacciones moleculares entre el ligando (el fármaco) y el sitio activo o de interés de una macromolécula diana (proteínas, receptores celulares, ácidos nucleicos,...)⁸. La fuerza de esta interacción viene determinada por la ubicación espacial de los átomos del ligando, la naturaleza electrónica de estos átomos, e interacciones fisicoquímicas con la macromolécula diana. En la actualidad el diseño racional de fármacos se realiza empleando dos aproximaciones diferentes: por un lado el diseño basado en la estructura de la diana (*Structure-Based Drug Design; SBDD*), y por otro lado el diseño basado en ligandos conocidos (*Ligand-Based Drug Design; LBDD*). Cuando se conoce la diana terapéutica involucrada en la patología, se emplean diferentes aproximaciones experimentales (resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía de rayos-X, etc.) y teóricas (modelado molecular) para la determinación de la estructura tridimensional de la misma. Uno de los fines es poder aplicar diferentes técnicas computacionales basadas en la interacción diana-ligando (*docking*, diseño *de novo*) al diseño racional de fármacos de un modo más eficaz. En caso de no conocer la diana de interés, se pueden emplear, estudios teóricos basados en la actividad y propiedades de los ligandos (QSAR, farmacóforo...) para comprender las claves químicas que permitan la actividad biológica de estas moléculas.

Por otro lado, las propiedades *ADME-Tox* son de alto interés en el diseño de fármacos. Para que un fármaco pueda tener una actividad farmacológica efectiva debe haber una concentración adecuada de éste en el órgano diana. La farmacocinética es la encargada de analizar los tiempos en

los que el fármaco permanece en nuestro cuerpo (semivida) y en qué concentraciones (biodisponibilidad), siendo las propiedades *ADME-Tox* las que definan el comportamiento farmacocinético y toxicológico de los compuestos químicos (**Figura 2**).

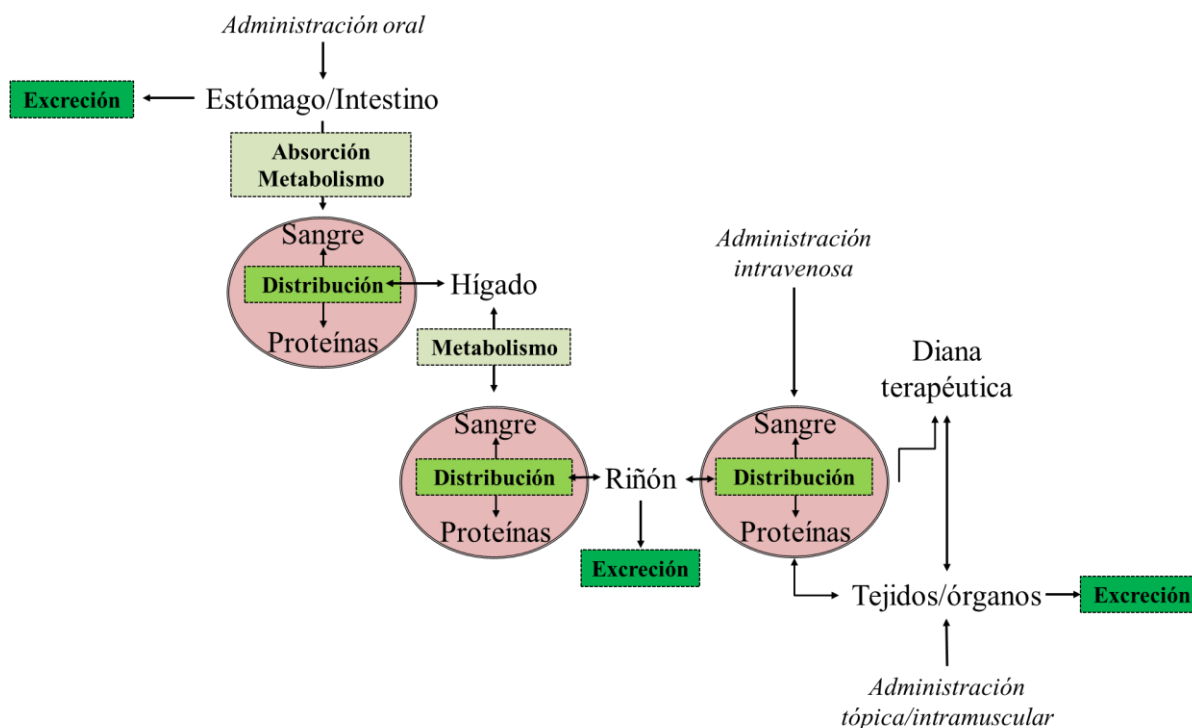


Figura 2. Esquema del proceso ADME, desde la administración del fármaco por diferentes vías (oral, intravenosa, tópica o intramuscular), absorción, distribución en sus diferentes etapas, llegada a la diana terapéutica y excreción.

La absorción de un fármaco es el proceso por el cual el fármaco pasa del sitio de administración a la circulación sistémica atravesando membranas⁹. Una absorción “ideal” se corresponde con un proceso rápido en el cual el fármaco se absorbe completamente con mínima variación entre sujetos. La vía de administración oral es la más conveniente y la preferida para mejorar la facilidad en la posología y la adherencia terapéutica. Tras la administración oral de un fármaco, estos deben solubilizarse para poder pasar a través de las membranas celulares intestinales a través de difusión pasiva, procesos mediados por transportadores o procesos de transporte activo para así acceder a la circulación sistémica.

La distribución de los fármacos es el paso de las moléculas de la circulación sistémica al espacio extravascular. Este proceso tiene una gran importancia ya que la mayoría de las dianas terapéuticas no se encuentran en el sistema vascular, sino en los diferentes órganos. El proceso de distribución de un fármaco está controlado por la difusión pasiva a través de las membranas lipídicas, los transportadores activos y la unión de los fármacos a proteínas plasmáticas y en los tejidos, siendo la difusión pasiva el proceso por el que la mayoría de fármacos se distribuyen¹⁰. La distribución es generalmente rápida, siendo las moléculas más pequeñas y lipófilas las que mejor atraviesan las

Introducción

membranas por difusión pasiva. A mayor tamaño y mayor polaridad de las moléculas este tipo de transporte se ve más impedido¹¹.

En el caso de las moléculas que necesiten actuar en el SNC la penetración de un fármaco es diferente en varios aspectos. El SNC está separado del torrente sanguíneo por la barrera hematoencefálica (BHE). La BHE está formada por las células endoteliales de los capilares cerebrales, siendo su característica principal la impermeabilidad de la pared de los capilares, debido a uniones estrechas complejas y una baja actividad endocítica. La mayoría de los fármacos penetran en el SNC por difusión pasiva a través de las células endoteliales, dependiendo de su lipofilia, grado de ionización y peso molecular, aunque algunos pueden usar transportadores endógenos específicos¹².

El metabolismo de los fármacos es la primera de las dos etapas necesarias para la eliminación de los xenobióticos del cuerpo humano. Se trata de la biotransformación de los fármacos, mediante la actuación de enzimas, para modificar químicamente los compuestos más lipófilos en compuestos más hidrófilos (metabolitos) que puedan ser excretados en la siguiente etapa. Los enzimas encargados del metabolismo se encuentran principalmente en el hígado, siendo el metabolismo hepático uno de los más estudiados para el desarrollo de fármacos¹³.

La excreción es la fase en la que los fármacos y sus metabolitos son eliminados del cuerpo humano. Principalmente la excreción se produce a nivel hepático o a nivel renal, aunque también se excretan xenobióticos en menor medida a nivel pulmonar o por la sudoración.

El efecto tóxico inducido por fármacos es un factor que debe evitarse, ya que uno de los requisitos fundamentales de un fármaco es su seguridad. Los efectos tóxicos se pueden clasificar en tres tipos, en función de su mecanismo: la toxicidad intrínseca a un compuesto químico, la concentración del fármaco de manera localizada en un órgano y la capacidad de eliminar la sustancia química y hacer frente a los daños que pueda producir.

En el estudio de las propiedades *ADME-Tox* de los fármacos, en 1997, C. A. Lipinski propuso algunas de las cualidades que debe presentar un fármaco para su absorción oral¹⁴. Las propiedades tipo fármaco propuestas, conocidas más comúnmente como “*La regla de los 5*”, han marcado el diseño de fármacos desde entonces. Los requisitos que debe cumplir un compuesto químico para tener cualidades tipo fármaco son: no debe contener más de 5 átomos donadores de enlaces de hidrógeno, no debe contener más de 10 átomos aceptores de enlaces de hidrógeno, poseer un peso molecular inferior a 500 Da y debe poseer un coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$) inferior a 5. Estas propiedades fisicoquímicas son, de modo general, las más influyentes en la solubilidad acuosa y absorción oral de los fármacos.

Tras la investigación básica, las moléculas que resultan más prometedoras son estudiadas en modelos celulares y animales para evaluar su seguridad y actividad biológica. Los ensayos preclínicos son estudios de experimentación *in-vitro* (estudios con cultivos celulares) e *in-vivo* (estudios con modelos animales) en los que el principal objetivo es evaluar de forma rigurosa la seguridad del compuesto y las expectativas de eficacia antes de empezar los ensayos clínicos en humanos, sin exponerlos a riesgos injustificados¹⁵. Los estudios de seguridad se realizan en dos especies animales, una roedor y otra no roedor, y se estudian los efectos en la toxicología general: toxicidad aguda, subaguda, crónica, carcinogenicidad, genotoxicidad y teratogenicidad. Los estudios de toxicidad aguda evalúan los efectos producidos sobre el animal después de una única exposición del fármaco. La toxicidad subaguda analiza la exposición a dosis repetidas en un periodo de tiempo (no más del 10% del periodo de vida del animal). En el caso de la toxicidad crónica se evalúan los efectos adversos que ocurren como resultado de una dosis repetida del fármaco durante la mayor parte de vida del animal (generalmente, más del 50%). En los estudios de carcinogenicidad se observa la propiedad de producir tumores en animales, y los estudios de genotoxicidad observan la capacidad de causar daño al material genético, tanto de tipo mutagénico, causando daños genéticos transmisibles por herencia, como carcinogénicos. Por último, los estudios de teratogenicidad estudian los efectos de los fármacos en los sistemas reproductivos y neuroendocrinos del adulto y embrión, el feto, el neonato y el mamífero prepuberal. Todos los estudios aportan una aproximación acerca del comportamiento y la seguridad que podría tener el fármaco si fuera administrado a humanos. Esta fase puede llegar a durar 3 años o más y hay miles de compuestos que nunca pasan a la siguiente fase. Se estima que por cada 250 compuestos en preclínica, sólo 5 entrarán en la siguiente etapa de investigación clínica.

Los ensayos clínicos son necesarios para conocer si el comportamiento del fármaco en los pacientes a los que va destinado es adecuado y si consigue realmente eficacia en el tratamiento de la enfermedad para la que se dirige con un perfil aceptable de reacciones adversas. Los ensayos clínicos están compuestos por 4 fases: fase 1, 2, 3 y fase de farmacovigilancia o fase 4 (**Figura 3**). La fase 1 se realiza en un número pequeño de voluntarios sanos (entre 20 y 100), con el objetivo de conocer el rango de dosis (dosis más baja a la que actúa y la dosis más alta a la que puede ser tomada sin causar daño) y sus propiedades ADME; la fase 2 se encarga de analizar la seguridad en pacientes. Se realizan en varias decenas de pacientes y su objetivo es evaluar los efectos secundarios, buscando dosis adecuadas y duración del tratamiento, y si es posible, obtener resultados preliminares de la eficacia del fármaco. Por último, la fase 3 evalúa la eficacia del fármaco, llevándose a cabo en varios miles de pacientes, distribuidos en diferentes grupos según estén expuestos al nuevo medicamento, a un medicamento ya conocido para tratar esa enfermedad o a placebo, obteniéndose evidencias o pruebas definitivas sobre su eficacia y seguridad. Suelen durar entre 1 y 4 años. La última fase, conocida como de farmacovigilancia, en la cual se controla la situación del medicamento en el

mercado, con el objetivo de que el medicamento no produzca efectos adversos no descritos o previstos.

FASE 1	FASE 2	FASE 3	FASE 4
<ul style="list-style-type: none"> - Voluntarios sanos - 20-100 sujetos - Dosificación - Seguridad - Propiedades ADMET - 1-2 años 	<ul style="list-style-type: none"> - Pacientes - Varias decenas - Eficacia - Efectos secundarios - Tiempo de tratamiento - Dosis - 1-2 años 	<ul style="list-style-type: none"> - Pacientes - Varios miles - Eficacia - Seguridad - 2-3 años 	<ul style="list-style-type: none"> - Farmacovigilancia - Control del medicamento en el mercado - Efectos adversos no descritos

Figura 3. Esquema resumen de las fases de investigación clínica de un fármaco.

Todo este proceso, desde el diseño y optimización de un fármaco hasta su comercialización (en caso de éxito), dura alrededor de 15 años y supone un alto coste para la industria farmacéutica, calculado aproximadamente en 1.000 millones de euros por fármaco¹⁶. La tasa de éxito promedio se encuentra en torno al 10%, siendo en algunos casos inferior, como los fármacos diseñados para el SNC (8%) o para tratamientos oncológicos (5%). En la **Figura 4** se pueden ver las causas del fracaso de los fármacos a lo largo de su desarrollo, siendo problemas en las propiedades *ADME-Tox* las causantes del 50% del fracaso de los compuestos. Además hay que tener en cuenta que el porcentaje de éxito en cada fase del desarrollo de un fármaco desciende según avanzan las fases, mientras que los costes del desarrollo aumentan según avanzan las fases¹⁷.

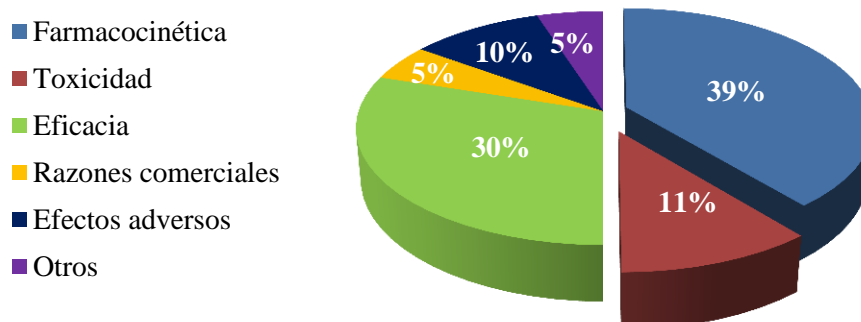


Figura 4. Causas del fracaso de los fármacos en su desarrollo. Las tres causas principales del fracaso son: 1) Problemas farmacocinéticos de los fármacos; 2) No se observan mejoras en la eficacia frente a otros compuestos o frente a placebo; 3) Toxicidad.

Según datos oficiales, desde 2006 hasta 2016, la agencia reguladora del medicamento estadounidense, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado una media de veintinueve

fármacos por año, siendo en 2016 veintidós los compuestos aprobados para su comercialización, de los cuales únicamente quince son nuevas entidades moleculares¹⁸. En el año 2016, tanto la FDA como la Agencia Europea del Medicamento (EMA) han reducido el número de compuestos aprobados para su comercialización.

El largo proceso y el alto coste que supone el desarrollo de fármacos junto con la baja tasa de éxito, suponen una barrera difícil de salvar, por lo que tanto desde la academia como desde la industria farmacéutica se han desarrollado diferentes aproximaciones y metodologías que aceleren el proceso de identificación del mejor candidato a desarrollar, optimizando los resultados finales y minimizando los costes. Una de las estrategias que se han aplicado con mayor éxito y aceptación es la aplicación de modelado molecular en química médica para la optimización del proceso de descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas¹⁹, la racionalización de la optimización de los posibles candidatos y la mejora de sus propiedades farmacocinéticas o toxicológicas²⁰.

1.2 Sentando las bases del modelado

*“¿Existe en la realidad algún fármaco que esté comercializado que haya sido diseñado por un ordenador?”*²¹. Esta pregunta que fue formulada por el Prof. Dr. William L. Jorgensen, de la Universidad de Yale, nos sirve como punto de partida para preguntarnos si existen métodos computacionales, hoy en día, como una herramienta útil en la identificación y optimización de fármacos. La respuesta a esta pregunta es afirmativa y, fundamentalmente, se debe a la aparición y desarrollo de las técnicas englobadas en el modelado molecular.

El modelado molecular abarca todos los métodos utilizados para predecir y simular computacionalmente el comportamiento de las moléculas. La química computacional, la bioinformática y la quimioinformática se engloban en el modelado molecular para estudiar sistemas moleculares que van desde sistemas químicos pequeños hasta sistemas biológicos grandes.

Las técnicas computacionales han vivido un gran avance en las últimas décadas, debido en gran medida a los impresionantes avances conseguidos en las ciencias informáticas, que han aportado un gran soporte técnico a las ideas y conocimientos que se estaban desarrollando desde mediados del siglo XX. Es por ello, que es necesaria la apreciación de las investigaciones que han desembocado en las técnicas computacionales actuales (**Figura 5**). Para ello, hay que partir de las primeras valoraciones cuantitativas de las propiedades moleculares mediante representaciones mecánicas simples a nivel atómico, que vienen del trabajo de Hill (1946, 1948)^{22, 23}, Westheimer y Mayer (1946)²⁴ y Barton (1948, 1950)^{25, 26}. Todos estos trabajos se realizaron sobre las conformaciones de diferentes moléculas orgánicas. En su trabajo, Hill ya añade en la expresión matemática de la energía potencial elementos que se mantienen aún en la actualidad en los campos de fuerza modernos²².

Westheimer y Mayer (1946)²⁴ propusieron el uso de términos exponenciales para la descripción del impedimento estérico. Los primeros cálculos para las conformaciones elegidas o para moléculas simples se llevaron a cabo manualmente, o mediante el uso de calculadoras de mesa. Incluso algunos investigadores pioneros como Pauling y Corey en 1951^{27, 28}, o Allinger en 1959, llevaron a cabo modelos contruidos a mano en metal o madera para la medida de parámetros geométricos²⁹. La importancia del cálculo cuantitativo de las interacciones no enlazantes en estructuras tridimensionales de moléculas orgánicas comenzó a partir de un trabajo de Bartell en 1960³⁰. En este trabajo se muestra la preferencia por la aproximación de “esferas suaves” (“*soft spheres*”) frente a “esferas duras” (“*hard spheres*”) en el análisis de estructuras de algunos hidrocarburos, llegando ya a proponer algunos de los primeros parámetros para éstos. A partir de la década de los 60, y gracias a la introducción de las primeras computadoras en todos los campos de la ciencia, se produjo una rápida expansión de los métodos de mecánica molecular. Wiberg (1965)³¹ fue el primero en proponer el uso de las coordenadas cartesianas de los átomos (aparte de coordenadas internas, como por ejemplo distancias de enlace, ángulos de enlace o torsionales) para la minimización de las energías no enlazantes. Allinger y Sprague (1973)³² aumentaron la aproximación de la mecánica molecular a hidrocarburos más complejos, incluyendo sistemas con electrones deslocalizados. Basándose en su publicación se desarrolló el campo de fuerzas de mecánica molecular y programa informático MM1, que iría seguido de los campos de fuerza y programas MM2, MM3 y MM4. Por campo de fuerza se entienden las funciones y parámetros utilizados para calcular la energía potencial de un sistema de átomos en mecánica molecular. Los parámetros de las funciones de energía pueden derivarse de experimentos en física o química, cálculos en mecánica cuántica o ambos.

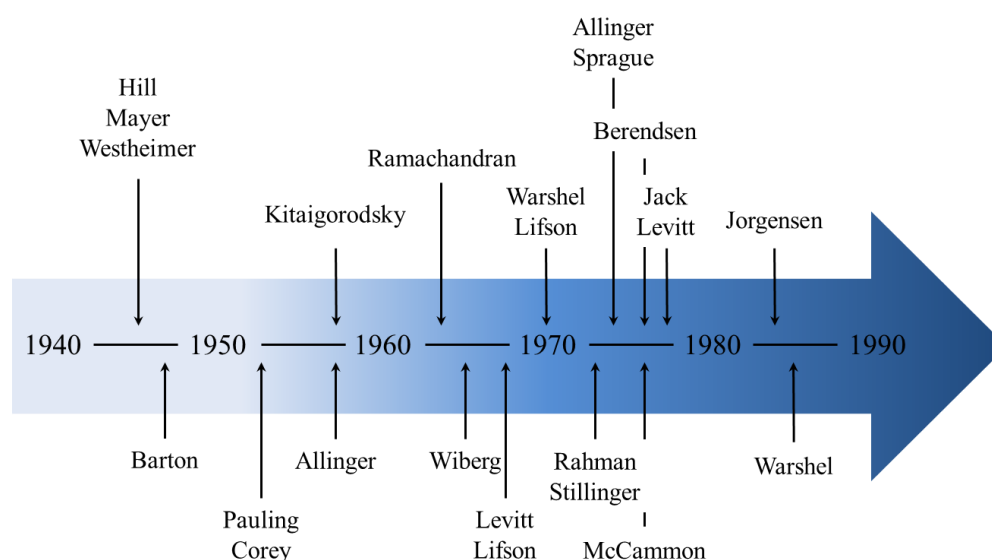


Figura 5. Cronograma resumen de la aparición de algunos de los trabajos más importantes de los científicos pioneros en el desarrollo del modelado molecular²²⁻⁴³.

Uno de los pioneros en realizar aproximaciones a las interacciones intermoleculares fue A. I. Kitaigorodsky, en 1961. Usó datos estructurales y termodinámicos de cristales de moléculas

orgánicas para ajustar los parámetros de las funciones de potencial átomo-átomo para cálculos de energías de interacción no enlazantes. Además fue el primer investigador que propuso considerar las interacciones de átomos no unidos en una molécula y los átomos de diferentes moléculas utilizando las mismas expresiones matemáticas y los mismos parámetros, lo que hizo posible aplicar la mecánica molecular en aproximaciones a biopolímeros³³. Algunos de sus trabajos inspiraron a otros, como Warshel y Lifson, que fueron modificando las funciones de potenciales no enlazantes y añadiendo términos energéticos^{34, 35}.

En la década de los años 60 se llevaron a cabo las primeras aproximaciones de la mecánica molecular a estructuras proteicas. Los principales problemas en los que la mecánica molecular tuvo aplicación fueron la construcción de modelos tridimensionales de estructuras macromoleculares, la predicción del plegamiento de las proteínas, y el refinamiento de estructuras obtenidas a partir de datos experimentales. En 1963, G. N. Ramachandran diseñó un método matemático (que tomaría su apellido: *Ramachandran plot*) capaz de calcular, usando expresiones matemáticas para las coordenadas atómicas y tomando las distancias de enlace y ángulos de enlace como valores fijos, el mapa bidimensional de las conformaciones posibles y no posibles de péptidos³⁶. Al comienzo de la utilización de los ordenadores y cálculos teóricos, podía llevar aproximadamente medio año el cálculo (usando calculadoras de mesa). El avance de las ciencias informáticas ha permitido que en la actualidad estos cálculos se realicen usando métodos de mecánica molecular o mecánica cuántica, siendo uno de los experimentos básicos para la validación tanto de estructuras obtenidas experimentalmente como en la preparación de modelos computacionales. En 1969, Levitt y Lifson publicaron el primer refinamiento con mecánica molecular de una estructura proteica obtenida mediante difracción de rayos-X (mioglobina y lisozima)³⁷. En la década de 1970 se produjeron grandes avances, Rahman y Stillinger describieron la primera dinámica molecular de una molécula polar, H₂O³⁸, la aplicación de campos de fuerza para el refinamiento de estructuras cristalográficas por Jack y Levitt en 1978³⁷ y Konnert y Hendrickson en 1980³⁹, y aproximaciones a las dinámicas moleculares por McCammon y Karplus en 1977⁴⁰. Finalmente, es importante destacar la aparición, a finales de la década de 1970 y principios de la década de 1980, de los campos de fuerza de moléculas de agua desarrollados por Berendsen (modelo SPC)⁴¹ y Jorgensen (modelo TIP3P/TIP4P)⁴², avances en las electrostáticas de proteínas y complejos enzima/sustrato en solución por Warshel⁴³ y las posteriores aplicaciones farmacéuticas de estas técnicas por Kollman⁴⁴.

Como colofón y premio a los grandes avances de las técnicas de modelado molecular para poder estudiar con mayor precisión, desde la reactividad de compuestos orgánicos hasta el comportamiento en disolución de grandes biomoléculas, se agració con el premio Nobel de Química en 1998 a John A. Pople y Walter Kohn (“*por el desarrollo de métodos computacionales en química cuántica*”)⁴⁵ y a Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel en el año 2013 (“*por el desarrollo de modelos multiescala para sistemas químicos complejos*”)⁴⁶. La mayoría de los programas y

campos de fuerza utilizados a día de hoy, para los estudios de molécula pequeña a grandes biomoléculas, están basados en el trabajo de todos estos pioneros y sus colaboradores.

1.3 Fundamentos del modelado molecular

La química teórica es el pilar fundamental en que se apoya el modelado molecular para la búsqueda de soluciones a problemas químicos y biológicos. La química teórica es una disciplina que forma parte de la química, donde los métodos matemáticos se combinan con las leyes fundamentales de la física para estudiar los procesos de relevancia química. Para estudiar los procesos químicos, hay que describir un sistema, formado por partículas (moléculas, átomos) en unas condiciones determinadas. La descripción de las partículas es fundamental para una resolución del problema correcta. Así, de forma muy simple, los átomos se definen como un conjunto de protones, neutrones y electrones. Las moléculas están formadas por átomos, y éstas a su vez pueden formar macromoléculas como péptidos. La descripción de moléculas como átomos enlazados entre sí, con núcleos centrales positivos y electrones negativos a su alrededor (mecánica cuántica, desarrollo de la ecuación de Schrödinger: $H\Psi=i\hbar d\Psi/dt$), o, en un sentido más general, como una colección de partículas cargadas positiva o negativamente, unidas por enlaces de distancias, ángulos, torsionales y ángulos diedros determinadas (mecánica molecular o clásica, desarrollo de la segunda ley de Newton: $F=ma$), puede ayudar a solucionar diferentes problemas químicos. La diferencia principal entre la mecánica cuántica y molecular es que la mecánica molecular es determinística (puede determinar la posición de las partículas en un momento determinado) mientras que la cuántica es determinística pero su interpretación es probabilística (permite el cálculo de la probabilidad de una partícula en un lugar y momento determinados)⁴⁷.

1.3.1 Mecánica cuántica

Debido a que los electrones son partículas con una masa muy pequeña estos no son capaces de ser estudiados en detalle por la mecánica molecular, siendo la mecánica cuántica la aproximación capaz de realizar estos cálculos. Los métodos que utilizan la mecánica cuántica son también conocidos como *ab initio* (del latín: “desde el inicio”).

La ecuación de Schrödinger únicamente ha sido resuelta para el átomo de hidrógeno debido a la dificultad del cálculo para sistemas más complejos. Debido a esto, se han ido desarrollando diferentes aproximaciones para encontrar una solución a este cálculo, utilizando un tiempo de cálculo razonable. Una de ellas, la aproximación de Born-Oppenheimer, no tiene en cuenta el acoplamiento entre el núcleo atómico y el movimiento de los electrones, tomando como fija la posición del núcleo. Esto permite el cálculo de la parte electrónica con las posiciones de los núcleos como parámetros.

El movimiento dinámico de los sistemas con muchos electrones es muy complejo, y consecuentemente su solución requiere de métodos computacionales muy elaborados. Una simplificación importante, tanto conceptual como técnicamente, puede obtenerse introduciendo modelos de partículas independientes, donde el movimiento de un electrón es considerado independiente de los demás. Esto significa que se aproxima la interacción entre partículas, tanto por omisión de todas las interacciones menos la más importante, como también tomando todas las interacciones como un promedio. Teniendo en cuenta esto, la teoría que cuenta con la precisión más aceptable se llama método de *Hartree-Fock* (HF), en el que cada electrón se describe con un orbital, y la función de onda total es dada por un producto de orbitales. Esta teoría solo tiene en cuenta un promedio de las interacciones entre electrones, omitiendo la correlación entre estos, siendo por lo tanto la mejor función de onda de único determinante⁴⁸.

Otra de las teorías más aplicadas es la conocida como teoría funcional de densidad (DFT). Se basa en que la energía electrónica del estado fundamental está determinada completamente por la densidad electrónica ρ , designando funcionales (que son funciones de funciones) que conectan la densidad del electrón con de energía. En esta metodología, la energía cinética del electrón se calcula a partir de un conjunto de orbitales auxiliares utilizados para representar la densidad de electrones. La correlación de intercambio la energía, que es una fracción bastante pequeña de la energía total, es entonces la única de las aproximaciones funcionales desconocidas para este término, proporcionando resultados bastante precisos. Los costos computacionales son relativamente bajos en comparación con los métodos tradicionales, como el HF y sus aproximaciones, que incluyen la correlación de electrones, pero este método falla a la hora de describir ciertas características importantes, como las interacciones de Van der Waals (VdW).

Existen muchas aproximaciones diferentes para resolver la ecuación de Schrödinger, pero saber cuál aproximación es la más adecuada para calcular un problema específico es una de las principales cuestiones a resolver. Habitualmente se elige comparando el resultado con los datos experimentales conocidos, siendo los datos experimentales los que guían la selección del modelo computacional. Así se puede conocer si la aproximación utilizada es apta para la solución de un problema conocido y aplicarlo al problema deseado. Los métodos *ab initio* han permitido el desarrollo de los campos de fuerza de mecánica molecular, debido a la capacidad de ajustar los parámetros a los resultados de los cálculos *ab initio*⁴⁹, el modelado de procesos de catálisis enzimática y del funcionamiento de sitios activos de los enzimas^{50, 51} y estudios de pKa de moléculas⁵² entre otros.

1.3.2 Mecánica molecular

Como ya se ha comentado previamente, la mecánica cuántica es un método de gran utilidad para el estudio de pequeñas moléculas aisladas o de conjuntos muy reducidos de átomos, siendo un método limitado para el estudio de sistemas supramoleculares, como proteínas, ácidos nucleicos o fragmentos de membranas. La reducción en la complejidad de los cálculos es necesaria para obtener soluciones a problemas químicos relacionados con macromoléculas. Los métodos de mecánica molecular, basados en la mecánica newtoniana son los métodos de elección en estos estudios.

La mecánica molecular puede ser considerada como una generalización y representación cuantitativa de los modelos moleculares basados en átomos simples y enlaces, mediante expresiones matemáticas. Los conjuntos de expresiones matemáticas y coeficientes numéricos son conocidos como campos de fuerzas. Los métodos de mecánica molecular y la mayoría de las expresiones matemáticas son el resultado de los esfuerzos de muchos de los científicos nombrados anteriormente.

La mecánica molecular describe las moléculas en términos de átomos enlazados (átomos que forman parte de la molécula), sus geometrías están alejadas de las geometrías ideales (en el equilibrio) debido a interacciones no enlazantes con átomos de la misma molécula o de otras. En esta descripción, la mecánica molecular no incluye los electrones de manera explícita, pero diferentes configuraciones electrónicas para cada uno de los elementos químicos es considerada de manera implícita por los campos de fuerza.

La principal aproximación de la mecánica molecular es el término de acumulación de la energía (Ec.1):

$$\Delta E(\mathbf{R}) = \sum Eb + \sum Ea + \sum Et + \sum Enb \quad (\text{Ec. 1})$$

Esta representación minimalista del potencial energético de una molécula o complejo molecular como función de unas coordenadas atómicas, \mathbf{R} , es representada como la suma de cuatro términos energéticos: enlaces químicos (Eb), ángulos de enlace (Ea), ángulos torsionales (Et) e interacciones no enlazantes (Enb) (**Figura 6**).

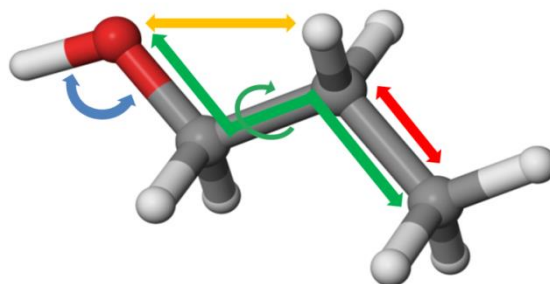


Figura 6. Representación gráfica, en una molécula de 1-propanol, de los diferentes términos valorados para el cálculo del potencial energético de una molécula: distancia de enlace (rojo), ángulo de enlace (azul), ángulo torsional (verde) e interacciones no enlazantes (amarillo).

Tanto E_b , E_a como E_t son parámetros que se refieren a las variaciones de las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos torsionales, siendo modelados como potenciales armónicos, que parten de los valores experimentales en el equilibrio. Las interacciones no enlazantes, E_{nb} , se refieren a las interacciones entre átomos no enlazados entre sí. En general, cada término atómico está representado como una suma de interacciones electrostáticas y de VdW.

El cálculo de la energía potencial se utiliza para la búsqueda de mínimos energéticos locales (búsquedas conformacionales), para la construcción y análisis de superficies de energía potencial, el seguimiento de la trayectoria de un sistema en movimiento (dinámica molecular), o el estudio de características geométricas y termodinámicas de un sistema.

1.4 Modelado molecular y química médica: un tándem ganador

La identificación y/o diseño de fármacos es la etapa de investigación básica en la que se identifican, diseñan y optimizan los compuestos químicos con actividad biológica con el objetivo de que estos puedan ser en el futuro fármacos. En esta etapa inicial, el modelado molecular es a día de hoy una de las herramientas de aplicación fundamental, para realizar un diseño y desarrollo racional de fármacos. El modelado molecular engloba un conjunto de diferentes técnicas computacionales aplicadas a la simulación y predicción del comportamiento de los compuestos químicos. Dentro de este conjunto se podrían clasificar las técnicas en tres campos diferentes: quimioinformática, bioinformática y química computacional.

K. F. Brown definió en 1998 la quimioinformática como:

*“El uso de la información tecnológica y su uso se ha convertido en una parte crítica del proceso de descubrimiento de fármacos. La quimioinformática es la transformación de los datos en información y de información en conocimiento con el propósito de tomar mejores decisiones y más rápidas en el área del descubrimiento de candidatos a fármaco y su organización”*⁵³.

Introducción

La quimiinformática se basa en la representación de las estructuras químicas en forma de múltiples descriptores químicos y el análisis mediante diferentes funciones matemáticas y estadísticas para la obtención de un conocimiento químico y biológico de estos datos, como la relación entre estructuras químicas y su actividad biológica (*Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR)⁵⁴, la obtención de características topológicas relacionadas con la actividad farmacológicas de moléculas orgánicas (o farmacóforo)⁵⁵, el análisis y predicción de propiedades fisicoquímicas, propiedades tipo fármaco⁵⁶, y la aplicación de todas estas como herramientas para el cribado virtual de bases de datos de compuestos orgánicos y el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos.

En segundo lugar, la bioinformática se centra predominantemente en el análisis de tres tipos de grandes conjuntos de datos disponibles en biología molecular: estructuras macromoleculares, secuencias del genoma y los resultados de experimentos de genómica funcional. Emplea una amplia gama de técnicas computacionales que incluyen el alineamiento de secuencias y estructuras, extracción y diseño de bases de datos, geometría macromolecular, construcción de árboles filogenéticos, predicción de estructuras macromoleculares y función de proteínas, hallazgo de genes y agrupación de datos de expresión⁵⁷. La aplicación de la bioinformática a la química médica, se centra en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y el modelado y predicción de estructuras macromoleculares, existiendo otras aproximaciones útiles en el descubrimiento de fármacos, siendo las dos primeras las más aplicadas a lo largo de esta tesis.

Por último, dentro de los tres campos englobados por el modelado molecular se encuentra la química computacional, que se centra en la obtención de resultados relevantes para la solución de problemas químicos, basándose en la química teórica y aplicando las herramientas que los avances en la ciencia informática ha aportado en las últimas décadas. La principal característica de la química computacional es la aplicación de métodos basados en mecánica cuántica y molecular, a pesar de que estos se utilizan de manera transversal tanto en la quimiinformática como en la bioinformática.

Algunas de las aplicaciones más importantes de la química computacional en el descubrimiento de fármacos son los estudios de acoplamiento molecular (*molecular docking*) para el estudio del comportamiento químico de ligandos en sus dianas, refinamiento de estructuras macromoleculares (tanto obtenidas de manera experimental mediante RMN o cristalografía de rayos-X, como de manera teórica mediante modelado), búsqueda de bolsillos y cavidades susceptibles de unión por un fármaco, simulaciones del comportamiento de dianas y ligandos en entorno fisiológico a temperatura ambiente (dinámicas moleculares) y estudios de pKa, tautomerías y parametrización de ligandos (*ab initio*) entre otros. Algunos de los programas informáticos y bases de datos de mayor uso para la aplicación de todas estas técnicas se encuentran clasificados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de algunos de los programas informáticos y bases de datos más utilizados en las diferentes técnicas de modelado molecular.

Técnica de modelado molecular	Programas informáticos	Bases de datos
QSAR	CoMFA ⁵⁸ CoMSIA ⁵⁹ Phase ⁶⁰	Binding DB ⁶¹ DrugBank ⁶²
Farmacóforo	Phase	Binding DB DrugBank
ML/RRNN	WEKA ⁶³ CODES-TSAR ⁶⁴	
<i>Ab initio</i>	Gaussian GAMESS Jaguar ⁶⁵	
Cálculo de descriptores	Dragon ⁶⁶	
Predicción de propiedades fisicoquímicas	QikProp ⁶⁷	
Modelado de proteínas	Modeller ⁶⁸ Prime ⁶⁹ SwissModel ⁷⁰ Phyre2 ⁷¹	Uniprot ⁷² Protein Data Bank ⁷³ SwissModel repository ⁷⁴ Protein Model Portal ⁷⁵
Dinámica molecular	AMBER ⁷⁶ Gromacs ⁷⁷ Desmond ⁷⁸	

Además, como se ha mencionado previamente, las técnicas que componen el modelado molecular se pueden clasificar en dos grandes grupos, en función del tipo de aproximación que realicen en el descubrimiento de fármacos y de cuál sea la información de la que dispongan para llevarla a cabo: 1) Diseño de fármacos basado en la estructura y 2) Diseño de fármacos basado en el ligando.

El diseño de fármacos basado en la estructura se aplica cuando se dispone de una diana validada para el tratamiento de una patología y existe una estructura tridimensional de esta diana, pudiendo ser obtenida de manera experimental mediante cristalografía de rayos-X o RMN; como obtenida de manera teórica mediante modelado por homología. El diseño de fármacos basado en el ligando se aplica cuando se conocen compuestos con actividad biológica de relevancia pero se

desconoce la diana sobre la que actúan, o se desconoce la estructura tridimensional de esta (**Figura 7**).

Estructura 3D	Ligando	
	Diana	
Desconocida	Desconocida Química combinatoria Cribados de alto rendimiento (HTS)	Conocida QSAR Farmacóforo RRNN Cribado virtual
Conocida	<i>de novo</i> <i>Docking</i> Cribado virtual	<i>Docking</i> Cribado Virtual

Figura 7. Posibles estrategias en el proceso de identificación y diseño de fármacos.

1.4.1 Diseño de fármacos basado en el ligando

1.4.1.1 QSAR

Los estudios QSAR se basan en la premisa de que los cambios en la bioactividad de las moléculas orgánicas están asociados con variaciones estructurales y moleculares de éstas, que también suponen modificaciones en los descriptores moleculares. Los descriptores moleculares son capaces de convertir la estructura de los compuestos orgánicos en un conjunto de valores numéricos que representan varias propiedades moleculares que deben considerarse para explicar la actividad de los compuestos. Algunos de los descriptores moleculares más habituales son: los descriptores propios de la molécula (peso molecular, número de átomos, tipos de átomos)⁷⁹, electrostáticos y mecánica-cuánticos (cargas parciales, polarizabilidad), topológicos (la conectividad molecular), geométricos (volumen, área superficial accesible al solvente o SASA)⁸⁰, basados en fragmentos o huellas dactilares moleculares (*Molecular Fingerprints*)⁸¹ y descriptores dependientes del alineamiento, entre otros. Mediante la generación de una correlación entre descriptores y bioactividad, se puede desarrollar un método de predicción matemático. Los estudios tipo QSAR se pueden clasificar de acuerdo a las diferentes dimensiones (los descriptores que tienen en cuenta para realizar la correlación) que representan, *nD*-QSAR ($n=1-6$)⁸². 3D y 4D-QSAR son las técnicas más comúnmente utilizadas en el descubrimiento de fármacos, aunque ya se han llegado a desarrollar técnicas de QSAR 5D y 6D.

El proceso de desarrollo de un modelo QSAR está compuesto por una serie de etapas sucesivas: la generación de los descriptores moleculares a partir de las estructuras químicas, la selección de los descriptores más relevantes para crear una correlación con la actividad biológica y el cálculo de la función matemática capaz de correlacionar los descriptores con la actividad analizada. El cálculo de descriptores moleculares es capaz de generar cientos de valores, que no tienen por qué estar relacionados con la actividad biológica, desarrollándose diferentes métodos, tanto estadísticos como matemáticos, para seleccionar el conjunto de descriptores más representativos que sean utilizados en la generación del modelo QSAR⁸³. Para el cálculo de la correlación entre descriptores y actividad biológica se pueden utilizar diferentes tipos de funciones, desde las funciones lineales (regresión lineal, mínimos cuadrados parciales o análisis discriminante lineal), las no lineales (Naïve Bayes, *k*-vecinos próximos) hasta métodos de inteligencia artificial (redes neuronales, máquinas de vectores de soporte o árboles de decisión)⁸³.

Una de las características más importantes de los modelos 3D-QSAR, es el carácter tridimensional de los ligandos utilizados. En la generación de los descriptores se utiliza una única conformación por compuesto, por lo que la elección del conformero, la posible forma tautomérica o el estado de protonación del ligando es fundamental para un correcto desarrollo del modelo. En los estudios 4D-QSAR, se modifica el tratamiento de los ligandos, teniéndolos en cuenta como un conjunto de conformeros y estados de protonación, ampliando así el número de posibles conformaciones bioactivas. Esto aumenta el tiempo y la complejidad de cálculo, pero mejora la exactitud del método y su resultado.

En los estudios 5D-QSAR, también conocidos como *Quasar*, se añade al 4D-QSAR un ajuste local inducido (*Induced Fit*) de las características que debería poseer el receptor, para así simular un entorno flexible de unión de los ligandos, que hasta este método se consideraba rígido o no se consideraba. Esto se puede simular creando una envuelta que rodea a todos los ligandos del conjunto de aprendizaje a distancia de VdW, acomodando los ligandos en una envuelta interior. Se puede lograr isotrópicamente (linealmente), anisotrópicamente (estérico, eléctrico, enlace de hidrógeno o potencial de lipofilidad a escala), o mediante la minimización de la energía. Como la magnitud del ajuste local inducido no puede estimarse en ausencia del receptor biológico, es necesaria la realización de varias simulaciones basadas en diferentes hipótesis de ajuste inducido, extendiendo el 4D-QSAR a una quinta dimensión, representando múltiples hipótesis de ajuste inducido. Finalmente, los estudios 6D-QSAR, añaden a la teoría del *Quasar* la función de solvatación, realizando las simulaciones en diferentes modelos de solvatación⁸².

1.4.1.2 Farmacóforo

El modelado de farmacóforos es otra técnica basada en el concepto de que la información del sitio de unión de las dianas terapéuticas se puede extraer del análisis de la conformación bioactiva

que diferentes ligandos puedan tener en ella. Su principal objetivo es seleccionar conjuntos de ligandos para apreciar la afinidad entre el ligando y diana (o su ausencia), o para analizar el modo de unión de un conjunto de compuestos y comprender su mecanismo de acción. Moléculas orgánicas bioactivas con diferentes esqueletos químicos, pero con una disposición tridimensional similar de sus grupos funcionales, se pueden alinear para así encontrar la interacción clave común entre grupos funcionales (**Figura 8**). El modelado de farmacóforos puede realizarse en la etapa de alineamiento molecular de los estudios QSAR, es decir estudios híbridos de modelización de farmacóforos basados en 3D-QSAR, mejorando los resultados obtenidos con ambas técnicas⁸⁴. Por otro lado, existen aproximaciones computacionales que permiten estudiar la superficie de proteínas y obtener información acerca de los residuos de la diana que presentan mayor probabilidad de interacción con ligandos (conocidos como “hot spots”)⁸⁵. Estas aproximaciones, generan mapas que se relacionan con regiones de interacción dadora/aceptora de enlaces de hidrógeno, e interacciones de tipo aromático/hidrofóbico, lo que se podría conocer como un receptóforo. La información generada por ambos métodos, desde el punto de vista del ligando y desde el punto de vista de la estructura de la diana se pueden integrar, resultando así el modelado de un farmacóforo que tiene aplicaciones tanto en el diseño de novo, la optimización de ligandos en proyectos de química médica y la identificación de nuevos fármacos mediante el cribado virtual de compuestos.

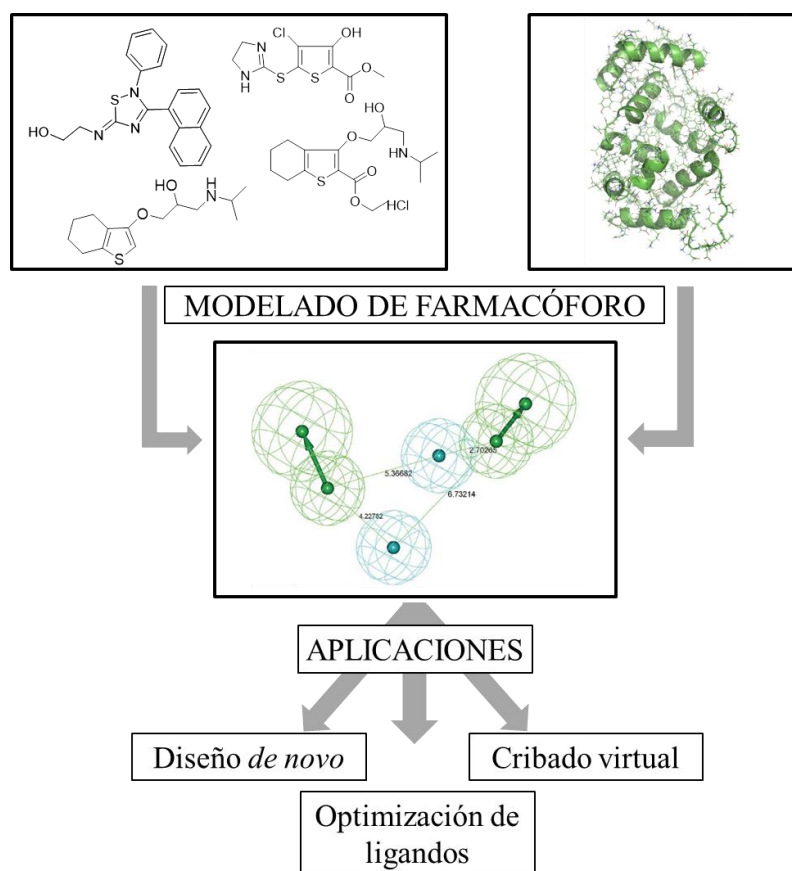


Figura 8. Esquema ejemplo del proceso de modelado de un farmacóforo y aplicaciones.

1.4.1.3 Redes neuronales

Las técnicas de inteligencia artificial (*Machine Learning*, ML), como las Redes Neuronales (RRNN) son métodos matemáticos que presentan la capacidad de aprendizaje y resolución de problemas utilizando modelos matemáticos, cuando las funciones matemáticas simples no los resuelven. Al usar el algoritmo de aprendizaje en una red neuronal, se puede obtener información útil a partir de conjuntos de datos de “aprendizaje” (*training sets*) y acumular conocimiento sobre los pesos que conectan a las diferentes neuronas. Estas estrategias se pueden aplicar en el desarrollo de fármacos de dos maneras: por un lado, las RRNN se pueden utilizar para detectar compuestos químicos con el fin de apreciar diferentes propiedades fisicoquímicas o asociar compuestos activos con sus dianas terapéuticas, mientras que, por otro lado, es posible encontrar patrones en las proteínas diana que están relacionados con un tipo específico de compuesto con el fin de obtener nuevos fármacos que se unan a ellos⁸⁶.

1.4.1.4 Cálculos *ab initio*

Los cálculos *ab initio* pueden ser aplicados en el desarrollo de fármacos en varios campos. Estos estudios tan exhaustivos de pequeños sistemas de moléculas orgánicas o inorgánicas, se puede aplicar para realizar una optimización energética de un ligando, con el objetivo de conocer su conformación más estable, con la finalidad, por ejemplo, de conocer su geometría y cargas atómicas, siendo de gran valor en la parametrización de estudios de dinámica molecular⁸⁷, estudios detallados de la acidez de diferentes moléculas⁵², estudios teóricos de mecanismos de reacción⁸⁸, e incluso su hibridación con los campos de fuerza de mecánica molecular para desarrollar así cálculos QM/MM, capaces de valorar la parte de mayor interés del sistema *ab initio* y el resto con mecánica molecular⁸⁸.

1.4.1.5 Predicción de propiedades fisicoquímicas

Es necesario volver a destacar la importancia de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos para que estos tengan éxito, llegando al órgano diana sin ocasionar efectos secundarios indeseados en pacientes. Es por ello se han desarrollado que diversas herramientas de predicción computacional (*in silico*) de algunas de las propiedades fisicoquímicas más importantes, para la ayuda y soporte en el descubrimiento de fármacos⁸⁹. Las propiedades de mayor importancia son el coeficiente de partición octanol/agua (que puede relacionarse directamente con logP o con la lipofilia), la solubilidad acuosa, la biodisponibilidad (la regla de los 5 de Lipinski), pKa, toxicidad y mutagénesis. Algunas propiedades de cálculo más complejo como el paso de la BHE, unión a proteínas plasmáticas o ratio de absorción oral, también pueden ser calculadas, siendo predicciones menos precisas, debido a que estas propiedades están influidas por muchos factores.

1.4.2 Diseño de fármacos basado en la estructura

Desde el punto de vista de la estructura de la diana terapéutica, la disposición, o no, de una estructura tridimensional de la diana es fundamental para el enfoque de los estudios. En el caso de no disponer de una estructura tridimensional, los programas de química médica pueden focalizar sus esfuerzos en la realización de programas de cribado de alto rendimiento (*high-throughput screening*, HTS) o de química combinatoria, como en la obtención de modelos tridimensionales de la estructura de la diana (modelado por homología) para la realización de posteriores estudios (*docking*, cribado virtual). En relación con los programas de HTS y química combinatoria, su objetivo es la identificación de nuevos compuestos con actividad biológica sobre la diana. Una vez identificados, esta información se utiliza en ciclos iterativos para la mejora de la actividad de los compuestos mediante síntesis orgánica.

1.4.2.1 Identificación de dianas

La identificación y validación de dianas terapéuticas es el paso inicial y necesario para el desarrollo de fármacos. Para que una diana sea considerada útil en terapéutica, debe cumplir varios criterios tales como la influencia en la enfermedad, la capacidad de unión de fármacos (*druggability*), la capacidad de ser adaptada a un ensayo biológico y la especificidad o selectividad. El criterio más importante para la selección de dianas farmacológicas es su capacidad de modificar la enfermedad.

Un enfoque para la identificación de dianas es por medio de una búsqueda de homología; es decir, encontrar ortólogos en el organismo de interés que podrían ser esenciales comparando sus secuencias con una lista de genes esenciales en otros organismos conocidos. Se han desarrollado diferentes recursos y bases de datos como herramientas muy útiles para una exploración de la importancia de una proteína en particular, como por ejemplo, la base de datos de genes esenciales⁹⁰, construida en 2003 y continuamente actualizada con nueva información de registros de genes esenciales de bacterias, arqueas y eucariotas. Esta información se puede utilizar para realizar una búsqueda de proteínas homologas, utilizando el programa BLAST⁹¹. La base de datos de DrugBank⁹² (<http://www.drugbank.ca>) es otra base de datos *online* que contiene amplia información bioquímica y farmacológica sobre los fármacos aprobados, sus mecanismos de acción y sus dianas terapéuticas. La aplicación cruzada de estas herramientas bioinformáticas puede ayudar al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y de algunos fármacos que actúen sobre ellas.

Otras herramientas, tanto quimioinformáticas como de química computacional, para identificar dianas son los estudios de acoplamiento molecular inverso o *reverse docking*^{93, 94}. Implica hacer un estudio de *docking* de un fármaco o molécula pequeña en la potencial cavidad de unión de diferentes dianas clínicamente relevantes. Los análisis detallados de los modos de unión permiten clasificar las

dianas de acuerdo con la fuerza de la unión. Este proceso puede identificar nuevas dianas moleculares relevantes para el ligando, para su mecanismo de acción y/o perfil de efectos secundarios⁹⁵. Las técnicas de ML, como las RRNN, pueden identificar patrones en los objetivos de proteínas, como dominios o modificaciones postraduccionales que pueden estar relacionadas con la unión de un tipo específico de molécula orgánica. Durante el proceso, el sistema artificial aprenderá estos patrones y será capaz de predecir la potencial asociación con un ligando particular^{96, 97}.

1.4.2.2 Modelado de proteínas

También conocido como modelado comparativo o modelado por homología, el objetivo principal del modelado de homología es predecir una estructura tridimensional, con una exactitud similar a resultados obtenidos experimentalmente, mediante modelado comparativo usando secuencias y estructuras similares (secuencia patrón o *template*) ya descritas experimentalmente (**Figura 9**).

Para ello es importante obtener información de diferentes bases de datos acerca de las estructuras resueltas disponibles (*Protein Data Bank*⁷³), o de secuencias de proteínas y genes (*UniProt*⁷², *GeneBank*⁹⁸), de dónde se pueden extraer secuencias y estructuras similares a nuestra diana. En caso de existir estructuras tridimensionales, mediante alineamientos simples o múltiples se pueden seleccionar las mejores secuencias para modelar. En caso de no existir estructuras similares, otros métodos se encargan de realizar alineamientos de la secuencia con fragmentos de estructuras tridimensionales, para así modelar diferentes motivos estructurales, como α -hélices o β -láminas que puedan ser similares. De manera general una mayor similaridad de secuencia entre la secuencia patrón y la secuencia a modelar, resultará en un modelo más preciso, aunque factores como la resolución de las estructuras cristalográficas, las condiciones de cristalización, la presencia de ligandos y la familia de proteína (tanto de la proteína a modelar como de la proteína patrón), pueden influir en la calidad del resultado⁹⁹.

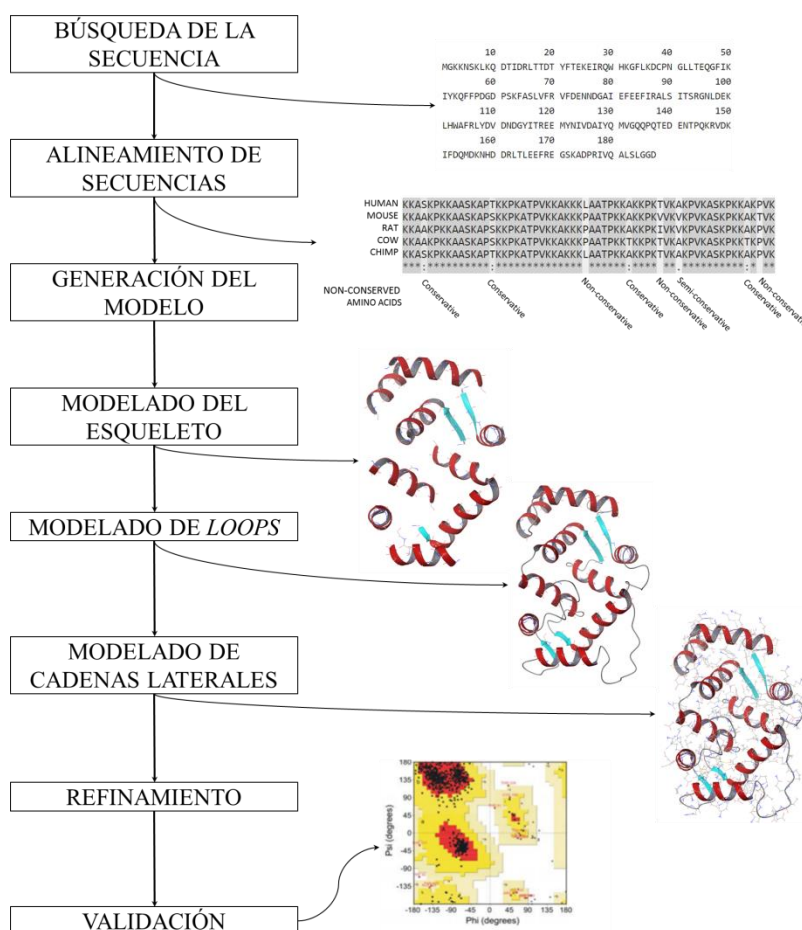


Figura 9. Esquema general del proceso de modelado de proteínas.

Una vez seleccionada la secuencia patrón para el modelo, el siguiente paso es el alineamiento de secuencias. En este paso es importante que las secuencias compartan al menos un 40% de su identidad de secuencia, ya que por debajo del 30% los alineamientos pueden no realizarse correctamente¹⁰⁰. A menor identidad de secuencia, los alineamientos pueden contener un mayor número de espacios vacíos y errores en el alineamiento. Por ejemplo, un alineamiento entre dos proteínas que comparten un 30% de identidad solo tiene un 20% de residuos correctamente alineados¹⁰¹. Existen varios métodos y programas de alineamiento de proteínas, siendo el más utilizado CLUSTAL¹⁰².

La siguiente etapa es la construcción del modelo. En función de las necesidades que se tengan hay diferentes aproximaciones en el modelado, como el ensamblado de cuerpos rígidos, el modelado de segmentos iguales y el modelado cumpliendo restricciones espaciales. De manera general, la construcción de un modelo parte del alineamiento de una o varias secuencias, que son superpuestas, para que en una etapa siguiente se calculen las posiciones promedio de los átomos C_α de los residuos conservados. Posteriormente se buscan las posiciones del resto de átomos de esqueleto de la proteína, obteniéndose así un esqueleto básico de la estructura. Posteriormente se modelarían los átomos del esqueleto que estén en zonas menos conservadas, como los *loops*, para finalmente calcular las

posiciones de los átomos de las cadenas laterales. Tras este paso, se pueden llevar a cabo refinamientos de minimización energética o dinámica molecular de la estructura obtenida. Hay varios programas y servidores web disponibles para el modelado de homología capaz de construir modelos de estructura 3D completos a partir de secuencias, como son Modeller⁶⁸, SwissModel⁷⁰, o Phyre2⁷¹.

1.4.2.3 Docking

Una de las aplicaciones de la mecánica molecular más utilizadas en el descubrimiento de fármacos son los estudios de acoplamiento molecular o *molecular docking*. Estos se centran en el estudio del comportamiento y unión, tanto de ligandos como macromoléculas, en la diana de interés. Los programas de *docking* llevan a cabo búsquedas de diferentes conformaciones del ligando en un espacio rotacional y translacional de seis dimensiones (conocido como *grid* o malla) mediante algoritmos de búsqueda, en los que iterativamente se va llegando a soluciones que convergen en mínimos energéticos. Tras este paso, se evalúan las diferentes poses obtenidas, utilizando funciones de puntuación, para así calcular una afinidad teórica de cada complejo ligando/proteína obtenidos (*docking score*) y clasificarlos. Es importante señalar que para que estos cálculos se lleven a cabo con el menor tiempo posible se suele realizar una aproximación del comportamiento de la macromolécula, tomándola en consideración como una molécula rígida. A pesar de que las biomoléculas presentan un movimiento dinámico, estos métodos no lo consideran, debido al aumento en el tiempo de cálculo que supondría. Si bien es cierto que existen algunas metodologías de *docking* que consideran la flexibilidad de algunos residuos de la diana, ello aumenta el tiempo de cálculo debido al aumento de conformaciones posibles entre ligando y diana¹⁰³.

Los algoritmos de búsqueda se pueden clasificar en tres grupos: métodos sistemáticos (construcción incremental, búsqueda conformacional), métodos estocásticos o aleatorios (Monte Carlo, algoritmos genéticos, búsqueda tabú) y métodos de simulación (dinámicas moleculares o minimización energética)¹⁰⁴. Por otro lado, las funciones de puntuación pueden ser empíricas, basadas en los campos de fuerza y basadas en el conocimiento. Las funciones de puntuación basadas en los campos de fuerza se sustentan en las interacciones físicas entre átomos, como las interacciones de VdW, interacciones electrostáticas y fuerzas de extensión, flexión y torsión de los enlaces entre átomos, además de los términos de energía de solvatación, que se calculan con modelos de solvente continuo, como Poisson-Boltzmann (PB)¹⁰⁵ o Generalized-Born (GB)¹⁰⁶ (Ec. 2):

$$\Delta G_{unión} = \Delta E_{vdw} + \Delta E_{electrostática} + [\Delta E_{enlaces-H}] + \Delta G_{desolvatación} \quad (\text{Ec. 2})$$

Las funciones de campos de fuerza y sus parámetros suelen derivar de datos experimentales y cálculos *ab initio*. Las funciones de puntuación empíricas estiman la afinidad de unión de un complejo en base a un conjunto de términos energéticos promediados (Ec. 3):

$$\Delta G = \sum_i w_i \cdot \Delta G_i \quad (\text{Ec. 3})$$

De tal manera que ΔG_i representa diferentes términos energéticos como la energía de VdW, electrostática, puentes de hidrógenos, desolvatación, entropía, hidrofobicidad, *etc.* Los correspondientes coeficientes w_i están determinados mediante el ajuste de los datos de afinidad de unión de un conjunto de complejos con estructura tridimensional conocida.

Por último, las funciones basadas en el conocimiento emplean potenciales derivados de información estructural, determinada experimentalmente a partir de estructuras atómicas. Esto quiere decir que las parejas de potenciales se obtienen directamente de la frecuencia de ocurrencia de parejas atómicas en una base de datos usando una relación inversa de Boltzmann (Ec. 4.1-4.2).

$$w(r) = -k_b T \ln[g(r)] \quad (4.1)$$

$$g(r) = \rho(r)/\rho^*(r) \quad (4.2)$$

en donde k_b es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta del sistema, $\rho(r)$ es la densidad de la pareja de átomos del ligando y la proteína a una distancia r y $\rho^*(r)$ es la densidad en un estado referencia en el que las interacciones interatómicas son cero.

En una comparación de los diferentes métodos de puntuación, las funciones empíricas emplean menos tiempo de cálculo que las basadas en campos de fuerza, debido a que los términos energéticos son más sencillos. Las funciones basadas en el conocimiento ofrecen una mejor relación entre precisión y tiempo de cálculo frente a las otras dos, pero es más complicado de parametrizar, debido a la necesidad de obtener los valores experimentales de referencia¹⁰⁷. En la **Tabla 2** aparecen algunos de los programas de *docking* más utilizados en la actualidad y sus algoritmos de búsqueda y puntuación.

Lo ideal es que los métodos de búsqueda conformacional sean capaces de aportar la mayor variedad de complejos ligando-proteína posibles, y que las funciones de puntuación sean capaces de descartar los peores complejos, quedando únicamente los más estables. La realidad es que no siempre sucede esto, ya que la técnica cuenta con una serie de limitaciones¹⁰⁸. El resultado de las funciones de puntuación muchas veces viene dado por la naturaleza química del compuesto a estudiar, la valoración de la aportación de cada una de las interacciones a la estabilidad del complejo, la correcta valoración de la flexibilidad de la diana, y por la propia naturaleza de los cálculos utilizando mecánica molecular, una aproximación reduccionista que no tiene en cuenta la naturaleza atómica al completo.

Tabla 2. Programas de *docking* y sus algoritmos de búsqueda

Métodos de búsqueda conformacional	Programas informáticos
Aleatorio/Estocástico	AutoDock ¹⁰⁹ MOE ¹¹⁰ GOLD ¹¹¹
Sistemático	DOCK ¹¹² FlexX ¹¹³ Glide ¹¹⁴
Simulación	DOCK Glide MOE AutoDock
Funciones de puntuación	
Basadas en campos de fuerza	GOLD AutoDock DOCK
Empíricas	Glide ChemScore ¹¹⁵ LUDI ¹¹⁶
Basadas en el conocimiento	DrugScore ¹¹⁷

A pesar de sus limitaciones, las técnicas de *docking* son muy útiles en el descubrimiento de fármacos hoy en día. El estudio del modo de unión de compuestos en diferentes dianas y el desarrollo de relaciones estructura-actividad, es fundamental para el desarrollo racional de programas de química médica en los que mejorar la afinidad de los ligandos¹¹⁸.

1.4.2.4 Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (MD) son aproximaciones basadas en mecánica molecular, que consiguen resolver la ecuación de movimiento de Newton, teniendo en cuenta otras funciones matemáticas que representan las fuerzas internas de las moléculas y las interacciones intra- e intermoleculares, siendo capaces de simular el movimiento atómico en condiciones fisiológicas y así obtener información acerca de la evolución, a lo largo de un tiempo determinado, de macromoléculas biológicas^{119, 120}. Los estudios de dinámica molecular son capaces de simular las condiciones experimentales del entorno fisiológico, generando un sistema, en el que macromoléculas diana y ligandos se encuentran en disolución (utilizando tanto modelos de solvatación implícita como

PBSA o GBSA como modelos de solvatación explícita como SPC, TIP3P o TIP4P), considerando un ajuste deseado de presión y temperatura del sistema y teniendo en cuenta también tanto la energía interna del sistema como las interacciones de VdW y electrostáticas de largo alcance.

El objetivo de estas simulaciones es la recreación del comportamiento de moléculas de naturaleza biológica y química en su entorno fisiológico teórico. Esto permite analizar los cambios conformacionales de las proteínas, los perfiles de interacción entre proteínas y ligandos y una valoración mejor de la energía libre del sistema.

Uno de los factores más limitantes de las simulaciones de dinámica molecular es el tiempo de cálculo. Estos estudios conllevan un gran coste computacional, aunque recientemente se han desarrollado aproximaciones para poder llevar a cabo estos cálculos en paralelo en varios procesadores, en *clusters* de computación (superordenadores), o en tarjetas gráficas (GPU). Estos avances han permitido la mejora en la velocidad de cálculo de 5 nanosegundos por día hasta al menos 100 nanosegundos/día¹²¹, siendo así posible el estudio de franjas de tiempo mucho mayores en estas simulaciones. Así, se ha evolucionado desde los primeros estudios que simulaban unos pocos picosegundos hasta algunas simulaciones en la actualidad, capaces de simular milisegundos¹²¹.

El tiempo total de la simulación es un factor limitante, debido a que para apreciar cambios conformacionales drásticos en las trayectorias de la simulación a veces hace falta estudiar mucho tiempo el sistema. Por esto, se han desarrollado métodos para acelerar la búsqueda conformacional en las simulaciones, como la dinámica molecular acelerada¹²², dinámica molecular escalada¹²³, *umbrella sampling*¹²⁴, *etc.* Aumentando la búsqueda conformacional por diferentes métodos, lo que se consigue es una valoración de un número mayor de conformeros en un menor tiempo de cálculo.

Las simulaciones de dinámica molecular han representado un gran avance en la química computacional, y en su aplicación a otras ciencias, como la química médica. Gracias a ellas, se puede llevar a cabo una correcta valoración de la flexibilidad de las macromoléculas para estudiar con mayor detalle y precisión el comportamiento y modos de unión de diferentes ligandos, cambios conformacionales en dianas en la búsqueda de diferentes conformaciones activas o inactivas, refinamiento de estructuras, cálculos de energía libre, búsqueda de bolsillos alostéricos entre otros estudios.

1.4.2.5 Cribado virtual

En la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica, el cribado virtual es en la actualidad uno de las técnicas que mayor aplicación y éxito han tenido en los últimos años. Esta técnica está basada en un proceso de varias etapas sucesivas, en las que librerías de compuestos químicos en formato digital son sometidas a diferentes filtros, con el objetivo de obtener un conjunto

de compuestos, reducido y prometedor, para su ensayo biológico. Los filtros que se pueden utilizar en este campo son muy diversos, siempre en función de la información disponible. Se pueden aplicar desde filtros formados por modelos QSAR, modelos de farmacóforo, propiedades fisicoquímicas y tipo-fármaco, modelos de redes neuronales, resultados de estudios de *docking* y perfiles de interacción ligando-diana, entre otros. A pesar de estar clasificado como una técnica de diseño de fármacos basada en la estructura, el cribado virtual es una técnica que se puede aplicar desde ambas aproximaciones, tanto desde la aproximación de la estructura de la diana como de los ligandos, pudiendo así aprovechar toda la información posible para la selección de los compuestos más prometedores (**Figura 10**).

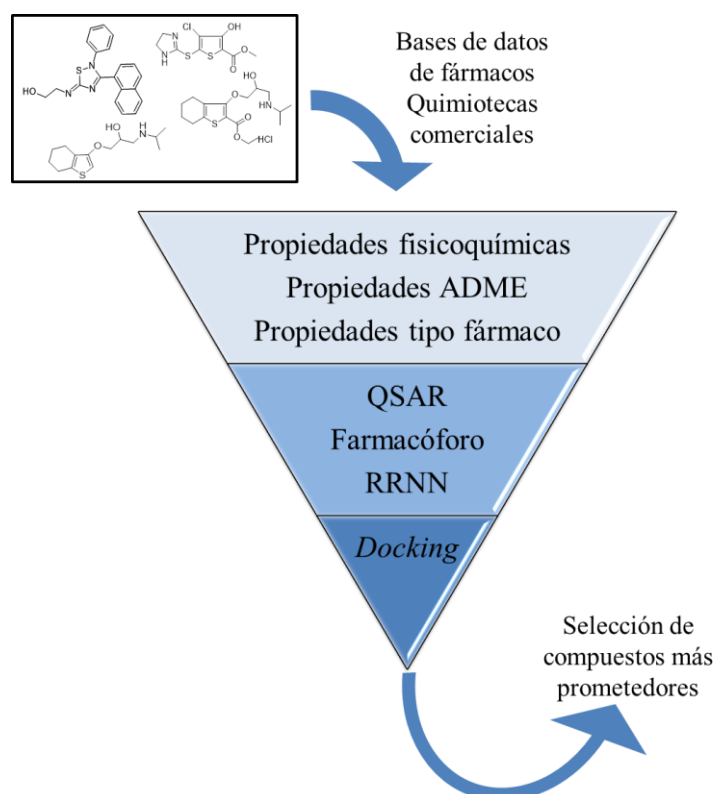


Figura 10. Esquema del proceso de cribado virtual de compuestos. Diferentes filtros son aplicados a lo largo del proceso con el fin de seleccionar para su ensayo a los compuestos más prometedores.

En la actualidad, el cribado virtual está ganando terreno al HTS debido al ahorro en tiempo y costes¹²⁵. De esta manera, se puede estudiar el modo de unión en una diana de librerías virtuales de moléculas orgánicas compuestas por cientos de miles de moléculas, para seleccionar únicamente los ligandos más prometedores y estudiar su actividad *in vitro*.

En conjunto, todos los campos que son englobados por el modelado molecular tienen una gran aplicación y utilidad hoy en día en la búsqueda y descubrimiento de fármacos. Los químicos médicos encuentran a su disposición una gran cantidad de recursos diferentes y de aplicaciones para generar información que pueda repercutir en mejorar la naturaleza, eficacia, y en general, la calidad de los posibles fármacos a desarrollar, intentando maximizar sus opciones de éxito.

Introducción

Las aplicaciones de todas estas técnicas quimioinformáticas y computacionales son hoy en día claves para la identificación y desarrollo de fármacos identificando *hits* o prototipos, y teniendo un papel relevante en las etapas de optimización (*hit-to-lead* y *lead-to-candidate*).

1.5 REFERENCIAS

1. Prusiner, S. B. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* **2001**, 344, 1516-26.
2. Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **2007**, 3, 186-91.
3. WHO. Dementia. Alzheimer's disease facts and figures. **2017**.
4. Dugger, B. N.; Dickson, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2017**, 9.
5. Mok, W.; Chow, T. W.; Zheng, L.; Mack, W. J.; Miller, C. Clinicopathological concordance of dementia diagnoses by community versus tertiary care clinicians. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* **2004**, 19, 161-5.
6. Yiannopoulou, K. G.; Papageorgiou, S. G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord* **2013**, 6, 19-33.
7. Lin, J.; Sahakian, D. C.; de Morais, S. M.; Xu, J. J.; Polzer, R. J.; Winter, S. M. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Curr Top Med Chem* **2003**, 3, 1125-54.
8. Cavalli, A.; Carloni, P.; Recanatini, M. Target-related applications of first principles quantum chemical methods in drug design. *Chem Rev* **2006**, 106, 3497-519.
9. Rowland, M.; Tozer, T. N. Section 1, Absorption and distribution kinetics in Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications. In Lippincott Williams and Wilkins: 1995; pp 11-50.
10. Caldwell, J.; Gardner, I.; Swales, N. An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicol Pathol* **1995**, 23, 102-14.
11. Meijer, D. K.; Groothuis, G. M. M. Hepatic transport of drugs and proteins. In *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*, McIntyre, N.; Ben Haman, J.; Bircher, H., Eds. Oxford University Press: Oxford, 1991; Vol. 1, pp 40-78.
12. Jolliet-Riant, P.; Tillement, J. P. Drug transfer across the blood-brain barrier and improvement of brain delivery. *Fundam Clin Pharmacol* **1999**, 13, 16-26.
13. Kumar, G. N.; Surapaneni, S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med Res Rev* **2001**, 21, 397-411.
14. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46, 3-26.
15. AEMPS. Cómo se regulan los medicamentos y productos sanitarios en España. https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/regulacion_med-PS/home.htm
16. Kola, I.; Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **2004**, 3, 711-5.
17. DiMasi, J. A.; Grabowski, H. G.; Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ* **2016**, 47, 20-33.
18. Mullard, A. 2016 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, 16, 73-76.
19. Kalyanamoorthy, S.; Chen, Y. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov Today* **2011**, 16, 831-9.
20. Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx* **2005**, 2, 541-53.
21. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* **2004**, 303, 1813-8.
22. Hill, T. L. On Steric Effects. *The Journal of Chemical Physics* **1946**, 14, 465.
23. Hill, T. L. Steric effects. I. Van der Waals potential energy curves. *The Journal of Chemical Physics*. **1948**, 16, 399.
24. Westheimer, F. H.; Mayer, J. E. The theory of racemization of optically active derivatives of diphenyl. *The Journal of Chemical Physics*. **1946**, 14, 733.
25. Barton, D. H. R. Interaction between non-bonded atoms, and the structure of cis-decalin. *Journal of the Chemical Society*. **1948**, 340.
26. Barton, D. H. R. The conformation of the steroid nucleus. *Experientia* **1950**, 6, 316.
27. Pauling, L.; Corey, R. B. The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, 37, 251.
28. Pauling, L.; Corey, R. B.; Branson, H. R. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, 37, 205.

29. Allinger, N. L. Conformational analysis. III. Applications to some medium ring compounds. *Journal of the American Chemical Society* **1959**, 81, 5727.
30. Bartell, L. S. On the effects of intramolecular van der Waals forces. *The Journal of Chemical Physics* **1960**, 32, 827.
31. Wiberg, K. B. A scheme for strain energy minimization. Application to the cycloalkanes. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, 87, 1070.
32. Allinger, N. L.; Sprague, J. T. Calculation of the structures of hydrocarbons containing delocalized electronic systems by the molecular mechanics method. *Journal of the American Chemical Society*. **1973**, 95, 38993.
33. Kitaigorodsky, A. I. The interaction curve of non-bonded carbon and hydrogen atoms and its application. *Tetrahedron*. **1961**, 14, 230.
34. Lifson, S.; Warshel, A. Consistent force field for calculations of conformations, vibrational spectra, and enthalpies of cycloalkane and n-alkane molecules. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, 49, 5116.
35. Warshel, A.; Lifson, S. Consistent force field calculations. II. Crystal structures, sublimation energies, molecular and lattice vibrations, molecular conformations, and enthalpies of alkanes. *The Journal of Chemical Physics* **1970**, 53, 582.
36. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*. **1963**, 7, 95.
37. Jack, A.; Levitt, M. Refinement of large structures by simultaneous minimization of energy and R factor. *Acta Crystallographica A*. **1978**, 34, 931-935.
38. Rahman, A.; Stillinger, F. H. Molecular dynamics study of liquid water. *Journal of Chemical Physics* **1971**, 55, 3336-3359.
39. Konnert, J. H.; Hendrickson, W. A. A restrained-parameter thermal factor refinement procedure. *Acta Crystallographica A*. **1980**, 36, 344-350.
40. McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature* **1977**, 267, 585-610.
41. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the Cartesian equation of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*. **1977**, 23, 327-341.
42. Jorgensen, W. L.; Chandrasekar, J.; Madura, J.; Impey, R.; Klein, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*. **1983**, 79, 926-935.
43. Warshel, A.; Russell, S. T. Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions. *Quarterly review of Biophysics* **1984**, 17, 283-422.
44. Wang, W.; Donini, O.; Reyes, C. M.; Kollman, P. A. Biomolecular simulations: recent development in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid non-covalent interactions. *Annual review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2001**, 30, 211-243.
45. Nobelprize.org. The Nobel Prize in Chemistry 1998. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1998/
46. Nobelprize.org. The Nobel Prize in Chemistry 2013. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/
47. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*. Second Edition ed.; 2007.
48. Kitaura, K.; Morokuma, K. A new energy decomposition scheme for molecular interactions within the Hartree-Fock approximation. *International Journal of Quantum Chemistry* **1976**, 10, 325-340.
49. Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 6474-6487.
50. Guallar, V.; Friesner, R. A. Cytochrome P450CAM enzymatic catalysis cycle: a quantum mechanics/molecular mechanics study. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 8501-8.
51. Gherman, B. F.; Goldberg, S. D.; Cornish, V. W.; Friesner, R. A. Mixed quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) study of the deacylation reaction in a penicillin binding protein (PBP) versus in a class C beta-lactamase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7652-7664.
52. O., d. S. C.; C., d. S. E.; C., N. M. A. Ab Initio calculations of absolute pKa values in aqueous solution I. Carboxylic Acids. *J Phys Chem A*. **1999**, 103, 11194-9.
53. Brown, K. F. Chemoinformatics: What is and how does it impact drug discovery. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1998**, 33, 375-384.
54. Tong, W.; Lowis, D. R.; Perkins, R.; Chen, Y.; Welsh, W. J.; Goddette, D. W.; Heritage, T. W.; Sheehan, D. M. Evaluation of quantitative structure-activity relationship methods for large-scale prediction of chemicals binding to the estrogen receptor. *J Chem Inf Comput Sci* **1998**, 38, 669-77.

55. Khedkar, S. A.; Malde, A. K.; Coutinho, E. C.; Srivastava, S. Pharmacophore modeling in drug discovery and development: an overview. *Med Chem* **2007**, *3*, 187-97.
56. Oprea, T. I. Virtual Screening in Lead Discovery: A Viewpoint. *Molecules* **2002**, *7*, 51-62.
57. Luscombe, N. M.; Greenbaum, D.; Gerstein, M. What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. *Methods Inf Med* **2001**, *40*, 346-358.
58. Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 5959-67.
59. Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem* **1994**, *37*, 4130-46.
60. Dixon, S. L.; Smondyrev, A. M.; Knoll, E. H.; Rao, S. N.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A. PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *J Comput Aided Mol Des* **2006**, *20*, 647-71.
61. Gilson, M. K.; Liu, T.; Baitaluk, M.; Nicola, G.; Hwang, L.; Chong, J. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, D1045-53.
62. Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, D668-72.
63. Frank, E.; Hall, M.; Trigg, L.; Holmes, G.; Witten, I. H. Data mining in bioinformatics using Weka. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 2479-81.
64. Stud, M. C. v. r. e.
65. Bochevarov, A. D.; Harder, E.; Hughes, T. F.; Greenwood, J. R.; Braden, D. A.; Philipp, D. M.; Rinaldo, D.; Halls, M. D.; Zhang, J.; Friesner, R. A. Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences. *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, *113*, 2110-2142.
66. Mauri, A.; Consonni, V.; Pavan, M.; Todeschini, R. DRAGON software: an easy approach to molecule descriptor calculations. *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.* **2006**, *56*, 237-248.
67. Schrödinger Release 2017-4: QikProp, S., LLC, New York, NY, 2017.
68. Webb, B.; Salil, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, I., Ed. 2014.
69. Jacobson, M. P.; Pincus, D. L.; Rapp, C. S.; Day, T. J.; Honig, B.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* **2004**, *55*, 351-67.
70. Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Gallo Cassarino, T.; Bertoni, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, W252-8.
71. Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **2015**, *10*, 845-58.
72. The UniProt, C. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, D158-D169.
73. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 235-42.
74. Bienert, S.; Waterhouse, A.; de Beer, T. A.; Tauriello, G.; Studer, G.; Bordoli, L.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, D313-D319.
75. Castrignano, T.; De Meo, P. D.; Cozzetto, D.; Talamo, I. G.; Tramontano, A. The PMDB Protein Model Database. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, D306-9.
76. Case, D. A.; Cheatham, T. E., 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M., Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* **2005**, *26*, 1668-88.
77. Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* **1995**, *91*, 43-56.
78. Bowers, K. J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R. O.; Eastwood, M. P.; Gregersen, B. A.; Klepeis, J. L.; Kolossvary, I.; Moraes, M. A.; Sacerdoti, F. D.; Salmon, J. K.; Shan, Y.; E., S. D. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. In *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*, Tampa, Florida, 2006.
79. Brügger, W. E.; Stuper, A. J.; Jurs, P. C. Generation of Descriptors from Molecular Structures. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1976**, *16*, 105-110.
80. Weiser, J.; Shenkin, P. S.; Still, W. C. Approximate solvent-accessible surface areas from tetrahedrally directed neighbor densities. *Biopolymers* **1999**, *50*, 373-80.

81. Muegge, I.; Mukherjee, P. An overview of molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Expert Opin Drug Discov* **2016**, *11*, 137-48.
82. Damale, M. G.; Harke, S. N.; Kalam Khan, F. A.; Shinde, D. B.; Sangshetti, J. N. Recent advances in multidimensional QSAR (4D-6D): a critical review. *Mini Rev Med Chem* **2014**, *14*, 35-55.
83. Dudek, A. Z.; Arodz, T.; Galvez, J. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): a review. *Comb Chem High Throughput Screen* **2006**, *9*, 213-28.
84. Yang, S. Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discov Today* **2010**, *15*, 444-50.
85. Radoux, C. J.; Olsson, T. S.; Pitt, W. R.; Groom, C. R.; Blundell, T. L. Identifying Interactions that Determine Fragment Binding at Protein Hotspots. *J Med Chem* **2016**, *59*, 4314-25.
86. Redondo, M.; Palomo, V.; Brea, J.; Perez, D. I.; Martin-Alvarez, R.; Perez, C.; Paul-Fernandez, N.; Conde, S.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Mengod, G.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. Identification in silico and experimental validation of novel phosphodiesterase 7 inhibitors with efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *ACS Chem Neurosci* **2012**, *3*, 793-803.
87. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1157-74.
88. Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J Mol Biol* **1976**, *103*, 227-249.
89. Dearden, J. C. Prediction of Physicochemical Properties. In *Computational Toxicology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Reisfeld B., M. A., Ed. Humana Press, Totowa, NJ: 2012; Vol. 929.
90. Zhang, R.; Ou, H. Y.; Zhang, C. T. DEG: a database of essential genes. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, D271-2.
91. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **1990**, *215*, 403-10.
92. Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A.; Chin, L.; Cummings, R.; Le, D.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, D1074-D1082.
93. Rognan, D. Structure-Based Approaches to Target Fishing and Ligand Profiling. *Mol Inform* **2010**, *29*, 176-87.
94. Jenkins, J. L.; Tanner, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2006**, *62*, 290-301.
95. Kharkar, P. S.; Warriar, S.; Gaud, R. S. Reverse docking: a powerful tool for drug repositioning and drug rescue. *Future Med Chem* **2014**, *6*, 333-42.
96. Bulashevskaya, A.; Stein, M.; Jackson, D.; Eils, R. Prediction of small molecule binding property of protein domains with Bayesian classifiers based on Markov chains. *Comput Biol Chem* **2009**, *33*, 457-60.
97. Thangudu, R. R.; Tyagi, M.; Shoemaker, B. A.; Bryant, S. H.; Panchenko, A. R.; Madej, T. Knowledge-based annotation of small molecule binding sites in proteins. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 365.
98. Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Wheeler, D. L. GenBank: update. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, D23-6.
99. Srinivasan, N.; Blundell, T. L. An evaluation of the performance of an automated procedure for comparative modelling of protein tertiary structure. *Protein Eng* **1993**, *6*, 501-12.
100. Rost, B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng* **1999**, *12*, 85-94.
101. Johnson, M. S.; Overington, J. P. A structural basis for sequence comparisons. An evaluation of scoring methodologies. *J Mol Biol* **1993**, *233*, 716-38.
102. Jeanmougin, F.; Thompson, J. D.; Gouy, M.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **1998**, *23*, 403-5.
103. Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J Med Chem* **2006**, *49*, 534-53.
104. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 935-49.
105. Gilson, M. K.; Given, J. A.; Head, M. S. A new class of models for computing receptor-ligand binding affinities. *Chem Biol* **1997**, *4*, 87-92.
106. Zou, X.; Kuntz, I. D. Inclusion of solvation in ligand binding free energy calculations using the Generalized-Born model. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8033-8043.
107. Huang, S. Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys Chem Chem Phys* **2010**, *12*, 12899-908.

108. Chen, Y. C. Beware of docking! *Trends Pharmacol Sci* **2015**, 36, 78-95.
109. Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J Mol Recognit* **1996**, 9, 1-5.
110. Molecular Operating Environment (MOE), C. C. G. U., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017.
111. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* **1997**, 267, 727-48.
112. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* **1982**, 161, 269-88.
113. Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* **1996**, 261, 470-89.
114. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* **2004**, 47, 1739-49.
115. Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J Comput Aided Mol Des* **1997**, 11, 425-45.
116. Bohm, H. J. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J Comput Aided Mol Des* **1994**, 8, 243-56.
117. Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol* **2000**, 295, 337-56.
118. Lybrand, T. P. Ligand-protein docking and rational drug design. *Curr Opin Struct Biol* **1995**, 5, 224-8.
119. Cheatham, T. E., 3rd; Kollman, P. A. Molecular dynamics simulation of nucleic acids. *Annu Rev Phys Chem* **2000**, 51, 435-71.
120. Karplus, M. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Acc Chem Res* **2002**, 35, 321-3.
121. Loukatou, S.; Papageorgiou, L.; Fakourelis, P.; Filntisi, A.; Polychronidou, E.; Bassis, I.; Megalooikonomou, V.; Makalowski, W.; Vlachakis, D.; Kossida, S. Molecular dynamics simulations through GPU video games technologies. *J Mol Biochem* **2014**, 3, 64-71.
122. Hamelberg, D.; Mongan, J.; McCammon, J. A. Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules. *J Chem Phys* **2004**, 120, 11919-29.
123. Sinko, W.; Miao, Y.; de Oliveira, C. A.; McCammon, J. A. Population based reweighting of scaled molecular dynamics. *J Phys Chem B* **2013**, 117, 12759-68.
124. Warmflash, A.; Bhimalapuram, P.; Dinner, A. R. Umbrella sampling for nonequilibrium processes. *J Chem Phys* **2007**, 127, 154112.
125. Lionta, E.; Spyrou, G.; Vassilatis, D. K.; Cournia, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Curr Top Med Chem* **2014**, 14, 1923-38.

OBJETIVOS GENERALES

*“Lo que sabemos es una gota de agua,
lo que ignoramos es el océano”*

Isaac Newton

OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS

Esta tesis doctoral se enmarca en el descubrimiento de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas mediante la aplicación de herramientas de modelado molecular. El objetivo fundamental es la aplicación de diferentes aproximaciones computacionales para la identificación y desarrollo de nuevos neurofármacos, así como para el estudio y análisis de su posible mecanismo de acción.

Para llevar a cabo este propósito, se han desarrollado tres proyectos independientes centrados en diferentes patologías neurológicas tales como la enfermedad de Alzheimer, la atrofia muscular espinal y el síndrome de frágil-X. Cada uno de estos proyectos centrará la discusión de un capítulo, exponiéndose los objetivos específicos en cada uno de los capítulos, siendo los temas de cada capítulo:

- la búsqueda de moduladores alostéricos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer,
- la identificación de inhibidores de kinasas en el tratamiento de atrofia muscular espinal
- la búsqueda de nuevos inhibidores de interacción proteína-proteína para el tratamiento del síndrome de frágil-X.

CAPÍTULO 1

ALOSTERISMO EN ALZHEIMER

*“La ciencia se compone de
errores, que a su vez, son
los pasos hacia la verdad”*

Julio Verne

CAPITULO 1. ALOSTERISMO EN ALZHEIMER

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa, descrita por primera vez en el año 1906¹. Esta enfermedad, caracterizada por el avance lento, silencioso y progresivo del daño en el cerebro humano, se encuentra actualmente sin cura. Los primeros síntomas de la EA son fallos en la memoria y deterioro cognitivo, que avanzan hasta la pérdida completa de la memoria y cambios en el comportamiento². Se estima que en el año 2030, 65.7 millones de personas en el mundo sufrirán demencia, afectando principalmente a aquellas personas que superen los 65 años. Algunas predicciones elevan el número de enfermos hasta los 115.4 millones en el año 2050³. En el año 2008, el coste anual total estimado en el tratamiento de pacientes diagnosticados con demencia en la Unión Europea fue de 22.000 euros por paciente, elevándose a un total de 177 billones de euros. La mayor parte del coste (56%) está relacionado con los cuidados del paciente, sin tener en cuenta tratamientos médicos o farmacológicos.

La EA es una patología multifactorial, en la que el funcionamiento normal de varios procesos celulares se ven afectados, provocando finalmente la muerte de las células neuronales. Históricamente, la hipótesis colinérgica fue el primer mecanismo estudiado como responsable de dicha enfermedad. Debido a la muerte neuronal producida por la EA, se produce una menor neurotransmisión colinérgica existiendo niveles menores de acetilcolina (ACh) en el espacio sináptico, por ello los inhibidores del enzima acetilcolinesterasa (AChE) encargado de degradar la ACh, pueden ayudar a aumentar los niveles del neurotransmisor en la sinapsis. También se

han estudiado ampliamente los procesos de plegamiento erróneo de proteínas, su agregación y formación de depósitos, como es el caso de la proteína beta-amiloide ($A\beta$) y de los ovillos neurofibrilares debidos a la hiperfosforilación de la proteína tau. A su vez, se ha podido comprobar que las funciones de aclaramiento celular mediante autofagia se ven comprometidas, impidiendo la degradación de depósitos de agregados proteicos. Otro de los factores patogénicos involucrados es la inflamación de los tejidos neuronales, o neuroinflamación, que puede ser provocada tanto por el envejecimiento celular, factores genéticos o ambientales, estrés oxidativo y la presencia de agregados proteicos anómalos. Todos estos factores juegan un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad, sin conocerse con exactitud cuál es el desencadenante inicial, lo cual es un punto de gran interés y conflicto entre los propios científicos.

Se han investigado diversas aproximaciones terapéuticas para encontrar un tratamiento efectivo en la EA, algunas de ellas centradas en el aumento de la actividad colinérgica, actuando tanto a nivel de receptores muscarínicos M1 como de α -7 nicotínicos. Este es el caso de cevimeлина (aprobado por la FDA para evitar la sequedad de boca en el síndrome de Sjogren) y enceniclina (EVP-6124, caído en fase clínica 2), respectivamente⁴. Otra aproximación muy importante estudiada ha sido la modulación de los enzimas involucrados en la escisión proteolítica de la proteína precursora de amiloide (APP) debida a la neurotoxicidad del metabolito del $A\beta_{(1-42)}$ en la formación de las placas seniles y depósitos solubles oligoméricos de $A\beta^5$. En este sentido, la inhibición del enzima de escisión de la proteína precursora amiloide por el sitio β -1 (β -secretasa, BACE-1) llevó al fármaco verubecestat (MK8931) hasta ensayos clínicos⁶, estando actualmente en fase 3. Por otro lado, los efectos antineuroinflamatorios de la minociclina, un antibiótico en uso del grupo de las tetraciclinas, han establecido la relación entre la reducción de citoquinas/quimiocinas y microgliosis en el cerebro del paciente con EA y la neuroprotección⁷. Teniendo en cuenta el papel crítico desempeñado por las modificaciones anormales postraduccionales de la proteína tau en la neuropatogénesis de la EA, se desarrolló el agente estabilizador de microtúbulos, davunetide, fallando en el ensayo clínico de Fase II⁸. Por otro lado, el azul de metileno y su forma reducida, leucometiltioninio, mostraron una alta inhibición de la agregación de tau y su afinidad por las células del hipocampo, siendo la segunda generación de colorante de metiltioninio (TRx0237) la que avanzó hasta ensayos clínicos gracias a la optimización de su biodisponibilidad⁸. Por último, tratamientos como la inmunoterapia anti- $A\beta$, que involucra anticuerpos monoclonales anti- $A\beta$ (solanezumab, gantenerumab y aducanumab)⁹, y vacunas activas para el aclaramiento de tau inducido por anticuerpos, como AADvac1, están en investigación para el tratamiento de EA, pero por el momento ninguno de ellos ha sido capaz de llegar al mercado.

Los únicos tratamientos farmacológicos sintomáticos para la EA en fase leve-moderado existentes al día de hoy tratan de restaurar el equilibrio sináptico, aumentando los niveles de ACh, mediante la inhibición del enzima que la degrada, la AChE. Los fármacos aprobados son el donepezilo, galantamina, rivastigmina y tacrina. Este último ha sido retirado debido a problemas de hepatotoxicidad. También existe un antagonista del receptor de glutamato NMDA, memantina, para el tratamiento de los estadios avanzados de la enfermedad. A pesar de que los inhibidores de AChE no son capaces de parar el avance de la enfermedad, estos fármacos son capaces de mejorar la calidad de vida de los pacientes y cuidadores¹⁰.

En resumen, podríamos decir que la primera hipótesis investigada para el tratamiento de esta patología, la hipótesis colinérgica, ha sido la única que ha resultado en fármacos actualmente comercializados. Actualmente, las estrategias más investigadas para futuros tratamientos que eviten el avance de la enfermedad se centran en evitar la hiperfosforilación de tau y los depósitos de placas de β -amiloide (**Figura 1.1**). La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad crónica, y como tal, las alternativas farmacológicas que surgen para su tratamiento se deberán administrar de manera crónica en los pacientes. Además es importante tener en cuenta que, en la actualidad, los pacientes de más de 65 años pueden ser pacientes polimedicados, por lo que los fármacos que se diseñen para esta enfermedad deben ser fármacos tanto eficaces como seguros a largo plazo.

La naturaleza multifactorial de la EA, en la que se encuentran involucradas una gran variedad de cascadas de señalización y procesos celulares, aumenta la complejidad en la obtención de un tratamiento eficaz fallando habitualmente la hipótesis “un fármaco-una diana”. El desarrollo de fármacos multidiana, compuestos que tienen actividad biológica en varias dianas terapéuticas a la vez, ofrece con un único compuesto aunar los efectos biológicos de varios fármacos por separado¹¹, siendo una de las áreas de interés actuales en esta patología. Esta estrategia se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas como la unión mediante un *linker* de dos moléculas biológicamente activas en dianas diferentes, manteniendo la actividad de ambas en sus respectivas dianas; o buscando compuestos híbridos que aúnen características químicas de inhibidores de varias dianas, comportándose como inhibidores de esas mismas dianas de manera selectiva. Otra aproximación en auge es la búsqueda de moduladores alostéricos, es decir, compuestos que se unen a las dianas en regiones diferentes a su centro activo, modulando tanto su actividad catalítica como el reconocimiento de sustratos y actividades secundarias^{12, 13}.

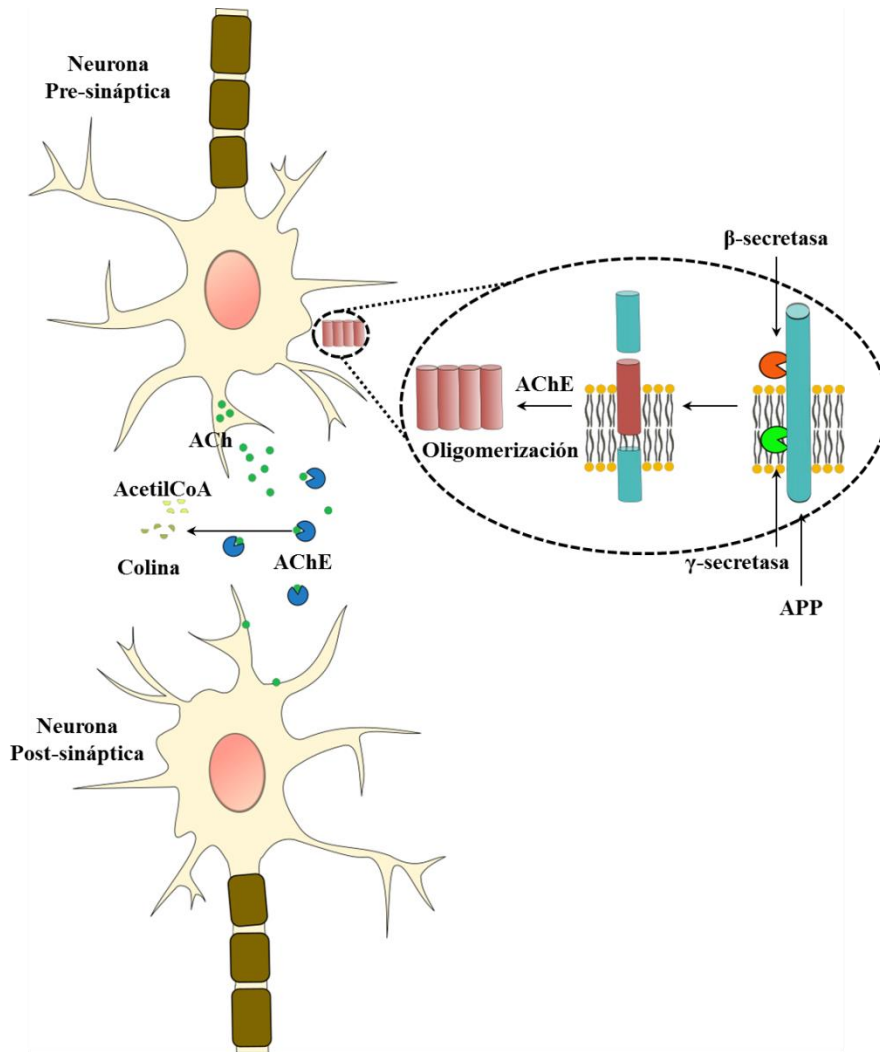


Figura 1.1. Esquema de las hipótesis colinérgica y amiloide en la EA.

1.1 Alosterismo

“La actividad biológica de muchas proteínas está controlada por metabolitos específicos que no interaccionan directamente con los sustratos o productos de las reacciones. El efecto de estos agentes reguladores parece ser el resultado exclusivo de una alteración conformacional (transición alostérica) inducida en la proteína cuando se une al agente. Se sugiere que este mecanismo desempeña un papel esencial en la regulación de la actividad metabólica y también posiblemente en el control específico de la síntesis de proteínas”¹⁴. Con esta frase Jacques Monod introdujo por primera vez en 1963 el concepto de alosterismo, que desde entonces se ha expandido notablemente. Actualmente se considera el alosterismo como una capacidad inherente de todas las proteínas y otras macromoléculas de importancia biológica, un fenómeno universal en el que una perturbación llevada a cabo por una molécula en la diana conlleva un cambio funcional en ésta, tanto por la alteración de la diana, como por la alteración de su estructura, favoreciendo cambios conformacionales y/o por cambios en su movimiento flexible y dinámico debido a la formación de complejos entrópicamente más estables (**Figura 1.2**)¹⁵.

Cada diana posee un sitio de unión específico para sus ligandos endógenos, definido como sitio de unión ortostérico, siendo por ejemplo en proteínas quinasas el sitio de unión de ATP. En contraposición a este sitio, los sitios de unión alostérica están ubicados en diferentes regiones de la diana, con topologías y funciones diferentes, permitiendo numerosos fenómenos de reconocimiento molecular e interacciones ligando-diana.

Los sitios alostéricos de una familia de receptores o proteínas presentan una menor conservación de los residuos entre sí, permitiendo mejores niveles de selectividad en los ligandos que se unan a ellos. Además, los moduladores alostéricos poseen un techo en su efecto de tal manera que cuando los sitios alostéricos están ocupados, no se observan efectos adicionales, siendo sus efectos saturables. Es interesante remarcar que los moduladores alostéricos pueden ejercer su modulación farmacológica de varios modos, potenciando la respuesta de la diana a un agonista (moduladores alostéricos positivos; PAM), disminuyendo la actividad de la diana de manera no competitiva (moduladores alostéricos negativos; NAM) o uniéndose al sitio alostérico sin efectos sobre la actividad principal de la diana, ocupando el sitio e influyendo en el reconocimiento molecular¹⁶.

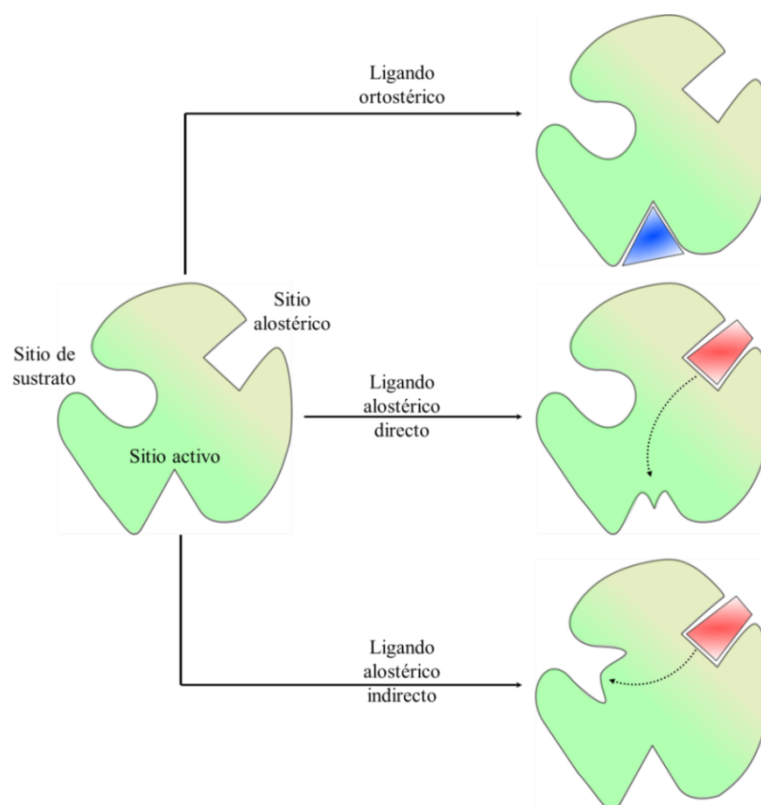


Figura 1.2. Representación de diferentes mecanismos de modulación de la actividad de una diana, mediante inhibición ortostérica e inhibición alostérica directa e indirecta. La unión de un ligando alostérico puede inducir cambios conformacionales en diferentes regiones de la diana, modulando de diferente modo sus funciones¹⁷.

Aunque las ventajas de los moduladores alostéricos son muchas en cuanto a especificidad, seguridad y modulación dual (tanto de la función de la diana como de las posibles funciones secundarias de reconocimiento molecular), también hay que ser conscientes de sus desventajas o complicaciones a la hora del desarrollo de estos moduladores. Por una parte, la limitada presión evolutiva sobre los sitios alostéricos puede llevar a diferencias significativas entre especies; por otra, se desconocen las funciones de los sitios alostéricos y la introducción de un modulador alostérico puede producir efectos fisiológicos desconocidos; finalmente los moduladores alostéricos podrían complicar la respuesta fisiológica al activar simultáneamente homo- y heterodímeros de la diana¹².

A pesar de estos desafíos farmacológicos y químicos, se han desarrollado varios fármacos moduladores alostéricos de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), habiendo sido recientemente comercializados cinacalcet¹⁸ y maraviroc¹⁹, como reductor de la hipercalcemia y antiretroviral, respectivamente. Además, varias benzodiazepinas han obtenido gran éxito en terapéutica como reguladores alostéricos de canales iónicos y algunos moduladores alostéricos de quinasas se encuentran en fases clínicas.

En las enfermedades neurodegenerativas, como la EA, una de las alternativas terapéuticas de interés es la búsqueda de moduladores alostéricos que mejoren los síntomas asociados a estas enfermedades, y que además sean capaces de ralentizar la progresión de la patología por otras vías, aumentando la esperanza de vida²⁰. Dado que la búsqueda de inhibidores de la función hidrolítica de la AChE es la única aproximación terapéutica que ha llegado a la clínica para el tratamiento paliativo de EA, la búsqueda de moduladores alostéricos de AChE, es decir, fármacos que modulen tanto la actividad hidrolítica de AChE como las funciones no hidrolíticas, podría aportar más luz a los estudios de las funciones no hidrolíticas del enzima, con el ambicioso objetivo final de encontrar un fármaco no solo paliativo sino modificador del proceso neurodegenerativo.

1.2 Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa (AChE) es un enzima que pertenece a la superfamilia de las α/β hidrolasas, cuya principal función es la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en acetil-CoA y colina^{21, 22}. La AChE es una serina hidrolasa, en la que el sitio activo del enzima, compuesto por una triada de residuos (serina, histidina y ácido glutámico) conocida como triada catalítica, se encarga de hidrolizar la ACh. La naturaleza nucleofílica del grupo carboxilato del ácido glutámico se transfiere a través del anillo de imidazol de la histidina al grupo hidroxilo de la serina, permitiendo el desplazamiento del grupo de colina del sustrato y formando un intermedio de acetil-AChE. El siguiente paso de hidrólisis libera el grupo acetato recuperando el enzima su estado inicial (**Figura 1.3**).

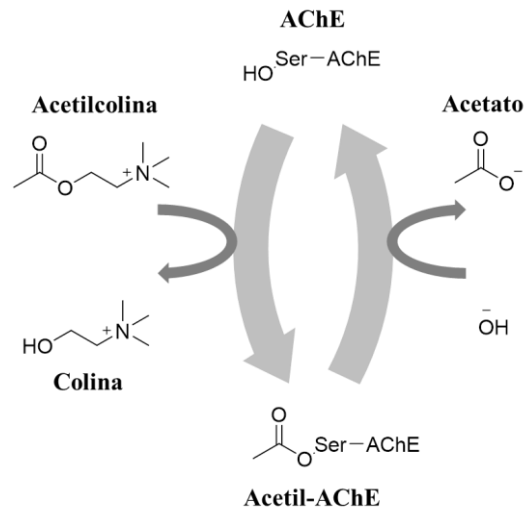


Figura 1.3. Reacción de hidrólisis de acetilcolina. AChE promueve la hidrólisis de acetilcolina mediante la formación de un intermedio de acetil-AChE, que se hidroliza liberando acetato y colina.

Este mecanismo de acción del enzima posee un ratio de conversión extremadamente rápido, teniendo en cuenta que el sustrato tiene que reconocer y atravesar una distancia relativamente larga hasta el sitio activo del enzima. Algunas teorías relacionan este fenómeno con el potente campo eléctrico que posee la AChE y que podría atraer fuertemente el sustrato catiónico, repeliendo el producto formado aniónico²³. Otra de las posibles razones de la alta velocidad hidrolítica de AChE es la existencia de las conocidas “puertas de salida”. Estas regiones de la *hAChE* son rutas alternativas de la garganta catalítica para el aclaramiento de los productos de la hidrólisis de ACh. Estudios experimentales de cristalografía de rayos-X y teóricos de modelado molecular sugieren tres posibles regiones de *hAChE* implicadas en la eliminación de los productos resultantes de la hidrólisis de ACh, conocidos como “puerta trasera” (*back door*), “puerta lateral” (*side door*) y “puerta del *loop* acilo” (*acyl loop door*)²⁴⁻²⁷.

La primera estructura cristalográfica de este enzima resuelta fue de *Torpedo californica* (*TcAChE*) en 1991²⁸. El enzima está formado por 614 residuos, con una garganta característica de unos 20Å de largo, que contiene diferentes regiones de unión de ligandos además del sitio activo (**Figura 1.4**). El sitio activo (CAS) consiste en la tríada catalítica, compuesta por los residuos Ser203, His447 y Glu334 situada en el fondo de la garganta. Un sitio de unión aniónico cerca del residuo Trp86, también en el fondo de la garganta, proporciona contactos clave en la unión del resto cargado positivamente de la ACh, mientras que el bolsillo de unión acilo (Phe295, Phe297 y Trp236) estabiliza el grupo acetilo de la misma. Es importante destacar que el bolsillo de unión oxianiónico (Gly121, Gly122 y Ala204) proporciona una estabilización de los estados de transición de acilación y desacilación mediante la estabilización de la acumulación de carga negativa en el oxígeno del carbonilo. Estos cuatro sitios son

fundamentales para la catálisis enzimática, ya que la proteína debe atraer y orientar rápidamente el sustrato, romper los enlaces requeridos y eliminar los productos del sitio activo actuando a gran velocidad. Por último, el sitio de unión aniónico periférico, denominado PAS y formado por los residuos Tyr72, Asp74, Tyr124, Glu285, Trp286 y Tyr341, se ubica justo dentro de la entrada de la garganta, y atrapa y orienta adecuadamente el sustrato²⁹. El PAS es un sitio de unión alostérico de AChE, pudiendo la unión de ligandos ocasionar el bloqueo de la entrada a la garganta²⁹.

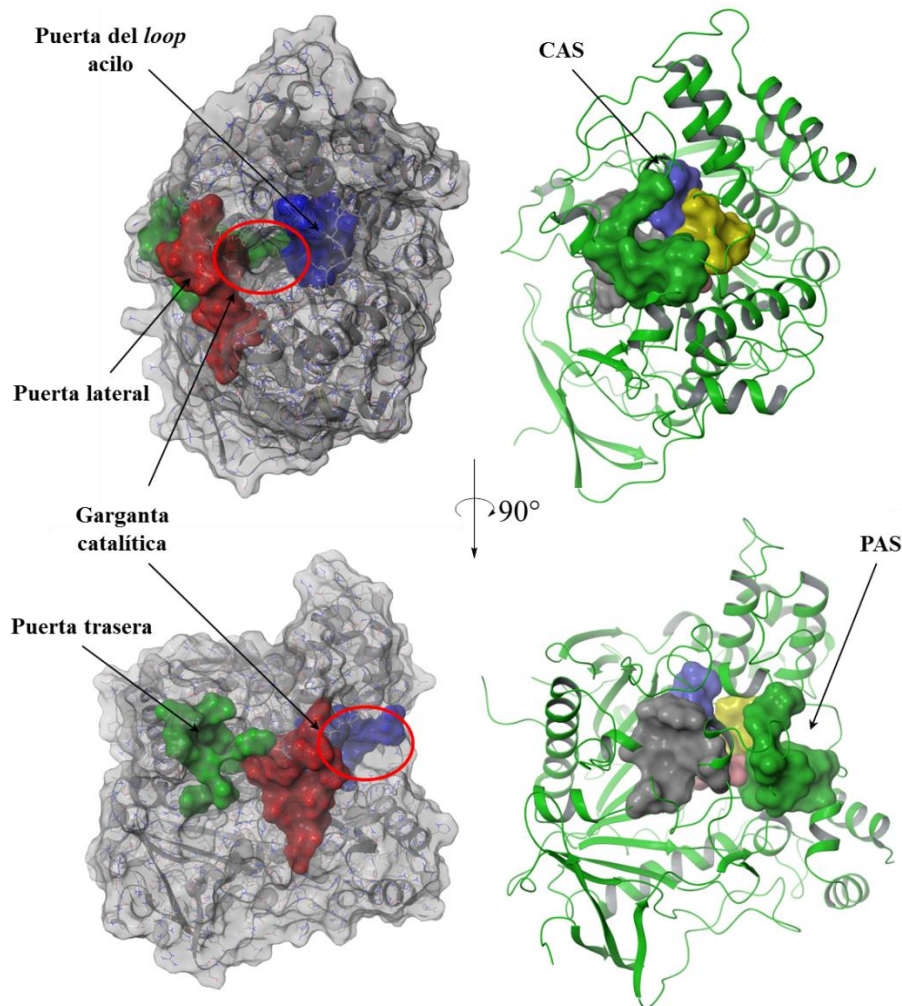


Figura 1.4. Estructura de AChE (PDB ID 4ey4). En la parte superior se aprecia el enzima en una vista frontal de la garganta catalítica, mientras que en la inferior se ha rotado la estructura 90°. En las figuras de la derecha se observan las diferentes zonas que ocupan los residuos en la garganta: Triada catalítica (azul), sitio de unión aniónico (gris), bolsillo de unión acilo (amarillo), bolsillo de unión oxianiónico (rojo) y sitio de unión aniónico periférico (verde).

Según la hipótesis colinérgica, durante la EA, los niveles de ACh se reducen drásticamente debido a la muerte neuronal. La inhibición del enzima encargado de la degradación de ACh lleva al aumento de los niveles de neurotransmisor en la sinapsis, y por lo tanto produce una mejora cognitiva y disminuye en parte la sintomatología clínica, resultando un tratamiento paliativo para la enfermedad³⁰.

El mecanismo de acción de los inhibidores de AChE (donepezilo, rivastigmina y galantamina) comercializados ha sido ampliamente estudiado, existiendo estructuras cristalográficas del complejo formado con la AChE (*hAChE*-Donepezilo: 4ey7³¹; *TcAChE*-Rivastigmina: 1gqr³²; *hAChE*-Galantamina: 4ey6). Rivastigmina y galantamina son inhibidores catalíticos, capaces de interactuar con el CAS, de manera irreversible y reversible respectivamente, mientras que donepezilo es un inhibidor mixto y ocupa toda la garganta catalítica interactuando tanto con el CAS como con el PAS.

La AChE es un enzima localizado en tipos de células muy diversas, encontrándose también en tejidos no colinérgicos y células no neuronales y mostrando una alta variedad de formas moleculares. Estos hechos pueden sugerir la idea de que este enzima posea funciones diferentes a las “clásicas”, es decir, funciones no colinérgicas. Se han identificado muchas proteínas y enzimas con más de una función, pudiendo actuar como proteínas estructurales, o uniéndose a ADN o ARN para regular los procesos de translación y transcripción³³. Durante la última década se ha demostrado que AChE también desempeña otras funciones no hidrolíticas³⁴. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugirieron que el enzima AChE desempeña un papel no colinérgico funcional en procesos como la inducción del cambio conformacional presente en la agregación de β -amiloide, así como en diferenciación celular y sinaptogénesis a lo largo del sistema nervioso central³⁵. Se ha visto que una de las acciones no colinérgicas de AChE es la promoción de neuritas³⁶, estando además implicada en el desarrollo y mantenimiento sináptico³⁷. Los inhibidores farmacológicos de AChE que se unen al centro catalítico, son capaces de inhibir la función hidrolítica, pero no necesariamente interfieren en las funciones no-hidrolíticas de la proteína.

Las funciones no hidrolíticas de AChE pueden desempeñar un papel clave en la EA, teniendo en cuenta que induce la agregación de placas de amiloide y promueve el desarrollo de neuritas, pudiendo ayudar a mantener las sinapsis nerviosas, un factor clave en una enfermedad neurodegenerativa. De hecho, el diseño de inhibidores duales del sitio catalítico y periférico ha proporcionado moduladores potentes de la patología β -amiloide. Asumiendo la relevancia de esta diana en la EA, se pueden abordar varios desafíos que ayuden a caracterizar las funciones no hidrolíticas de *hAChE*, tales como la identificación de los sitios alostéricos, es decir, los aminoácidos que median en las actividades enzimáticas no clásicas; y la identificación de moduladores alostéricos³⁸, como tareas fundamentales para la identificación y diseño de moduladores duales de las funciones clásicas y no clásicas de AChE.

2. OBJETIVOS

Como se ha visto hasta ahora, los moduladores alostéricos son una alternativa farmacológica con un gran número de ventajas, como serían la mayor selectividad y seguridad, realizando una modulación de las actividades catalíticas de sus dianas y simultáneamente modificando algunas de sus funciones de reconocimiento molecular.

Centrándonos en la EA, una de las dianas clave implicada en varios de los procesos tanto degenerativos como sintomáticos es la AChE.

La finalidad de este capítulo es el estudio y análisis de los posibles sitios alostéricos en la AChE, con el fin de identificar moduladores alostéricos de la misma. Para ello se propusieron tres objetivos específicos:

1. Estudio y análisis de posibles sitios alostéricos en *hAChE*.
2. Identificación de nuevos moduladores alostéricos de *hAChE*, empleando diferentes herramientas en la realización del cribado virtual.
3. Racionalización del modo de unión y mecanismo de acción de moduladores alostéricos de *hAChE*.

3. RESULTADOS

3.1 Antecedentes

Hace ya más de dos décadas, nuestro grupo describió los llamados inhibidores duales de sitio periférico y catalítico de AChE como potenciales agentes modificadores de la EA, pudiendo, no solo mejorar temporalmente el nivel cognitivo de los pacientes, sino retrasando el proceso neurodegenerativo al intervenir directamente en el cambio conformacional del $A\beta$ ³⁹. Esta hipótesis, fue confirmada años más tarde con la aparición en la literatura de numerosos compuestos capaces de inhibir la AChE y además la agregación del beta-amiloide producida por la acción chaperona de esta enzima⁴⁰. En este sentido el inhibidor más potente de ambas acciones descrito es el derivado NP-61⁴¹, habiéndose convertido los inhibidores duales de AChE en potentes moduladores de la patología del péptido beta-amiloide⁴².

En este sentido, el grupo de investigación de la Profesora Ivone Carvalho de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Riberão Preto (Universidad de São Paulo, Brasil), llevó a cabo un proyecto de diseño, síntesis y evaluación de fármacos para la EA con el objetivo de desarrollar compuestos multidiana capaces de inhibir los enzimas *hAChE* y *hBuChE*, y que se uniesen de forma simultánea al PAS y CAS de ambas enzimas. Para ello, tomaron el fragmento de indanona de donepezilo (unión descrita en PAS) y quinolina de tacrina (unión descrita en CAS). De este modo, empleando la aproximación de “compuestos híbridos”, se diseñó una familia de compuestos con un nuevo esqueleto (**Figura 1.5**).

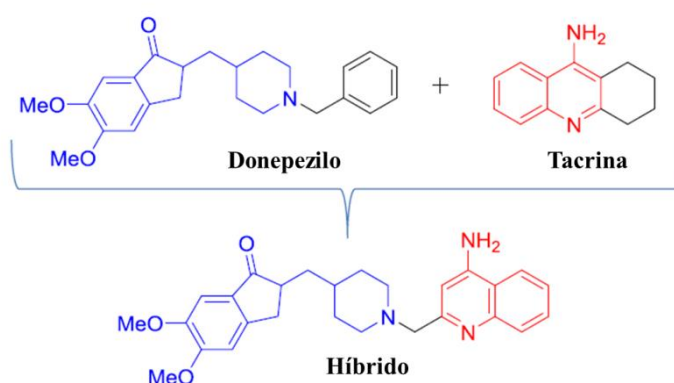
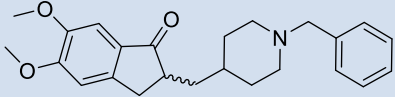
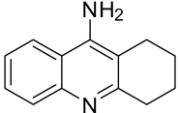
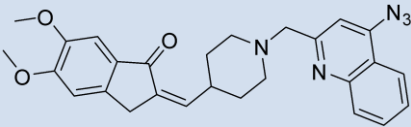
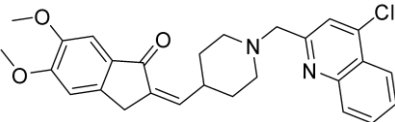
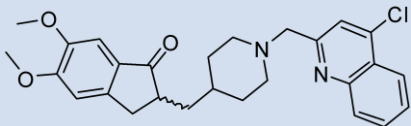
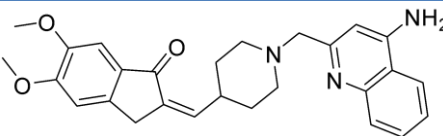
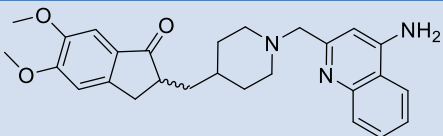


Figura 1.5. Estrategia de hibridación entre donepezilo y tacrina para la generación de una familia de inhibidores duales.

Se preparó una pequeña serie de cinco compuestos relacionados, que se evaluaron en ambas ChEs, recogiendo sus valores de IC_{50} en la **Tabla 1.1**⁴³.

Tabla 1.1. Estructuras de donepezilo, tacrina y los híbridos sintetizados, y sus correspondientes valores de inhibición enzimática sobre *hAChE* y *hBuChE* (μM).

Compuestos	Estructura	IC ₅₀ <i>hAChE</i> (μM)	IC ₅₀ <i>hBuChE</i> (μM)
Donepezilo		0.0057±0.0005	9.14±0.56
Tacrina		0.23±0.069	0.040±0.002
TC01		4.88±0.45	>10
TC02		>10	>10
TC03		>10	5.99±0.64
TC04		0.014±0.009	3.69±0.84
TC05		0.71±0.17	6.54±0.70

Con el fin de determinar el modo de unión al enzima, se llevaron a cabo estudios cinéticos de inhibición en AChE para los compuestos **TC01**, **TC04** y **TC05** (Figura 1.6). La hipótesis inicial de este trabajo, es decir, que los compuestos debían interactuar tanto en el CAS como en el PAS de AChE, se pudo comprobar para los derivados **TC01** y **TC05**, donde el perfil cinético mostró un tipo de inhibición mixta. Curiosamente, el compuesto **TC04**, el más activo de la serie sobre *hAChE*, mostraba un mecanismo de acción no competitivo con ACh como muestra la Figura 1.6, lo que implica un modo de unión alternativo al planteado inicialmente. Esta inhibición no competitiva implica que el compuesto **TC04** no compite con el sustrato natural (ACh), es decir, no se une al sitio catalítico (CAS). Por lo tanto, en principio, se pensó que este compuesto debería unirse solamente al sitio alostérico conocido como PAS.

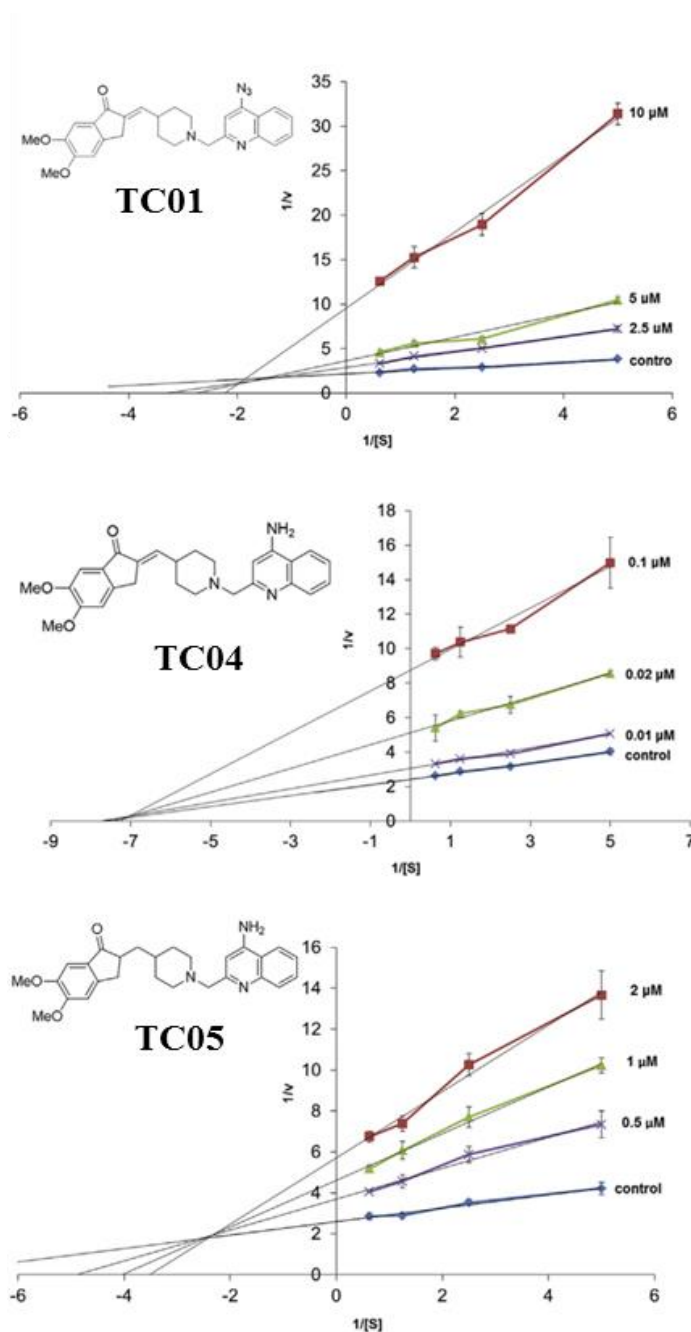


Figura 1.6. Gráfica de Lineweaver-Burk para los ensayos de competición de **TC01**, **TC04** y **TC05** en *hAChE*. **TC01** y **TC05** muestran mecanismos de inhibición de tipo mixto mientras que **TC04** posee un mecanismo de inhibición no competitivo.

Para valorar la posible unión del compuesto **TC04** en la zona del PAS, se realizaron estudios de competición del compuesto **TC04** con donepezilo (fármaco con un modo de unión en CAS/PAS descrito en el PDB ID 4ey7³¹) utilizando RMN-¹H mediante la aplicación de experimentos de diferencia de transferencia de saturación (STD-RMN). Estos estudios mostraron que el compuesto **TC04**, en presencia de donepezilo no era capaz de desplazarlo, y que donepezilo no era capaz de desplazar al compuesto **TC04**, apuntando a que ambos compuestos se unen a sitios distintos de *hAChE* (**Figura 1.7**)⁴³.

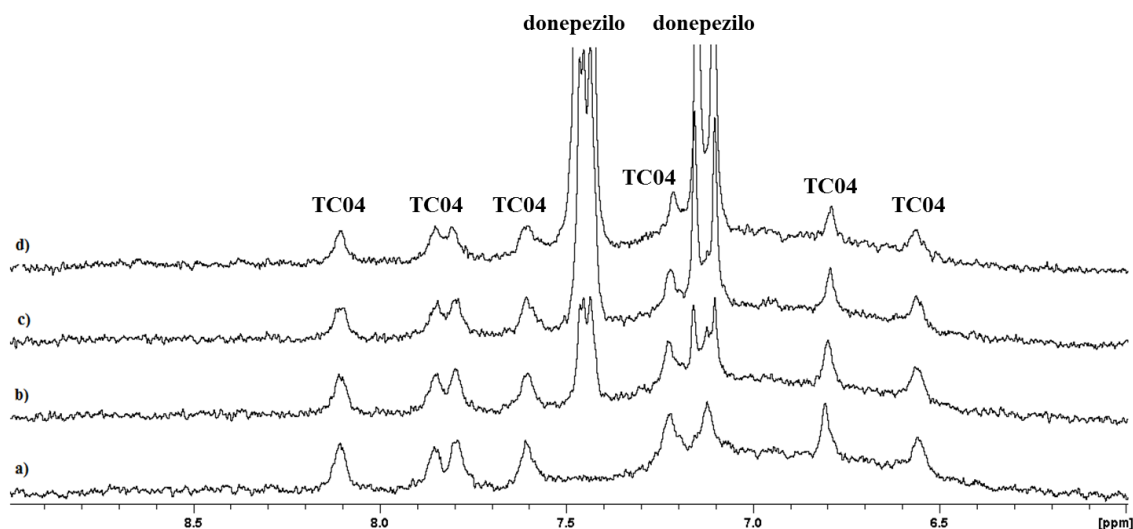


Figura 1.7. Expansión de la región aromática de espectros STD de un sistema a) AChE (15.2 μM)/TC04 (304 μM); b) AChE (15.2 μM)/TC04 (304 μM)/donepezilo (80 μM); c) AChE (15.2 μM)/TC04 (304 μM)/donepezilo (304 μM); d) AChE (15.2 μM)/TC04 (304 μM)/donepezilo (1216 μM).

La modulación alostérica de AChE ha sido objeto de estudio a lo largo de los últimos años. Más en detalle, en 2013, se describió que el ácido rosmarínico, un producto natural de *Salvia scleroides*, se unía a AChE en un sitio diferente de la garganta catalítica, inhibiendo su función hidrolítica⁴⁴. Este sitio, descrito mediante estudios de RMN y *docking* fue llamado *Sitio B*, y es la primera evidencia de posibles bolsillos de modulación alostérica de AChE. Por otro lado, varios estudios teóricos, han analizado el mecanismo de funcionamiento rápido de *hAChE*, capaz de hidrolizar ACh a una velocidad de $7.4 \cdot 10^5$ moléculas por minuto⁴⁵. Así, mediante estudios de QM/MM y dinámica molecular, se han descrito varias regiones anexas a la garganta catalítica de AChE, que pueden funcionar como puertas de salida de las moléculas de desecho derivadas de la hidrólisis de ACh^{24-26, 46}.

Teniendo en cuenta todos los datos experimentales obtenidos para los compuestos híbridos de donepezilo y tacrina, la información disponible acerca del *Sitio B*, y las diferentes regiones anexas a la garganta catalítica, se planteó un estudio computacional que permitiera desarrollar una hipótesis del mecanismo de acción del compuesto **TC04**. Para ello, se planteó un estudio de la superficie de *hAChE*, para determinar posibles sitios alostéricos y la unión más estable en estos sitios.

3.2 Estudio y análisis de posibles sitios alostéricos en *hAChE*

La determinación de las cavidades susceptibles de unión de ligando en dianas terapéuticas es un paso esencial en el diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD), para identificar

bolsillos de unión o sitios alostéricos y diseñar ligandos que se unan a éstos, ejerciendo una acción terapéutica. Para conseguir este objetivo, se han desarrollado diferentes aproximaciones computacionales, basadas tanto en algoritmos evolutivos como en la estructura de la proteína^{47, 48}.

En este trabajo, se ha llevado a cabo el estudio y análisis de la estructura de *hAChE* para identificar los posibles sitios de unión alostéricos empleando dos aproximaciones complementarias. La primera aproximación, fue el estudio de la estructura de la proteína empleando Fpocket⁴⁹, un algoritmo basado en la teoría de las alfa esferas. Este programa aporta información acerca de los bolsillos que posee una estructura proteica, sus características y la posibilidad de unión de ligandos. El segundo paso de este protocolo ha sido el estudio de los posibles residuos de interacción clave para la unión de ligandos en la proteína, utilizando para ello el programa Fragment Hotspot maps (FHM)⁵⁰.

El primer paso fue el estudio de las cavidades con Fpocket. Es fundamental remarcar que Fpocket tiene en cuenta la estructura de las proteínas como una entidad rígida sobre la que realiza sus cálculos, por lo que las condiciones de cristalización y la diferente geometría de las cadenas laterales en estructuras cristalográficas pueden influir en el resultado, encontrando soluciones diferentes para la misma proteína. Debido a ello, se seleccionó un conjunto representativo de estructuras tridimensionales de *hAChE* obtenidas a partir de la base de datos PDB (**Tabla 1.2**), tanto en su forma libre (*apo*) como en complejos con ligando. En el momento del estudio, estaban disponibles catorce estructuras diferentes. La aplicación de Fpocket a las catorce estructuras generó hasta trece cavidades en algunas estructuras, algunas de ellas conservadas en todas las estructuras y otras solo presentes en algunas.

El análisis de estas cavidades teniendo en cuenta la frecuencia con la que aparecían y el valor de puntuación dado por Fpocket (*pocket score*) nos permitió concluir que solamente cuatro de las cavidades estaban presentes en todas las estructuras estudiadas (**Tabla 1.2**), como se puede observar en la **Figura 1.8**.

Tabla 1.2. Tabla resumen del estudio con Fpocket. Los números se refieren a la puntuación dada por el programa a cada bolsillo de cada estructura (un número menor está relacionado con un mejor sitio de unión). Dos o más números indican que ese bolsillo ha sido identificado como varias cavidades diferentes.

PDB ID	Ligando	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4
1B41	Fasciculina-II	1	4, 9	2	3
1F8U	Fasciculina-II	1	4, 7	3	2
2X8B	Fasciculina-II	1	9, 11	6	2
3LII	-	1	8, 17	2	7
4BDT	Fasciculina-II	1	4, 10	2	5
4EY4	-	2	5, 7	1	4
4EY5	Huperzina	1	4, 6	2	3
4EY6	Galantamina	1	2, 4	3	5
4EY7	Donepezilo	1	4, 6	2	3
4EY8	Fasciculina-II	1	6, 10	2	3
4MOE	Dihidrotanshinona-I	1	4, 7	2	6
4MOF	Territrem B	1	4, 5	2	3
4PQE	-	1	2, 3	5, 13	4
5FPQ	Sarin	1	3, 5	2	4

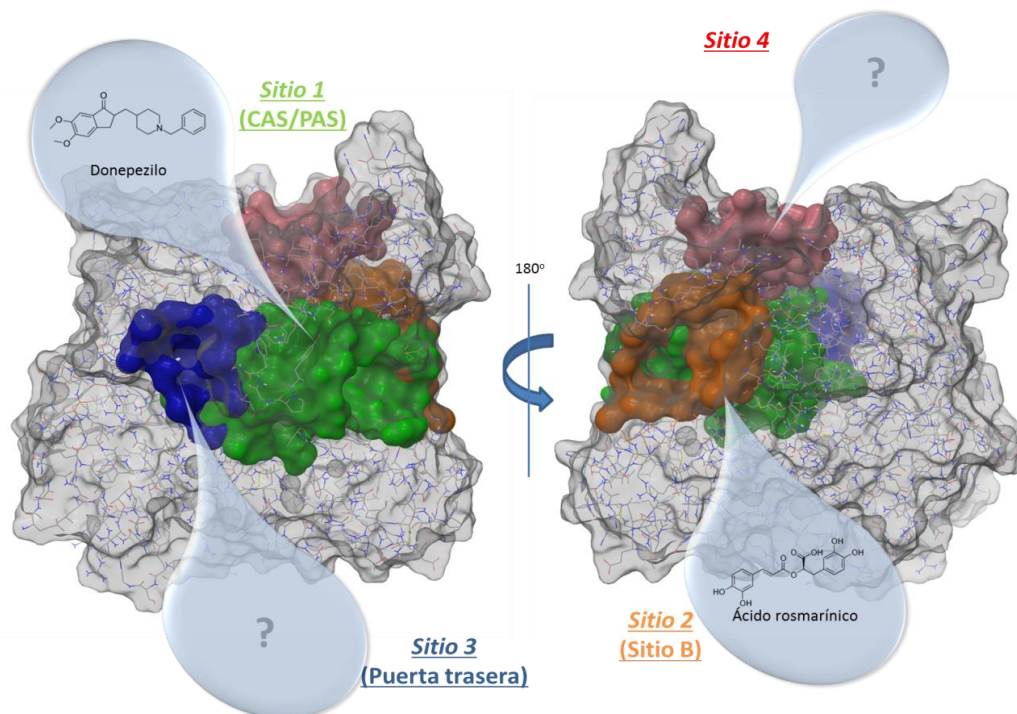


Figura 1.8. Estructura de hAChE representando las cuatro mejores cavidades encontradas mediante el cálculo con Fpocket.

El sitio de unión mejor clasificado en todas las estructuras es el *Sitio 1* (excepto para 4ey4, en donde es el segundo mejor sitio), que se corresponde con la garganta catalítica, conteniendo las zonas CAS y PAS. El *Sitio 2*, está clasificado entre los 5 mejores bolsillos en once de las catorce estructuras estudiadas. Mediante inspección visual de los resultados para el *Sitio 2* se pudo comprobar que, a pesar de que el programa Fpocket determinaba este bolsillo como dos cavidades diferentes, éstas se encontraban formando una única cavidad. El *Sitio 2* se encuentra formado por los residuos Pro232, Asn233, Gly234, Pro235, Trp236, Thr238, Val239, Gly240, Glu243, Arg246, Arg247, Leu289, Pro290, Gln291, Ser293, Arg296, Phe297, Val300, Thr311, Pro312, Glu313, Pro368, Gln369, Val370, Asp404, His405, Cys409, Pro410, Gln413, Trp532, Asn533, Leu536, Pro537 y Leu540. Una inspección más detallada de los residuos que forman parte de estos sitios permitió la identificación de los residuos Arg296 y Glu369, que forman parte del *Sitio 2*, como los mismos residuos e unión de ligando propuestos en un trabajo previo por Marcelo *et al.* en 2013⁴⁴. En ese trabajo, se estudió el reconocimiento molecular, mediante RMN y estudios de *docking* del ácido rosmarínico por la AChE, identificándose a éste como un inhibidor no competitivo de AChE capaz de interactuar con estos residuos en un bolsillo que denominaron “Sitio B”. Algunos de los residuos encontrados en nuestro estudio, que forman parte del *Sitio 2*, como el Trp236, Arg247 y Phe297, también forman parte de la “puerta del *loop* acilo”²⁶, por lo que este bolsillo se identificó como un sitio de unión a fármacos de interés para la modulación de hAChE.

El *Sitio 3*, aparece puntuado entre los 5 mejores bolsillos en trece de las catorce estructuras. En uno de los casos para este sitio, Fpocket lo consideró como dos cavidades separadas, considerando este resultado como un valor atípico que se sale de los valores generales. El *Sitio 3* está formado por los residuos Glu81, Gly82, Glu84, Met85, Asn87, Asn89, Leu130, Asp131, Val132, Thr436, Leu437, Ser438, Trp439, Tyr449, Glu452, Ile457, Ser462, Arg463, Asn464 y Tyr465. Los residuos Val132, Tyr449 y Glu452 han sido descritos en la bibliografía como residuos que forman parte de la conocida como “Puerta trasera” o *back door* de hAChE⁵¹. El *Sitio 4* corresponde a una cavidad formada por los residuos Val330, Val331, Lys332, Asp333, Glu334, Gly335, Ser336, Leu339, Arg395, Glu396, Ser399, Asp400, Gly403, Asp404, Val408, Val429, Glu431, Trp442, Met443, Tyr510, Arg521, Gly523 y Leu524. **En este caso en particular, no hay estudios previos que relacionen ninguno de estos residuos con alguna de las funciones biológicas de hAChE, por lo que en este estudio no nos hemos centrado en este bolsillo. A pesar de esto, la posibilidad de utilizar este sitio para centrar la búsqueda de moduladores alostéricos se mantiene abierta.**

Otro resultado analizado fue el volumen de los bolsillos alostéricos identificados, pudiendo comprobar la existencia de fluctuaciones en el volumen de los *Sitios 2* y *3*, en función de la estructura cristalográfica utilizada. Posiblemente estas fluctuaciones estén causadas por la

presencia de diferentes inhibidores en complejo con la proteína. Para ello se analizaron una serie de estructuras cristalográficas resueltas en las mismas condiciones con diferentes ligando (4ey4, 4ey5, 4ey6, 4ey7 y 4ey8), y aunque no existe una correlación perfecta, se puede observar que el *Sitio 2* disminuye su volumen cuando un ligando está interaccionando en la garganta catalítica (**Figura 1.9**). Estos cambios en el volumen son lógicos, teniendo en cuenta que el *Sitio 2* y el CAS comparten algunos residuos en común (bolsillo de unión acilo y *loop* acilo fundamentalmente), por lo que los ligando ubicados en la garganta catalítica pueden interaccionar y desplazar algunos de estos residuos modificando la cavidad contigua. Cambios similares pueden suceder en el caso de que un ligando se una al *Sitio 2*, afectando a la garganta catalítica, exponiendo así un posible mecanismo de modulación alostérica. De hecho, cambios estructurales en el *loop* acilo suceden cuando la *hAChE* es inhibida por fármacos con un tipo de unión covalente con residuos del CAS, estrechando la garganta y desplazando la cadena lateral de Arg296 hacia la garganta, impidiendo estéricamente y repeliendo la entrada de oximas y/o afectando la unión de oximas en la reactivación de *hAChE*⁵².

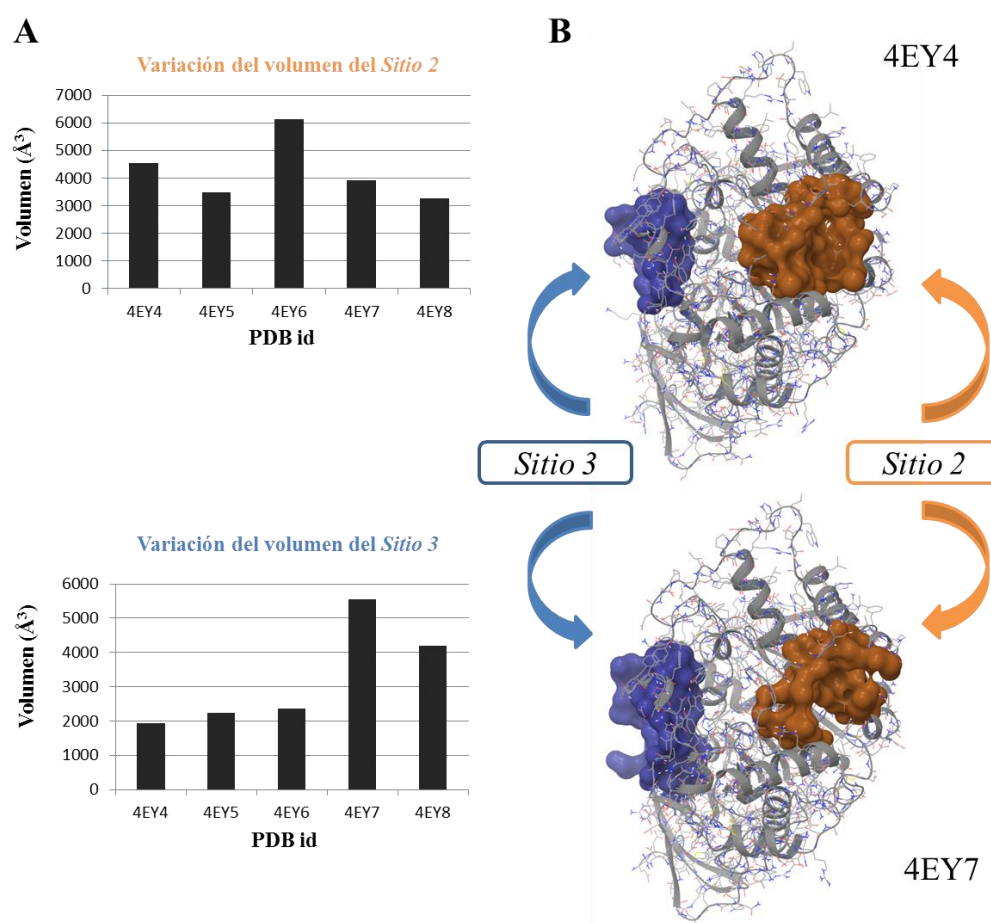


Figura 1.9. A) Gráficas del volumen de los bolsillos para los *Sitios 2* (naranja) y *3* (azul) obtenidos de estructuras cristalizadas en las mismas condiciones. B) Representación de las superficies de los bolsillos que corresponden al *Sitio 2* (naranja) y *Sitio 3* (azul) para las estructuras de *hAChE* apo (4ey4) y *hAChE* en complejo con donepezilo (4ey7).

También se analizó cómo la presencia de un ligando en la garganta catalítica podía afectar al volumen del *Sitio 3*. En este caso, todas las estructuras de la serie aumentaron su volumen, incluso hasta duplicando el volumen en los casos de 4ey7 (con donepezilo) y 4ey8 (con fasciculina-2). Esto puede ser explicado por la apertura de la “puerta trasera” en ambos complejos, mientras que en los otros complejos ésta permanece cerrada. De todos modos, no se pueden obtener correlaciones fiables con este método debido a que las estructuras utilizadas se mantienen rígidas en estos cálculos, existiendo variabilidad en los resultados de Fpocket. Por lo tanto, de este estudio se pueden extraer las ideas de cuáles son los bolsillos más conservados entre estructuras y la posibilidad de que la presencia de ligandos en la garganta catalítica sea suficiente para modificar la geometría de los bolsillos anexos.

3.3 Identificación de los posibles puntos de interacción ligando-proteína

Tras la búsqueda de sitios alostéricos para *hAChE*, se procedió a la identificación de los posibles sitios de unión de ligando en la proteína. Para ello, se llevó a cabo un estudio con el programa Fragment Hotspot maps (FHM)⁵⁰. FHM lleva a cabo un cálculo sobre la estructura de la proteína, aportando guías visuales de las diferentes regiones en las que fragmentos orgánicos son capaces de interactuar con la proteína, mostrando sus correspondientes farmacóforos. Esta herramienta muestra las posibles interacciones de enlaces de hidrógeno aceptores, dadores e interacciones apolares/aromáticas que se pueden realizar con la diana, ayudando a la identificación de los residuos más interesantes con los que interactuar. Este cálculo se realizó sobre la estructura de *hAChE* en su forma *apo*, y centrando la búsqueda de estas regiones de interacción en los *Sitios 2* y *3* previamente descritos. Para el *Sitio 2*, se encontró que los residuos Gln413 y Trp532 pueden actuar aceptando enlaces de hidrógeno, mientras que His405 puede actuar como dador de enlaces de hidrógeno (**Figura 1.10**). En el *Sitio 3*, los residuos Glu81 y Glu452 pueden actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno y Arg463 como dador de enlaces de hidrógeno. Según estos cálculos, estos residuos formarían un mapa en el que teóricamente un fragmento orgánico sería capaz de interactuar. Además, también se muestra que los *Sitios 2* y *3* son sitios susceptibles de unión de ligando, por lo que teniendo en cuenta tanto el estudio con Fpocket como con FHM, se podría concluir que estas dos regiones tienen la capacidad de ser posibles sitios de unión de ligando alostéricos. La búsqueda de compuestos que se unan a estos sitios, modulando la actividad biológica de *hAChE*, puede aportar una mayor información a esta hipótesis.

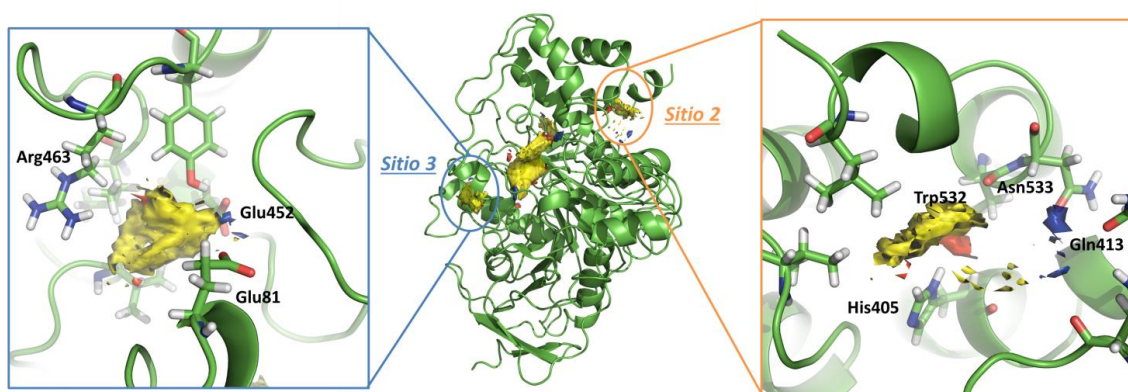


Figura 1.10. Representación de los mapas de FHM obtenidos. Áreas en amarillos se relacionan con regiones de interacción apolar/aromática, áreas en azul muestran regiones en las que los ligando deberían mantener interacciones dadoras de enlace de hidrógeno y áreas en rojo están relacionadas con regiones de interacción aceptora de enlace de hidrógeno por parte del ligando.

3.4 Estudio del modo de unión de híbridos de donepezilo y tacrina

3.4.1 Búsqueda del sitio de unión

La identificación del sitio de unión alostérico para el compuesto **TC04** se realizó utilizando PELE⁵³ (*Protein Energy Landscape Exploration*), tomando también el compuesto **TC02** como control negativo. PELE es un programa que combina una aproximación estocástica Monte Carlo con algoritmos de predicción de estructura de proteína. Básicamente es un método que es capaz de realizar búsquedas conformacionales para un ligando, a lo largo de diferentes trayectorias que estudian la totalidad de la superficie de la proteína. Sobre las diferentes conformaciones del ligando en los diferentes puntos de la diana el programa realiza optimizaciones energéticas, calculando energías de afinidad teórica en cada punto. Esto permite un muestreo eficiente del espacio tridimensional y conformacional con un único objetivo: la búsqueda del bolsillo más probable para la unión de cada ligando.

Utilizando PELE, se calcularon ocho trayectorias diferentes para cada ligando (**Figura 1.11**). En este estudio, se utilizó donepezilo como control positivo, ya que su modo de unión en *hAChE* está descrito y depositado en el PDB ID 4ey7. Las ocho trayectorias calculadas para donepezilo fueron analizadas (**Figura 1.11A**), comprobando que la totalidad de la superficie de *hAChE* había sido analizada por el programa. Se observó que la trayectoria que mostraba mejores valores de energía de unión (trayectoria cinco) se correspondía con un modo de unión muy similar al resuelto en la estructura cristalográfica (**Figura 1.11D**), confirmando que este protocolo es capaz de introducir donepezilo en la garganta catalítica, por lo que el protocolo fue validado.

En el caso del compuesto **TC02**, PELE calculó que en las trayectorias con mejor energía de unión (trayectorias 3, 4 y 8), el ligando era incapaz de entrar en la garganta catalítica, manteniendo interacciones inespecíficas con la superficie de la proteína (**Figura 1.11E**). Para el compuesto **TC04**, tres de las trayectorias estudiadas mostraron las mejores energías de unión (trayectoria 3, 5 y 7) como muestra la **Figura 1.11C**. Analizando en mayor detalle los bolsillos de unión y las poses para estas tres trayectorias (**Figura 1.12**), se pudo apreciar que dos de las tres unieron el ligando en el *Sitio 2* de *hAChE* (trayectorias 3 y 5), mientras que en una de ellas el ligando se ubica en la entrada de la garganta catalítica sin la capacidad de entrar (trayectoria 7).

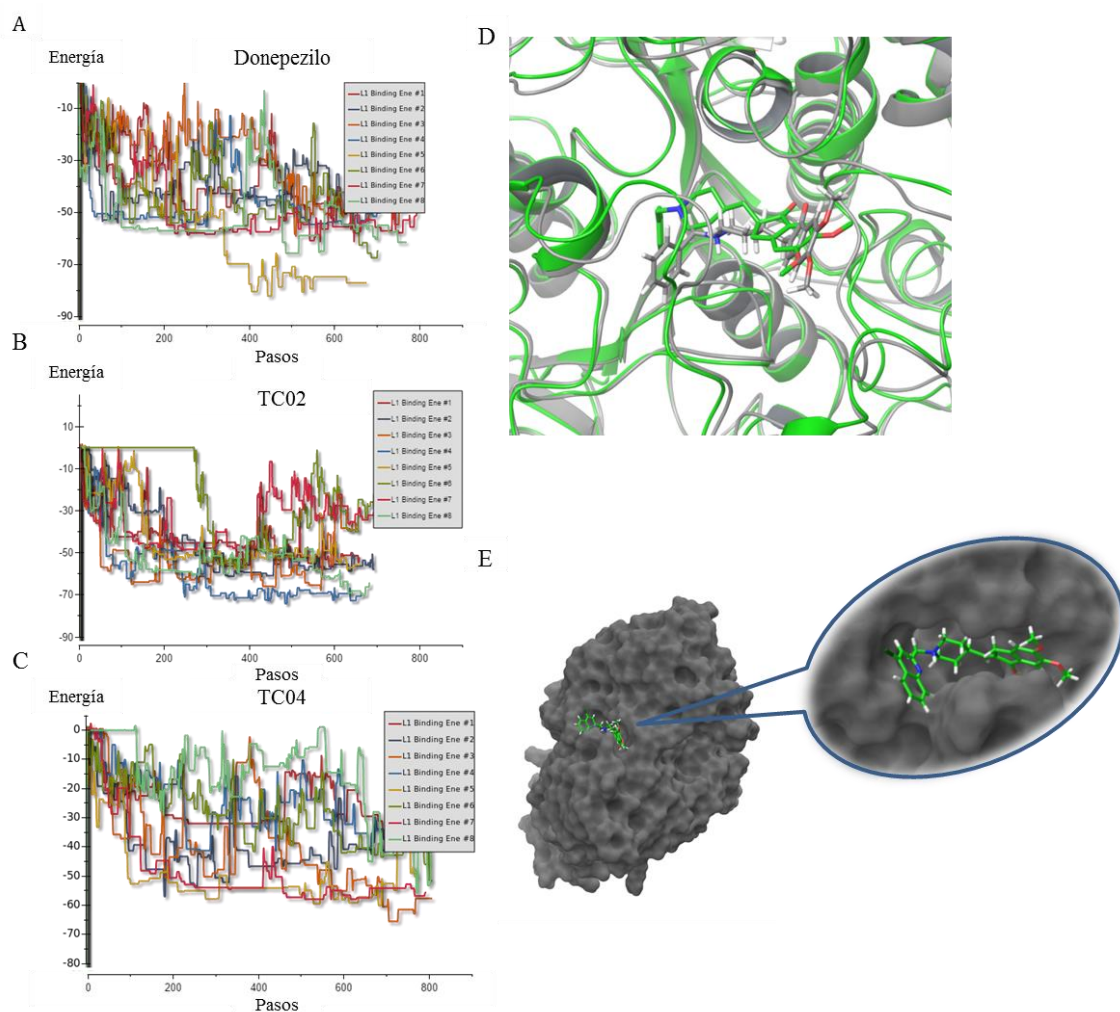


Figura 1.11. Gráfica de variación de energía de unión por cada paso de la trayectoria para A) donepezilo; B) **TC02**; C) **TC04**; D) Comparación de la pose con mejor energía de unión para la trayectoria cinco de donepezilo (gris) con la estructura cristalográfica 4ey7 (verde); E) Mejor pose obtenida para la trayectoria cuatro de **TC02**.

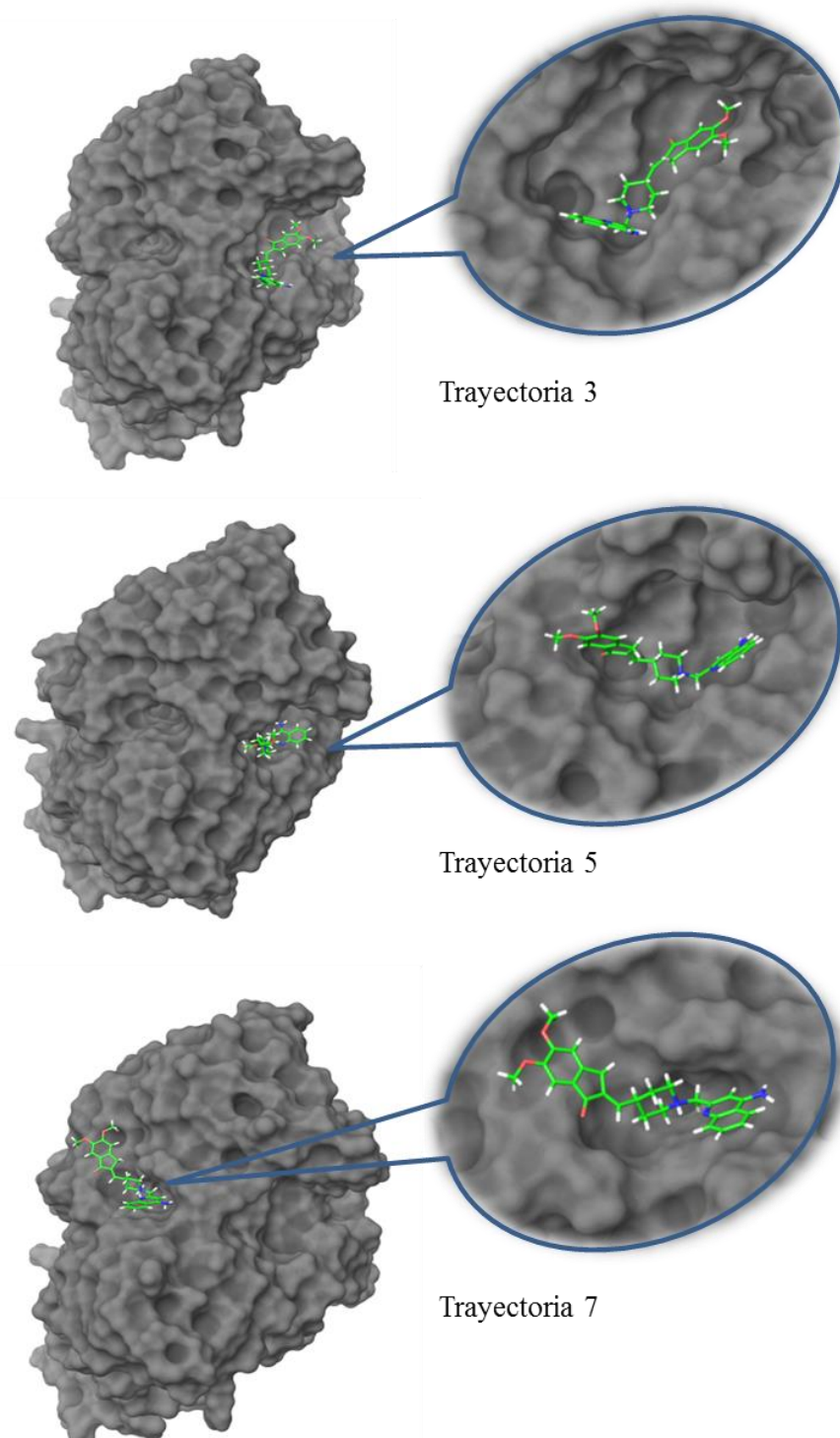


Figura 1.12. Poses del compuesto **TC04** en las tres mejores trayectorias de la búsqueda con PELE. En las trayectorias tres y cinco el ligando se ubica en el Sitio 2, mientras que en la trayectoria siete el ligando se ubica en la entrada de la garganta catalítica, sin la posibilidad de llegar a entrar en ella.

Estos estudios de búsqueda del bolsillo de unión, tanto para los compuestos **TC02** y **TC04**, muestran resultados en concordancia con los resultados experimentales previamente obtenidos. El compuesto **TC02** muestra una IC_{50} menos de $10 \mu M$ y el compuesto **TC04** se une en un sitio diferente de la garganta catalítica modulando la actividad catalítica de *hAChE*. En el análisis de los resultados de PELE, es importante tener en cuenta que este método combina

diferentes herramientas de búsqueda conformacional y espacial y optimizaciones energéticas utilizando mecánica molecular, sin la necesidad de realizar una búsqueda exhaustiva de la pose del ligando en cada bolsillo de unión, por lo que es un buen método para la búsqueda a lo largo de la superficie de una proteína, aunque los modos de unión predichos son menos precisos que los que se pueden obtener aplicando técnicas de *docking* o dinámica molecular, por lo que es necesario completar los resultados para el compuesto **TC04** con experimentos adicionales.

3.4.2 Estudios de *docking* y dinámica molecular

Se realizaron experimentos de *docking* y dinámica molecular para determinar el modo de unión y explicar el mecanismo de acción del compuesto **TC04**. Los cálculos de *docking* se realizaron utilizando el programa AutoDock, sobre la estructura de *hAChE* en su forma *apo* (PDB ID 4ey4). Los resultados para el **TC04** se agruparon en conjuntos de poses que tuvieran un $RMS \leq 2$ (raíz cuadrada de la media de las posiciones atómicas, del inglés *root mean square*) entre ellas, mostrando fundamentalmente tres grupos a valorar. El primer conjunto de poses ofrece la mejor energía de unión, el segundo es el grupo que tiene un mayor número de poses, y el tercero tiene un número de poses similar al primer grupo y buenos valores de energía de unión. La mejor pose del primer grupo mantiene interacciones de enlace de hidrógeno con la Arg247, con una energía de unión de $-8.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; la mejor pose del segundo grupo mantiene interacciones de enlace de hidrógeno con la Arg296 y Arg297 con una energía de $-8.34 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; y la mejor pose del tercer grupo es capaz de interactuar mediante enlace de hidrógeno con Asn233 e His405, teniendo la peor energía de los tres, $-7.82 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (**Figura 1.13**).

Es importante tener en cuenta que la metodología de *docking* utilizada con AutoDock ha mantenido la estructura de la diana rígida y el ligando flexible para el cálculo. El *Sitio 2* de *hAChE* es un bolsillo muy amplio expuesto al solvente, en donde el modo de unión predicho para el compuesto **TC04** varía entre tres soluciones diferentes, siendo las energías de unión buenas en los tres casos, por lo que el estudio de *docking* no permitió plantear una única solución posible para el modo de unión de este compuesto. La flexibilidad y el movimiento de la diana, y los posibles cambios conformacionales que pueda producir la unión del ligando en el bolsillo no pueden ser valorados en detalle mediante *docking*, por lo que para discernir cuál es el modo de unión más estable y el encargado de la actividad inhibitoria sobre *hAChE* valorando el movimiento dinámico de las proteínas, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular para cada una de las mejores poses de los tres grupos, con un posterior análisis de las simulaciones utilizando TRAPP, para así analizar diferencias en el comportamiento de *hAChE*.

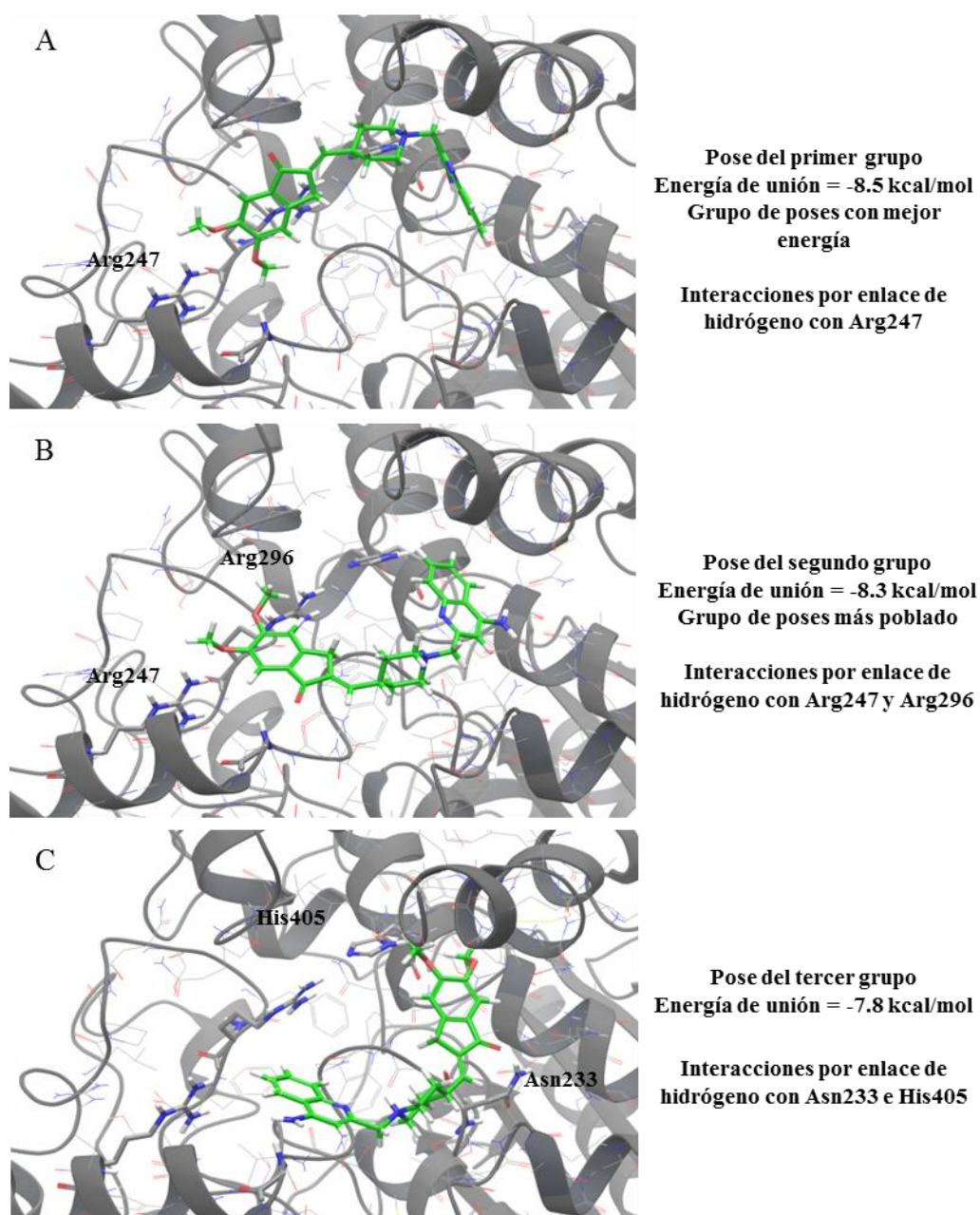


Figura 1.13. Imagen de las mejores poses de *docking* obtenidas y su correspondiente información para los grupos de poses 1 (A), 2 (B) y 3 (C) del compuesto **TC04** en *hAChE*.

Las simulaciones de dinámica molecular se compararon con una simulación de *hAChE* en su forma *apo* (sin ligando), para así analizar las posibles diferencias en el comportamiento de la diana. Se calculó la variación de RMSD de los átomos del esqueleto de *hAChE* a lo largo de la trayectoria de las cuatro simulaciones (**Figura 1.14**), comprobando que en la trayectoria que partió de la pose del grupo uno el perfil es muy similar al de la diana sin ligando. La trayectoria para la pose del grupo dos, se estabilizó durante los primeros quince nanosegundos, mostrando un cambio conformacional brusco alrededor del nanosegundo veinte. En el caso de la pose del tercer grupo, ésta se estabilizó a partir del nanosegundo quince, con un RMSD ligeramente superior a la diana sin ligando. Así mismo, se analizaron tanto la estabilidad conformacional de

las diferentes poses a lo largo de la simulación como las variaciones en el comportamiento del bolsillo catalítico mediante TRAPP para las tres poses.

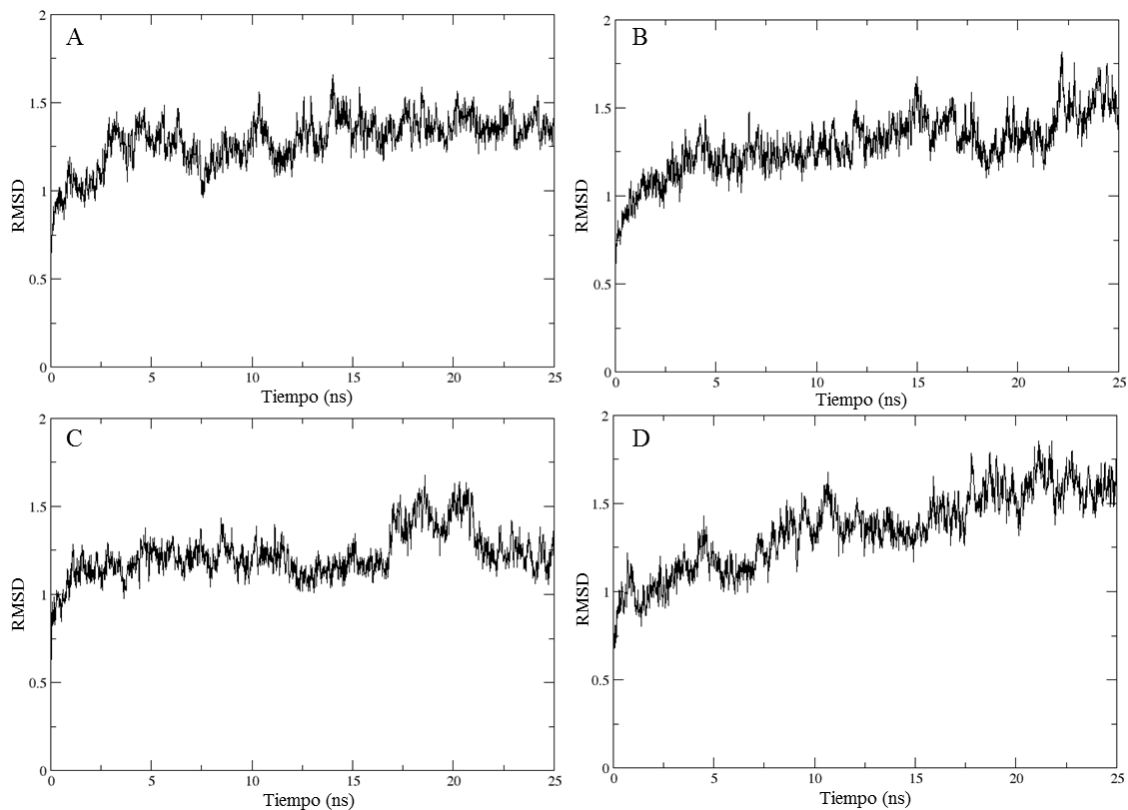


Figura 1.14. Gráficas de la variación de RMSD de los átomos del esqueleto de *hAChE* lo largo de las simulaciones de dinámica molecular de: A) *hAChE* sin ligando; B) Complejo *hAChE-TC04* pose del grupo uno; C) Complejo *hAChE-TC04* pose del grupo dos; D) Complejo *hAChE-TC04* pose del grupo tres.

En cuanto a la pose del grupo 1, durante su trayectoria, el compuesto es capaz de interactuar mediante enlace de hidrógeno entre el grupo metoxilo del inhibidor y el residuo Arg296, apareciendo una interacción de enlace de hidrógeno con Gln369, no presente en los estudios de *docking*, que se mantiene a lo largo de la simulación. Esta nueva interacción ligando-diana es interesante, ya que el residuo Gln369 se encuentra interactuando con Gln291, estabilizando el *loop* acilo. Cuando el ligando interactúa con Gln369, la interacción entre residuos se pierde, permitiendo un movimiento del *loop* acilo hacia el interior de la cavidad catalítica. El análisis con TRAPP de la garganta catalítica a lo largo de la simulación de *hAChE* con la pose del grupo 1 (**Figura 1.15B**) y su comparación con la simulación de *hAChE* sin ligando (**Figura 1.15A**) mostró un movimiento del *loop* acilo hacia el interior de la garganta, movimiento no observado en la trayectoria sin ligando. Además, la puerta lateral se comporta de un modo más rígido sin llegar a abrirse a lo largo de la dinámica, diferenciándose del comportamiento normal de *hAChE*.

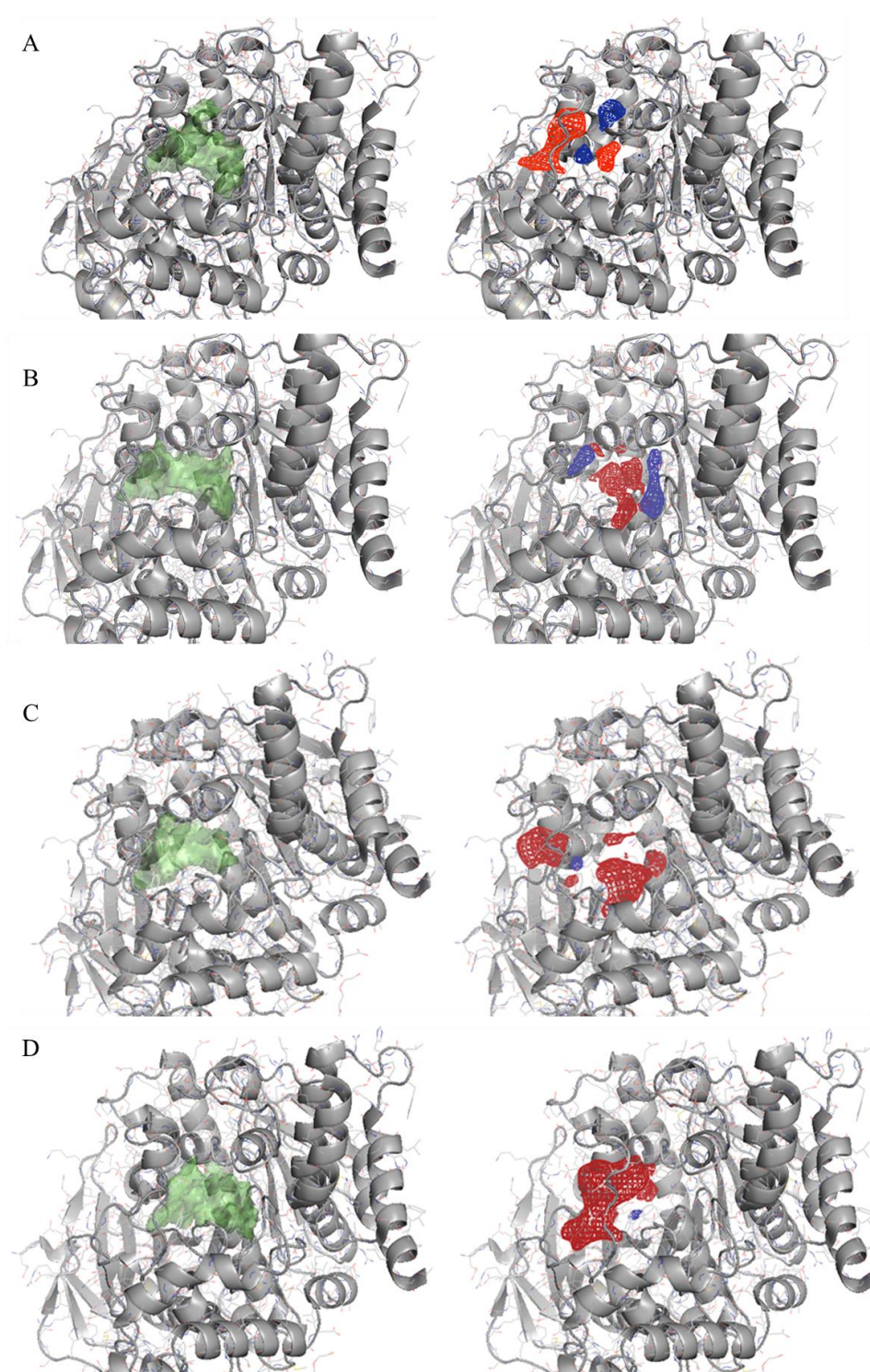


Figura 1.15. Resultados del análisis con TRAPP para la garganta catalítica en las cuatro simulaciones diferentes: A) *hAChE* sin ligando; B) *hAChE* con el compuesto **TC04** y pose del grupo 1; C) *hAChE* con el compuesto **TC04** y pose del grupo 2; D) *hAChE* con el compuesto **TC04** y pose del grupo 3. Regiones en azul representan las áreas que desaparecen en al menos el 50% de la trayectoria analizada, áreas rojas representan las regiones que aparecen en al menos el 50% de la trayectoria analizada.

El análisis de la pose del grupo 2 mostró que la pose inicial parece no ser estable durante la simulación, perdiendo las interacciones y saliendo del bolsillo. Posteriormente el ligando se vuelve a ubicar en el bolsillo, esta vez con un modo de unión diferente al inicial. A lo largo de la

dinámica el ligando no termina de estabilizar su modo de unión. Además, el análisis de TRAPP (**Figura 1.15C**) muestra las mismas regiones apareciendo y desapareciendo de la garganta catalítica que en la dinámica referencia de *hAChE* sin ligando, por lo que se pudo concluir que esta pose no debe ser la bioactiva para el compuesto **TC04**.

Por último, la pose del grupo 3 se mantiene estable a lo largo de la simulación, interaccionando mediante enlace de hidrógeno con los residuos de Asn233 e His405. El análisis con TRAPP (**Figura 1.15D**) muestra que la puerta lateral se abre ligeramente más que en la simulación sin ligando. Además el *loop* acilo se mantiene rígido sin introducirse en la garganta.

En el caso de la simulación para la pose del grupo 1, un análisis detallado de la fluctuación de RMSD por residuo (RMSF) mostró el movimiento a lo largo de la trayectoria de las diferentes regiones de *hAChE* (**Figura 1.16**). Los residuos de la “puerta lateral” (remarcados en fucsia y verde) muestran un movimiento restringido durante la simulación con **TC04**, sin permitir la apertura de la puerta. También se puede observar el movimiento reducido de los residuos que forman parte de otros *loops* como los residuos del 160-168 (coloreados en amarillo), 256-266 (rosa), 340-346 (azul cyan) y 368-372 (morado), pudiendo relacionar este menor movimiento con un efecto estabilizante del ligando en el complejo con la diana. Además, los residuos que van del 302-310 (azul), localizados en la región inferior del *Sitio 2*, tienen un mayor movimiento, debido a un cambio en la posición del *loop* durante la dinámica. Este movimiento puede estar causado por la presencia del ligando en este bolsillo, promoviendo el movimiento para maximizar los contactos con la proteína y la superficie de contacto ligando-proteína. Finalmente, los residuos que forman parte del *loop* acilo, del 289-295 (coloreados en naranja), en presencia del ligando muestran un menor movimiento en comparación con la simulación sin ligando. Esto sugiere la posibilidad de que el ligando, al interaccionar con Gln369 y romper la interacción con Gln291 desestabiliza el *loop* acilo permitiendo su movimiento hacia la garganta catalítica. Una vez llevado a cabo este acontecimiento, la presencia del ligando restringe el movimiento del *loop*, resultando su RMSF más bajo que en la simulación sin ligando, en la que los residuos, (tanto los átomos que forman la cadena lateral como el esqueleto) tienen mayor libertad de movimiento.

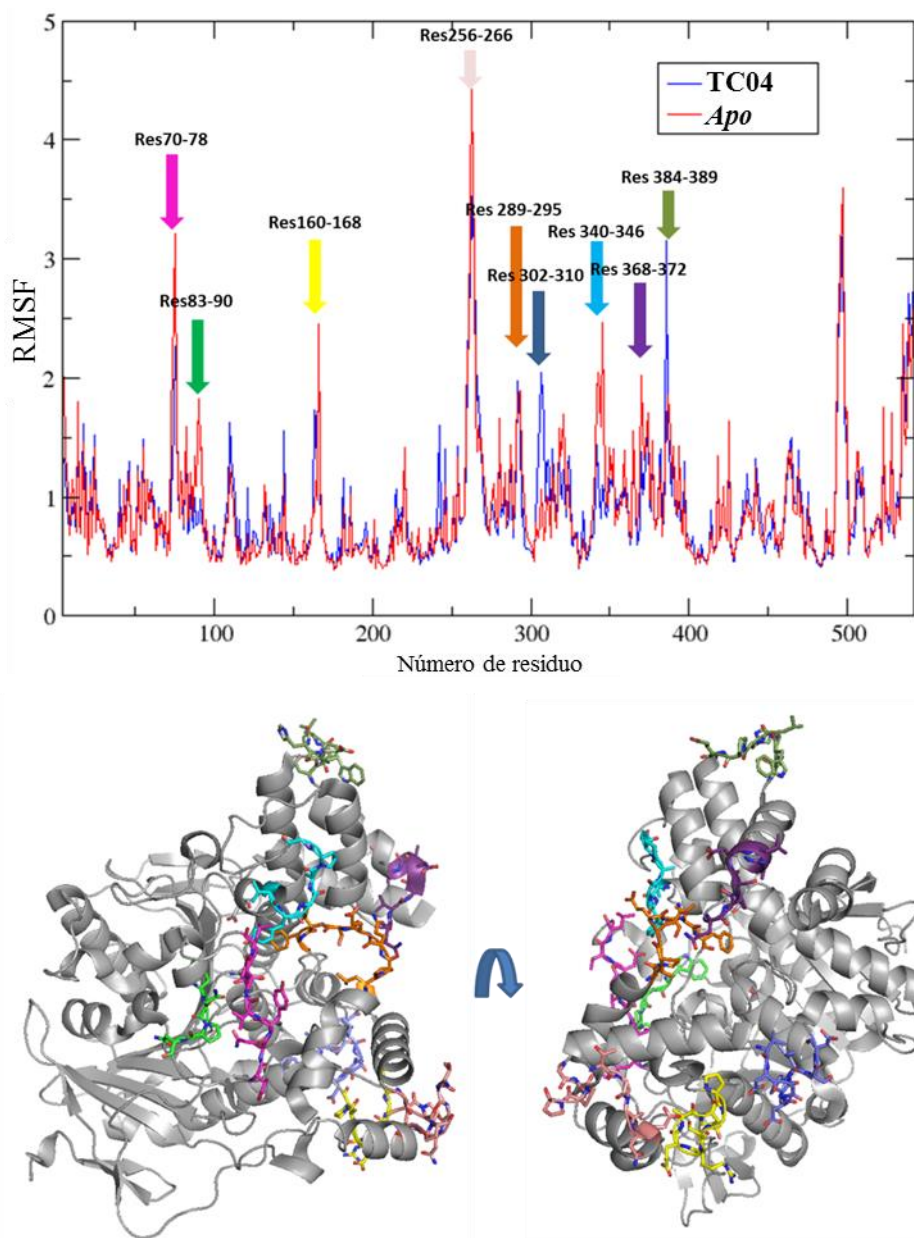


Figura 1.16. En la parte superior se encuentra el gráfico de RMSF de las simulaciones de *hAChE apo* sin ligando (rojo) y *hAChE* en complejo con TC04 y su pose del grupo 1 (azul). En la parte inferior se encuentra la estructura de *hAChE* con las regiones resaltadas en color del modo indicado en la gráfica superior.

Todos los estudios experimentales y teóricos llevados a cabo con **TC04** y *hAChE*, muestran que **TC04** es un inhibidor alosterico de *hAChE* con un posible modo de unión en el denominada *sitio B* de la superficie de este enzima.

3.4.3 Ensayos celulares y modulación de las funciones no hidrolíticas

Para demostrar el potencial efecto neuroprotector de los compuestos **TC04** y **TC05** en la toxicidad promovida por el péptido $A\beta$ y mediada por AChE, se realizó un ensayo *in vitro* de estos dos compuestos sobre las líneas celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se utilizó

esta línea celular debido a su similitud con las células neuronales poseyendo la capacidad de crecer y dividirse en células que pueden diferenciarse, extendiendo las neuritas al medio circundante. En primer lugar, se realizaron ensayos clonogénicos para detectar la capacidad de las células de recuperar sus propiedades proliferativas, visualizadas y cuantificadas como formación de colonias después de inducción de daño y muerte celular causada por el tratamiento con el péptido $A\beta_{(1-42)}$, que es la isoforma más amiloidogénica y neurotóxica del péptido $A\beta$ encontrado en el cerebro de pacientes con EA. Si nuestra hipótesis de unión dual fuera acertada, se debería esperar una menor agregación de oligómeros de $A\beta$ y, por lo tanto, un efecto menos tóxico.

El resultado de los ensayos clonogénicos, representados en la **Figura 1.17**, mostró que el tratamiento de las células SH-SY5Y con péptido $A\beta_{(1-42)}$ disminuía significativamente la tasa de supervivencia y la formación de colonias en comparación con las células no tratadas. Por otro lado, la adición de los híbridos **TC04** y **TC05** revirtió la inhibición inducida por el péptido $A\beta_{(1-42)}$ sobre la proliferación celular considerando la tasa de recuperación y la formación de colonias celulares en comparación con las células tratadas solo con el péptido $A\beta_{(1-42)}$. Las concentraciones más bajas de ambos compuestos (0.0035 y 0.088 mM) (**Figura 1.17**) promovieron una recuperación celular mejor, siendo el compuesto **TC04** el más potente en cuanto a la tasa de supervivencia, ligeramente por encima del control negativo (en ausencia de péptido $A\beta_{(1-42)}$). El modulador alostérico **TC04** mostró una recuperación casi completa de las tasas de supervivencia después del tratamiento con el péptido $A\beta_{(1-42)}$ (tasa de supervivencia 1.1 aproximadamente en comparación con el control 1.0).

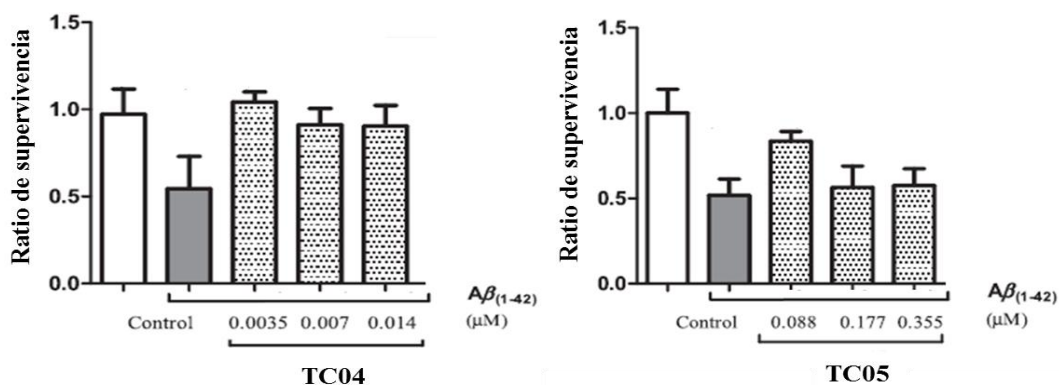


Figura 1.17. Ratio de supervivencia de las células SH-SY5Y tras exposición al péptido $A\beta_{(1-42)}$ y tratamiento con los compuestos TC04 y TC05. Los datos mostrados son las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes, cada uno desarrollado por duplicado. $p < 0.001$ indica diferencias estadísticamente significativas. El control negativo (blanco) se refiere a células no tratadas con péptido $A\beta_{(1-42)}$ y el control positivo (gris) a células tratadas únicamente con péptido $A\beta_{(1-42)}$.

Con respecto al ensayo de diferenciación neuronal usando células SH-SY5Y a lo largo de 10 días, se encontró que los compuestos **TC04** y **TC05** fueron capaces de promover cambios morfológicos (**Figura 1.18**), diferenciación neuronal y formación de neuritas extensas. Además

se observó una disminución de la proliferación celular, de manera análoga al ácido retinoico (AR), conocido por promover la neurodiferenciación⁵⁵.

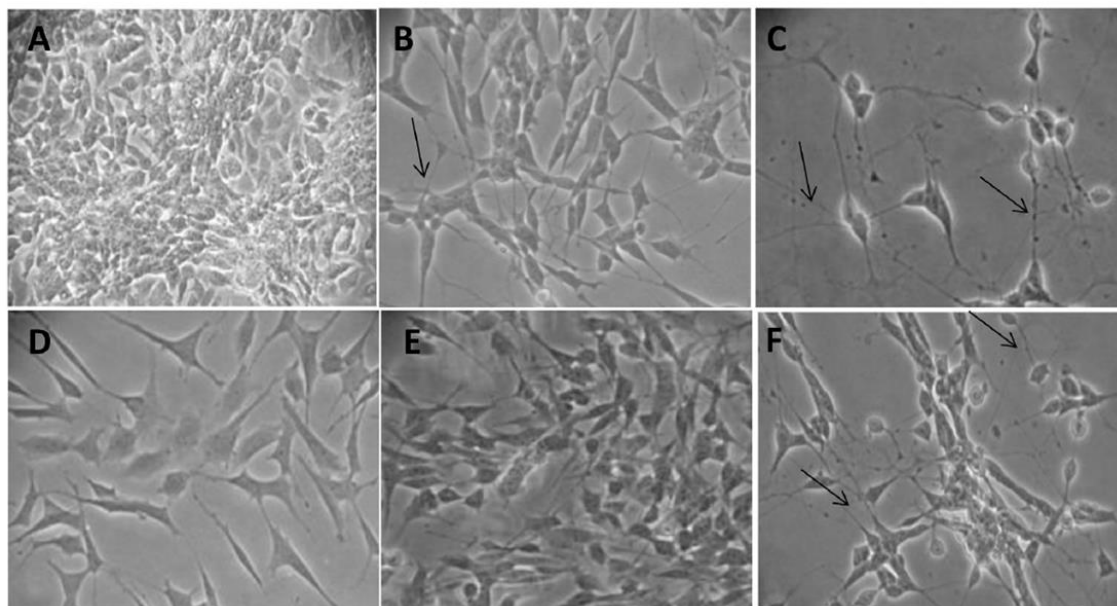


Figura 1.18. Morfología de células SH-SY5Y diferenciadas tratadas con los compuestos **TC04** y **TC05** durante 10 días continuados. A) Células control no tratadas; B) Células tratadas con el compuesto **TC04**; C) Células tratadas con el compuesto **TC05**; D) Células expuestas a donepezilo; E) Células expuestas a tacrina; F) Células expuestas a AR. Las flechas indican la formación de neuritas en células en etapas avanzadas de su diferenciación.

Posteriormente, se analizó la influencia de los compuestos **TC04** y **TC05** para potenciar el desarrollo de las neuritas, promoviendo así una interconexión neuronal precisa, usando ácido retinoico (AR) como control positivo para inducir adecuadamente la diferenciación de las células SH-SY5Y⁵⁴. Para ello, se midió el porcentaje de neuritas en células que presentasen, al menos, una neurita de longitud mayor que el diámetro del cuerpo celular (**Figura 1.19**). De este modo se pudo observar que ambos compuestos evaluados fueron capaces de inducir la formación de neuritas en comparación con el control negativo, pero en menor proporción que con AR. Como era de esperar, las células tratadas con AR mostraron un marcado efecto neurodiferenciador. El porcentaje de células portadoras de neuritas alcanzó $55 \pm 5.0\%$ después del tratamiento con el compuesto **TC04**, que fue significativamente mayor que el porcentaje observado para las células tratadas con el compuesto **TC05** ($43 \pm 4.58\%$), donepezilo ($33 \pm 5.29\%$) y tacrina ($38 \pm 1.52\%$). Todos estos hallazgos señalaron que el modulador alostérico **TC04** es el que presenta un mayor efecto biológico tanto en la inhibición de la función hidrolítica de *hAChE* ($IC_{50} = 0.014 \mu M$) como en la inducción de formación y crecimiento de neuritas⁴³.

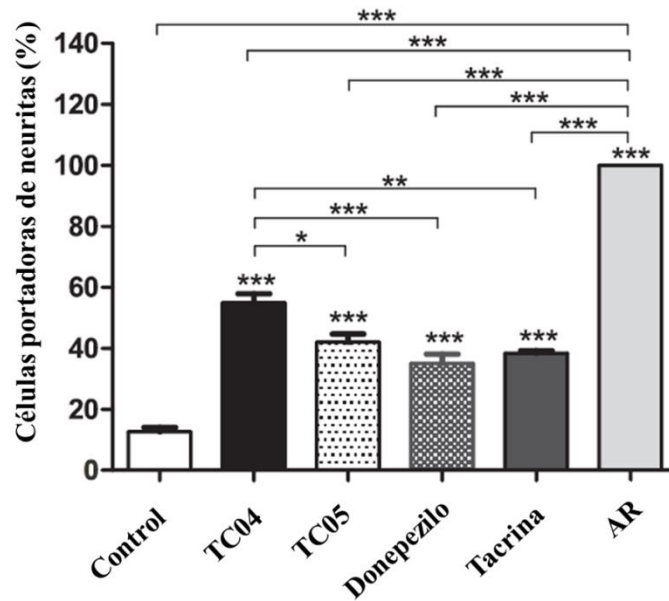


Figura 1.19. Efecto de los compuestos TC04, TC05, donepezilo, tacrina y AR en la formación de neuritas tras diez días de diferenciación. Los valores que se muestran son la media y desviación estándar. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ indican diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados obtenidos en su conjunto, parecen indicar que el compuesto **TC04** es un buen inhibidor de la actividad hidrolasa de *hAChE*, actuando como un modulador alostérico, mostrando un efecto neuroprotector al daño producido por el péptido $A\beta$, y promoviendo el crecimiento de neuritas. Esta última actividad podría ser atribuida a la modulación del *Sitio B* (o *Sitio 2*) de la *AChE*. Estos datos posicionan a **TC04** como un compuesto cabeza de serie interesante para el desarrollo de nuevos fármacos para la terapia de EA, además, de ser una valiosa herramienta farmacológica para la exploración de las diferentes funciones no colinérgicas de *hAChE*.

3.5 Identificación de nuevos moduladores alostéricos

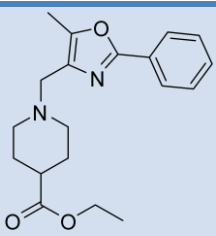
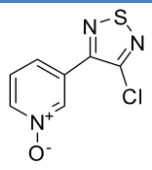
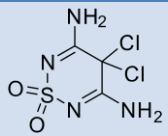
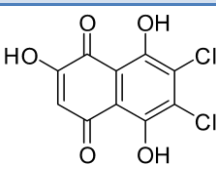
Con el fin de obtener herramientas farmacológicas útiles en el estudio de la función biológica de los *Sitios 2* y *3*, se planteó la búsqueda e identificación de nuevos moduladores alostéricos de *hAChE*, que pudieran modular tanto la función catalítica del enzima como algunas de las funciones no clásicas. Para ello se decidió focalizar esta búsqueda en compuestos capaces de modular los *Sitios 2* y *3* de *hAChE*, debido a que estos sitios comparten residuos con algunas de las “puertas de salida” del enzima, pudiendo resultar, al menos, como potenciales sitios de modulación de las funciones hidrolíticas. Esta tarea, se llevó a cabo mediante un cribado virtual de la quimioteca del grupo (quimioteca MBC⁵⁶) en los bolsillos *Sitios 2* y *3* de *hAChE*. En primer lugar se realizó una validación del protocolo de *docking*, tomando como referencia el ácido rosmarínico para el *Sitio 2* y su modo de unión teórico descrito⁴⁰. Los cálculos de *docking* se hicieron utilizando el programa Glide. Una vez validado el protocolo, se

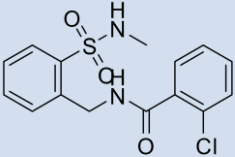
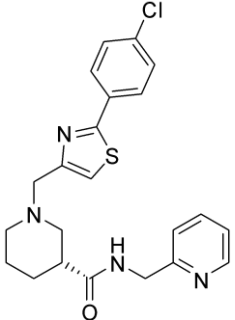
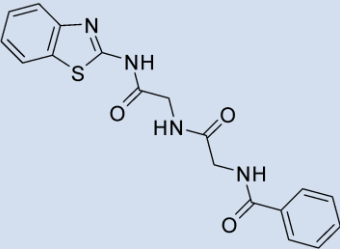
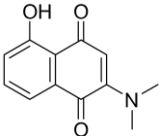
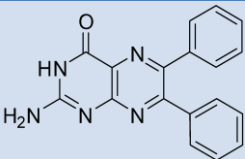
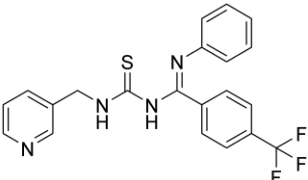
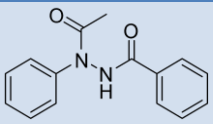
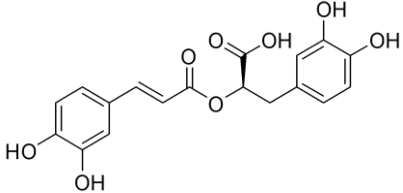
procedió a la preparación de la quimioteca MBC y al cálculo de *docking* utilizando Glide con precisión extra (modo XP), tanto para el *Sitio 2* como *3*. En el caso del *Sitio 3* no se pudo utilizar ningún control, debido a que no existe ningún compuesto descrito capaz de unirse a este bolsillo.

3.5.1 Cribado virtual en el *Sitio 2*

Se prepararon 1830 compuestos de la quimioteca MBC, centrando el *docking* en el punto medio de todos los residuos que forman parte del *Sitio 2*. Las poses resultantes del *docking* fueron filtradas, seleccionando únicamente los compuestos que fueran capaces de interactuar mediante enlace de hidrógeno con los residuos críticos identificados mediante FHM, siendo en este caso seleccionados los residuos de His404, Glu414 y Trp532. Los compuestos se eligieron en base a su mejor puntuación de *docking* siempre que mantuvieran alguna de las interacciones deseadas, resultando 9 compuestos seleccionados. Por otro lado, los dos compuestos que mostraron mejor puntuación de *docking* también fueron seleccionados, con la finalidad de analizar si las interacciones con los residuos deseados podían ser fundamentales para la unión y/o modulación alostérica. Además también se seleccionó el ácido rosmarínico como compuesto control. Los compuestos seleccionados se muestran en la **Tabla 1.3**.

Tabla 1.3. Compuestos seleccionados mediante cribado virtual. Se muestra la estructura de los compuestos, los valores experimentales de inhibición enzimática (IC_{50}) y las interacciones de enlace de hidrógeno que mantienen con *hAChE*.

Referencia	Estructura	IC_{50} (μM) ^a	Interacciones de enlace de hidrógeno
VSP2.47		>10 (35%)	Asn233, His405
DA003		>10 (40%)	His405, Trp532
SC274		>10 (33%)	Asn233, Asn533, Trp532
AEL039		>10 (45%)	Asn233, His405, Trp532

SC653		>10 (26%)	Trp532, Asn233
JHD1.21		>10 (33%)	Asn533, His405
MR3.61		>10 (37%)	Asn233, Asn533, His405
AEL011		>10 (44%)	Asn533, His405
SC251		2.76±0.25	Gln413, Asn533, His405
VP2.42		>10 (39%)	Trp532
SC008		>10 (38%)	His405, Trp532
Ácido rosmarínico		>10 (26%)	Asn533, Gln413, Thr238, Pro368, Arg296

^a % de inhibición enzimática a una concentración de 10µM está indicada entre paréntesis.

La actividad biológica de estos compuestos fue calculada mediante ensayo de inhibición enzimática basado en el método de Ellman⁵⁷ utilizando *hAChE* humana recombinante. Los resultados, recogidos en la **Tabla 1.3**, mostraron que todos los compuestos ensayados eran capaces de inhibir la función de *hAChE* en un mayor porcentaje que el ácido rosmarínico, a una concentración de 10 μM . Además, para el compuesto **SC251**, un derivado de pteridina con un porcentaje de inhibición mayor del 50%, se hizo el cálculo de la concentración a la cual se produce el 50% de la inhibición (IC_{50}) mostrando un valor de IC_{50} de 2.76 ± 0.25 .

Con el fin de identificar de manera experimental el mecanismo de acción del compuesto **SC251**, el más activo de todos los identificados en el cribado virtual, se llevó a cabo un estudio cinético en *hAChE*. El experimento se llevó a cabo utilizando cuatro concentraciones diferentes para el sustrato y tres concentraciones para el ligando. Se analizaron los gráficos Lineweaver-Burk de doble recíproco de los datos obtenidos, en los que cada punto es la media de tres experimentos diferentes (**Figura 1.20**).

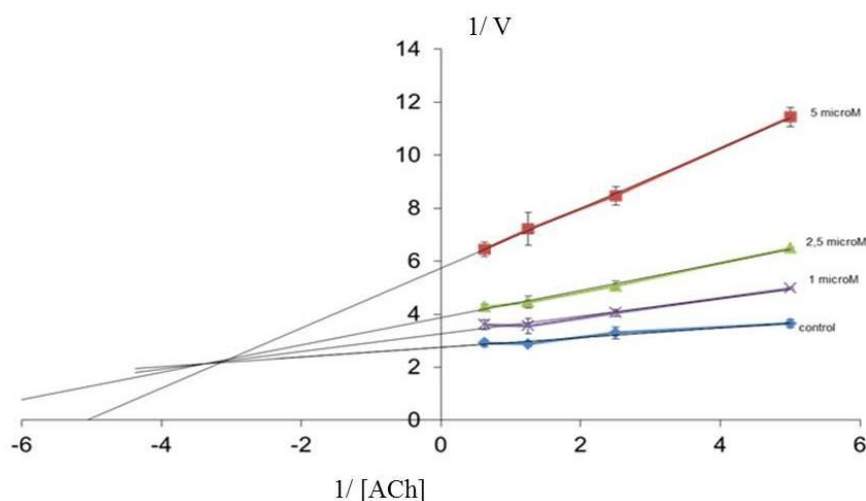


Figura 1.20. Gráfica Lineweaver-Burk de doble recíproco de los datos obtenidos, representando la velocidad inicial del enzima frente a las concentraciones en ausencia y presencia de ligando **SC251** (1-5 μM).

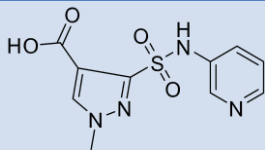
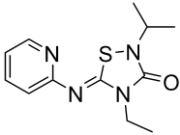
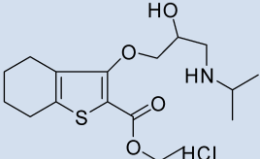
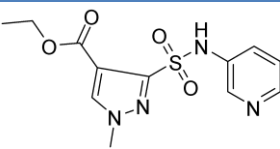
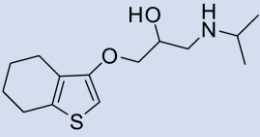
Los inhibidores competitivos tienen la misma intersección en el eje Y que el enzima no inhibido (dado que la velocidad máxima (V_{max}) no se ve afectada por inhibidores competitivos, el inverso de V_{max} tampoco cambia) teniendo diferentes pendientes e intersecciones en el eje X. La inhibición no competitiva produce rectas con la misma intersección en el eje X que el enzima no inhibido (K_m no se ve afectado) pero con diferentes pendientes e intersecciones en el eje Y. En el caso en el que la intersección se encuentra entre los ejes X e Y se puede hablar de un mecanismo de inhibición de tipo no competitivo mixto.

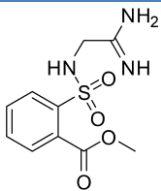
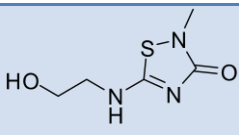
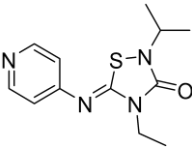
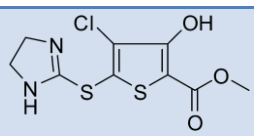
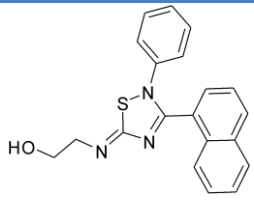
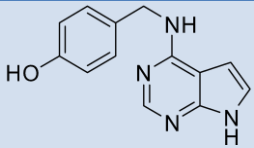
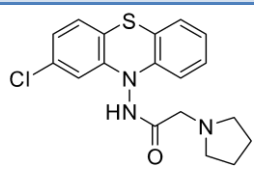
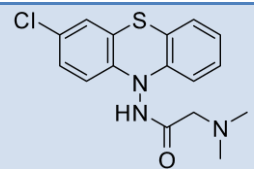
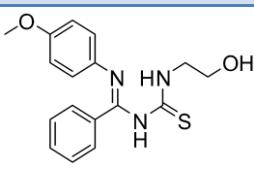
En este caso, los estudios cinéticos muestran un mecanismo de acción para el compuesto **SC251** de tipo mixto, sugiriendo que el compuesto es capaz de inhibir *hAChE* uniéndose tanto al sitio catalítico como a un sitio alostérico.

3.5.2 Cribado virtual en el *Sitio 3*

En la búsqueda de compuestos que se unan al *Sitio 3*, modulando la actividad catalítica de *hAChE*, se realizó un cribado virtual centrado en los residuos que forman parte de este bolsillo. En este procedimiento no se pudieron utilizar ligando control, ya que no hay descritos compuestos que se unan en esta cavidad. Por lo tanto, las condiciones del experimento de *docking* fueron las mismas que en el realizado para el *Sitio 2*. Para realizar el cribado, se aplicó como requisito que los ligandos fueran capaces de mantener interacciones por enlace de hidrógeno con los residuos de Glu81, Glu452 y/o Arg463, que fueron las interacciones más importantes calculadas mediante FHM. De este procedimiento resultaron catorce compuestos seleccionados para su ensayo de inhibición enzimático (**Tabla 1.4**).

Tabla 1.4. Valores de inhibición enzimática de *hAChE* de los compuestos seleccionados mediante cribado virtual para el *Sitio 3*. También se muestra la estructura de los compuestos y las interacciones de enlace de hidrógeno que mantienen con *hAChE*.

Compuesto	Estructura	IC ₅₀ (μM) ^a	Interacciones de enlace de hidrógeno
SC867		> 50	Arg463, Tyr465
AC088		> 50	Glu81
SC507		> 50 (24%)	Glu452
SC872		> 50	Glu452, Arg463
SC003		> 50	Glu452, Arg463

SC319		> 50	Glu81, Glu452, Arg463
AEL040		> 50	Glu81, Ser438
AC051		> 50	Glu81
SC484		> 50	Glu81
VP2.33		49.6±1.5 ^b	Glu81
VNG1.9		> 50	Glu81, Asn464
SC035		42.1±4.3 ^b	Arg463, Tyr465
SC045		> 50	Glu452, Arg463, Tyr465
VP1.58		> 50	Glu81, Glu452, Thr436

^a % de inhibición enzimática a una concentración de 10µM está indicada entre paréntesis.

La evaluación enzimática de estas catorce moléculas mostró unos inhibidores de *hAChE* menos eficaces que en el caso anterior y solo se calculó el valor de IC₅₀ de los compuestos **SC035** y **VP2.33**, mostrando valores cercanos a 50µM. Para ambos inhibidores, se realizó un estudio de competición, mostrando el punto de intersección en el eje X, lo que se correlaciona

con una inhibición no competitiva. A mayores concentraciones de sustrato, el porcentaje de inhibición disminuye como se muestra en la **Figura 1.21a-b**.

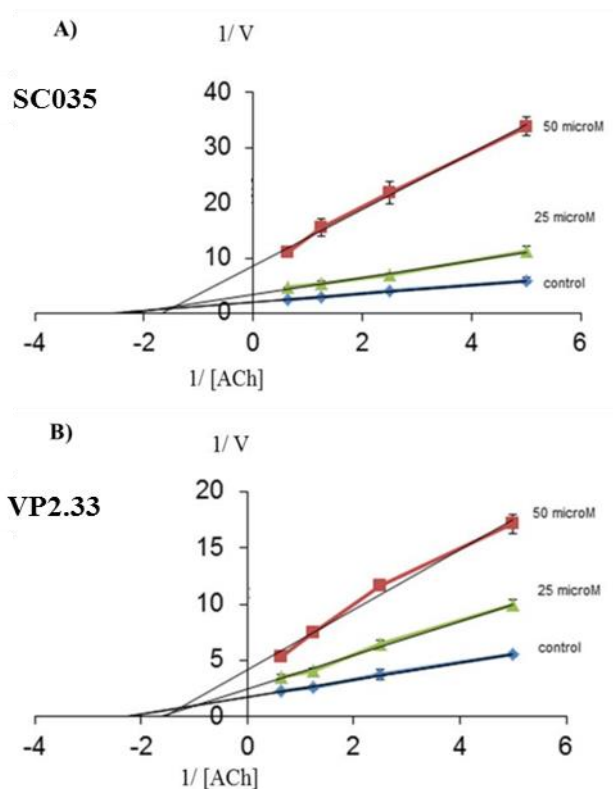


Figura 1.21. Gráfica Lineweaver-Burk de doble recíproco de los datos obtenidos, representando la velocidad inicial del enzima frente a las concentraciones en ausencia y presencia de ligando A) **SC035** y B) **VP2.33**.

Para validar el comportamiento alostérico de estos dos compuestos heterocíclicos, se midió su capacidad de inhibición de *hAChE* en presencia de un inhibidor de comportamiento competitivo puro, llamado **JTE-907**⁵⁸. Este compuesto sintetizado en nuestro grupo, es capaz de interactuar con el CAS, ocupando totalmente la garganta catalítica. Por ello, los estudios en presencia de este compuesto pueden mostrar la capacidad de otras moléculas de competir por su unión en la garganta catalítica. Si la hipótesis fuera correcta, la unión de los compuestos **SC035** y **VP2.33** a un sitio alostérico en presencia del inhibidor **JTE-907** debería mostrar un comportamiento cooperativo, aditivo o sinérgico en términos de inhibición de *hAChE*.

Los resultados de este experimento se pueden observar en las **Tablas 1.5 y 1.6**, en las que se muestran los valores de inhibición de cada compuesto de forma individual y cooperativa. En el caso del compuesto **VP2.33**, los datos indican que la inhibición de *hAChE* se trata de un efecto cooperativo, ya que ambos compuestos en conjunto poseen porcentajes de inhibición muy superiores a cada uno por separado, sin llegar a ser efectos aditivos o sinérgicos. Esto apoya la idea de que el compuesto **VP2.33** se une a un sitio totalmente distinto de la garganta catalítica.

Tabla 1.5. Resultados del ensayo de inhibición de *hAChE* producidos por una mezcla de **JTE-907** (a concentraciones de 20, 10 y 5 μM) y **VP2.33** (a 50 y 25 μM). Los valores entre paréntesis muestran la inhibición individual del enzima.

	VP2.33 50 μM (57.71 \pm 1.38 %)	VP2.33 25 μM (27.28 \pm 3.51 %)
JTE907 20 μM (65.10 \pm 2.37 %)	90.06 \pm 1.05 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -24.96$ $\Delta I_{\text{VP2.33}} = 32.35$	80.76 \pm 1.15 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -15.66$ $\Delta I_{\text{VP2.33}} = 53.48$
JTE907 10 μM (56.78 \pm 1.35 %)	85.42 \pm 1.74 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -28.74$ $\Delta I_{\text{VP2.33}} = 27.71$	68.57 \pm 1.91 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -11.79$ $\Delta I_{\text{VP2.33}} = 41.29$
JTE907 5 μM (30.34 \pm 2.85 %)	74.87 \pm 2.01 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -44.53$ $\Delta I_{\text{VP2.33}} = 17.16$	50.20 \pm 2.73 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -19.86$ $\Delta I_{\text{VP2.33}} = 22.90$

Tabla 1.6. Resultados del ensayo de inhibición de *hAChE* producidos por una mezcla de **JTE-907** y **SC035**. En las columnas de la izquierda están señalados los compuestos añadidos en primer lugar al experimento y sus concentraciones, siendo los compuestos de la fila superior los añadidos en segundo lugar y sus respectivas concentraciones. Los valores entre paréntesis muestran la inhibición individual del enzima.

	SC035 50 μM (58.72 \pm 1.24 %)	SC035 25 μM (42.33 \pm 3.27 %)		JTE90 7.5 μM (34.22 \pm 1.13 %)	JTE907 2.5 μM (14.09 \pm 2.85 %)
JTE907 20 μM (65.78 \pm 2.37 %)	62.44 \pm 2.75 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -3.34$ $\Delta I_{\text{SC035}} = 3.72$	62.32 \pm 1.65 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -3.46$ $\Delta I_{\text{SC035}} = 19.99$	SC035 70 μM (75.32 \pm 3.03 %)	54.55 \pm 2.19 $\Delta I_{\text{SC035}} = -20.77$ $\Delta I_{\text{JTE907}} = 20.33$	62.11 \pm 1.09 $\Delta I_{\text{SC035}} = -13.21$ $\Delta I_{\text{JTE907}} = 48.02$
JTE907 5 μM (34.22 \pm 1.13 %)	53.74 \pm 3.00 $\Delta I_{\text{JTE907}} = 19.52$ $\Delta I_{\text{SC035}} = -4.98$	44.59 \pm 2.01 $\Delta I_{\text{JTE907}} = 10.47$ $\Delta I_{\text{SC035}} = 2.26$	SC035 50 μM (58.72 \pm 1.24 %)	51.42 \pm 3.75 $\Delta I_{\text{SC035}} = -7.3$ $\Delta I_{\text{JTE907}} = 17.2$	48.00 \pm 2.07 $\Delta I_{\text{SC035}} = -10.72$ $\Delta I_{\text{JTE907}} = 33.91$
JTE907 2.5 μM (14.09 \pm 2.85 %)	47.09 \pm 1.50% $\Delta I_{\text{JTE907}} = 33$ $\Delta I_{\text{SC035}} = -11.76$	35.59 \pm 2.26 $\Delta I_{\text{JTE907}} = -21.5$ $\Delta I_{\text{SC035}} = -6.74$	SC035 25 μM (42.33 \pm 3.27 %)	(48.00 \pm 2.07 %) $\Delta I_{\text{SC035}} = 5.67$ $\Delta I_{\text{JTE907}} = 13.78$	32.50 \pm 2.84 $\Delta I_{\text{SC035}} = -6.83$ $\Delta I_{\text{JTE907}} = 18.41$

Del mismo modo, cuando este experimento se llevó a cabo utilizando el compuesto **SC035**, no se pudieron observar efectos cooperativos ni aditivos en la inhibición de *hAChE* (Tabla 1.6). En este caso se realizó el experimento de dos maneras diferentes: añadiendo en primer lugar diferentes concentraciones del compuesto **JTE-907** y posteriormente el compuesto **SC035**, como en segundo lugar añadiendo diferentes concentraciones en primer lugar del compuesto **SC035** y, posteriormente, el **JTE-907**. En ambos casos no se pudo observar un incremento en la inhibición de la actividad, por lo que estos experimentos no fueron concluyentes a la hora de apoyar la hipótesis del compuesto **SC035** como un modulador alostérico puro, ya que estos resultados podrían indicar una posible unión al PAS. Estos ensayos

muestran que los compuestos **VP2.33** y **SC035**, inhiben *hAChE* en un rango similar de actividad, pero con mecanismos de acción diferentes.

3.5.3 Dinámica molecular

Con el objetivo de refinar las poses obtenidas en el cribado virtual, y obtener información del modo de unión de los compuestos **SC251** y **VP2.33**, se llevaron a cabo estudios de dinámica molecular (MD). Los estudios de MD son una poderosa herramienta para estudiar en detalle los comportamientos químicos y eventos que puedan suceder en sistemas biológicos. Más en particular, en este estudio se ha estudiado el comportamiento de los ligando **SC251** y **VP2.33** en *hAChE*, para analizar los posibles cambios tanto en el comportamiento como en la conformación de *hAChE*, tanto en los *Sitios 2* y *3* como en la garganta catalítica.

3.5.3.1 Sitio 2 y SC251

Partiendo de la pose obtenida en el estudio de *docking* se realizó una simulación de dinámica molecular de un tiempo de 25 nanosegundos. Para explorar la estabilidad del movimiento dinámico del sistema, se calcularon los valores de la desviación de la raíz cuadrada de la media (*root-mean-square deviation*, RMSD) para los átomos del esqueleto de la proteína a lo largo de la dinámica (**Figura 1.22**). Tras un ajuste inicial, los valores de RMSD se mantienen estables a lo largo de la trayectoria, manteniéndose en valores entre 1.6 y 1.9Å.

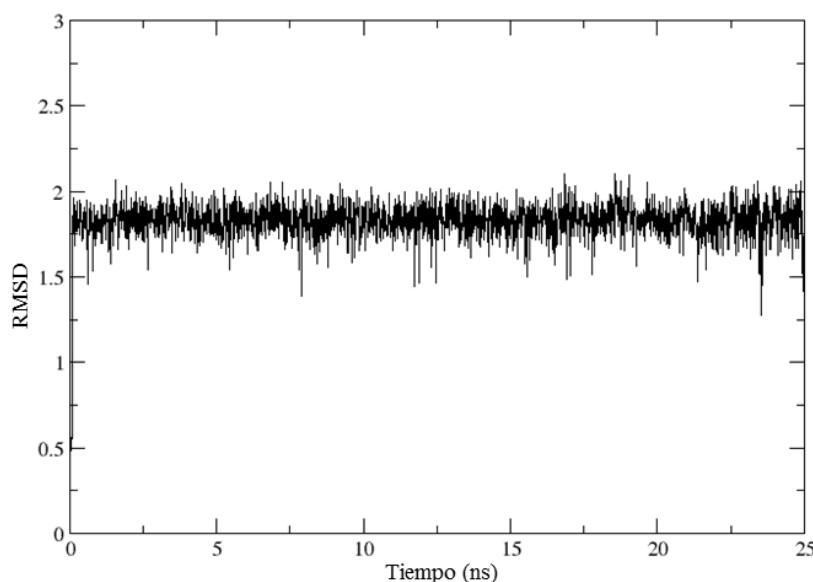


Figura 1.22. Gráfica de la variación del RMSD de los átomos del esqueleto de *hAChE* a lo largo de la simulación del complejo *hAChE-SC251*.

A lo largo de la trayectoria, el ligando **SC251** posee movimiento dinámico, manteniéndose siempre similar a su pose inicial. De este modo, durante la simulación el ligando es capaz de interactuar mediante un enlace de hidrógeno dador con Asn533 (durante el 85%

de la simulación), y un enlace de hidrógeno aceptor con His404 (durante el 50% de la simulación). Es interesante remarcar que la interacción de enlace de hidrógeno dador que inicialmente mantenía con Gln413 se pierde en la trayectoria, apareciendo únicamente en un 2% del tiempo.

La fluctuación de la raíz cuadrada de la media (*root-mean-square fluctuation*, RMSF) de la simulación de *hAChE* en su forma *apo* sin ligando se comparó con la fluctuación para la proteína en complejo con **SC251**, con el objetivo de analizar diferencias en el comportamiento de residuos en particular a lo largo de la simulación (**Figura 1.23**). Aparecen, diferencias en el comportamiento de algunos residuos entre simulaciones, siendo la más importante la correspondiente a los residuos del 70 al 78, que pertenecen al *loop omega*, residuos que están implicados en la conocida como “puerta lateral”. Podemos observar que estos residuos se muestran más rígidos cuando el ligando **SC251** se une al *Sitio 2*, como muestra el cambio en el RMSF de 3Å a aproximadamente 1Å, lo que podría estar relacionado con la imposibilidad de apertura de la puerta lateral mientras el ligando se encuentre unido en el *Sitio 2*.

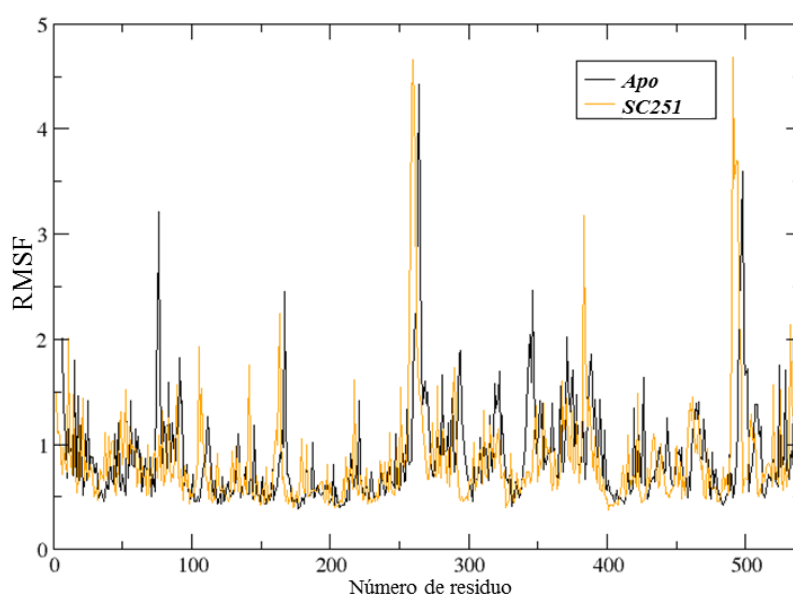


Figura 1.23. Valores obtenidos de RMSF para las simulaciones de *hAChE* en su forma *apo* sin ligando (negro) y del complejo *hAChE-SC251* (amarillo).

Para analizar los posibles cambios conformacionales, la aparición o desaparición de algunas cavidades a lo largo de la dinámica, o incluso la apertura o cierre de las teóricas “puertas de salida” de *hAChE*, se usó TRAPP⁵⁹ para analizar las trayectorias de las simulaciones de *hAChE* en su forma *apo* y en complejo con **SC251**. TRAPP es una herramienta que permite el análisis de la evolución de las propiedades espaciales y fisicoquímicas de un bolsillo específico de una proteína a lo largo de una simulación de MD. Para ello se seleccionó uno de cada cinco *frames* o imágenes de la trayectoria, como archivo a analizar. El análisis con TRAPP

de la garganta catalítica en la trayectoria de *hAChE apo* mostró que a lo largo de la simulación, las “puertas lateral y trasera” aparecen abiertas al menos en el 50% de la trayectoria analizada (**Figura 1.24**), como otros estudios teóricos también muestran⁴⁶.

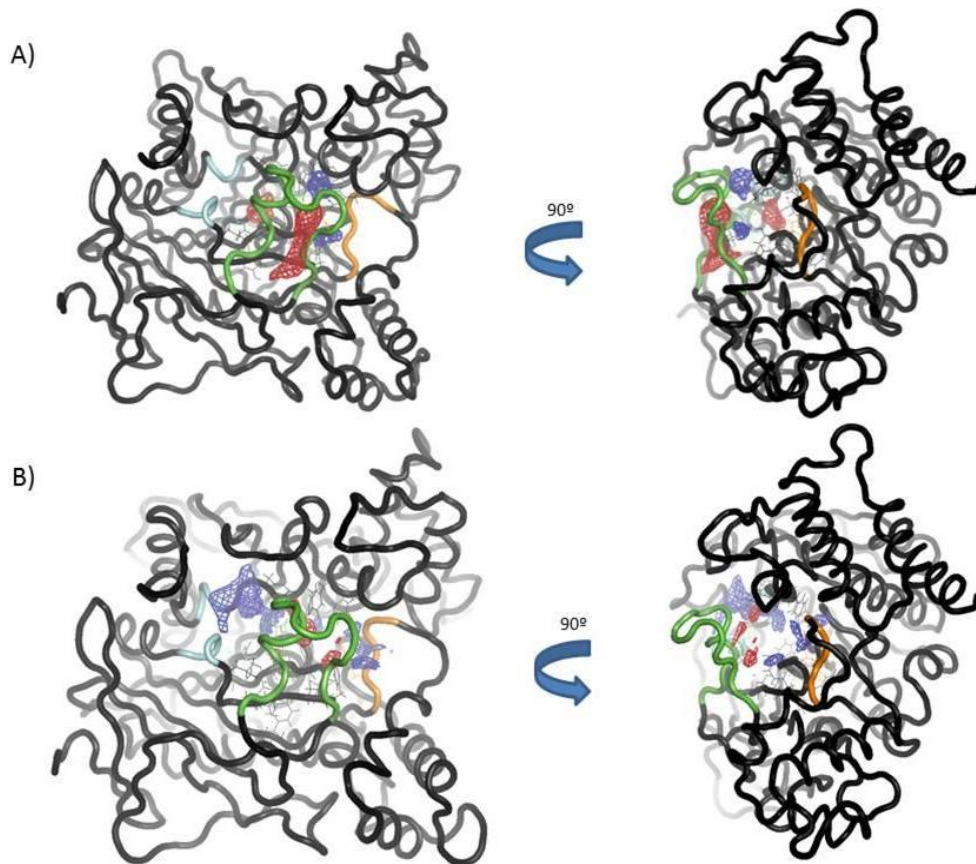


Figura 1.24. A) Resultados de análisis con TRAPP para la trayectoria de *hAChE apo*. B) Resultados del análisis con TRAPP para la trayectoria de *hAChE* en complejo con **SC251**. Regiones en azul representan las áreas que desaparecen en al menos el 50% de la trayectoria analizada, áreas rojas representan las regiones que aparecen en al menos el 50% de la trayectoria analizada. El loop verde se corresponde con la puerta lateral, el loop naranja corresponde al loop acilo, y los residuos en azul con la puerta trasera.

La “puerta del *loop acilo*” es menos flexible que las otras dos, por lo que es más complicado que se dé la apertura de la puerta, como también han mostrado estudios previos⁴⁶. Por lo tanto, en nuestra simulación, tiene sentido que solo podamos ver la apertura de la puerta en al menos el 25% de la trayectoria analizada.

En el caso de la trayectoria del complejo *hAChE-SC251*, el análisis con TRAPP y su comparación con los resultados obtenidos de la trayectoria de *hAChE apo* pudo aportar algunas diferencias interesantes. Como se comentó previamente, el *loop omega* de la forma *apo* de *hAChE* es muy flexible, permitiendo la apertura de la “puerta lateral”. En la trayectoria del complejo con **SC251**, el *loop omega* se comporta de un modo mucho más rígido, y como resultado esta puerta es incapaz de abrirse tanto tiempo a lo largo de la dinámica. Otra diferencia se puede observar en la “puerta trasera”. Mientras en la dinámica de *hAChE* se puede

ver en la **Figura 1.24** un área roja que indica la aparición de un bolsillo a lo largo de la simulación, en la simulación del complejo se puede ver un área azul, relacionada con la desaparición de esa cavidad, sugiriendo que esta “puerta trasera” se cierra en la simulación, pudiendo disminuir la velocidad de hidrólisis del enzima. Otra de las diferencias que se pudieron observar fue en el comportamiento del *loop acilo*. En la simulación de la proteína sin ligando, este *loop* permanece rígido como se ha comentado previamente. En el caso de la trayectoria con el ligando, se puede observar un área azul en la garganta, enfrente de este *loop*, mostrando que una parte del bolsillo desaparece, sugiriendo que el *loop* puede moverse hacia el interior de la garganta catalítica.

En términos generales, se ha podido observar que en la simulación con el compuesto **SC251**, las diferentes regiones que forman las tres puertas de salida se comportan de una manera más rígida. Todos estos datos se encuentran en sintonía con la teoría de alosterismo que propone que la unión de un ligando a una proteína puede reducir la entropía del sistema, de tal modo que la conformación de la proteína se mantenga fija, restringiendo su movimiento y modificando su comportamiento⁶⁰, y por lo tanto pudiendo disminuir su capacidad de hidrólisis de ACh.

3.5.3.2 Sitio 3 y VP2.33

Simulaciones de MD también se han calculado en el caso del compuesto **VP2.33**, para comprobar el comportamiento de este ligando en el *Sitio 3* y como éste puede afectar al comportamiento de *hAChE*.

Los valores de RMSD de los átomos del esqueleto de la proteína se calcularon y se pueden observar en la **Figura 1.25**. Tras el ajuste inicial, los valores de RMSD a largo plazo se estabilizan en un rango que va desde 1.2Å a 1.8Å a lo largo de toda la simulación. Aparentemente puede parecer que el RMSD fluctúa mucho más que en la otra simulación, pero en comparación con el RMSD de la trayectoria de *hAChE apo* se puede observar que los perfiles son muy similares.

A lo largo de la simulación, la pose del ligando permanece estable, manteniendo interacciones dadoras de enlaces de hidrógeno con Glu440 (durante el 95% de la simulación) e interacciones dadoras yceptoras de enlaces de hidrógenos con Thr443 (durante el 30% de la simulación).

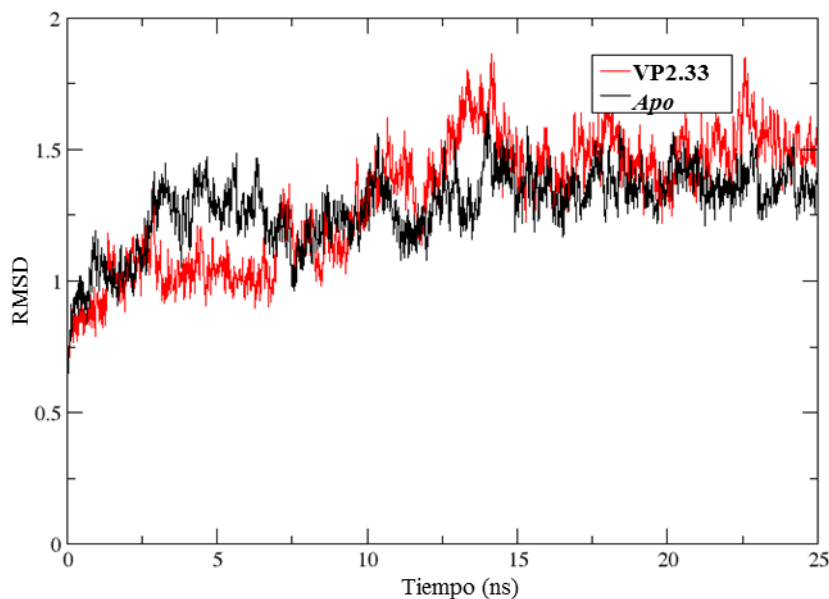


Figura 1.25. Gráfica de la variación del RMSD de los átomos del esqueleto de *hAChE* a lo largo de la simulación del complejo *hAChE-VP2.33* (rojo) frente a la simulación de *hAChE apo* sin ligando (negro).

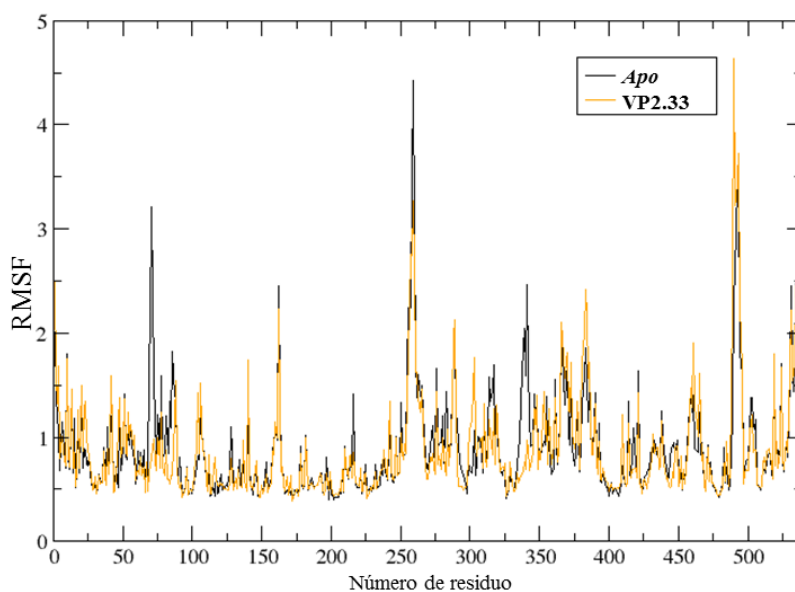


Figura 1.26. Valores obtenidos de RMSF para las simulaciones de *hAChE* en su forma *apo* sin ligando (negro) y del complejo *hAChE-VP2.33* (amarillo).

De manera análoga al primer estudio, también se calculó el RMSF y se comparó con la simulación de la forma *apo* sin ligando de *hAChE* (**Figura 1.26**). Una de las diferencias se puede observar en los residuos que forman el *loop omega*, en donde aparece una reducción en el movimiento cuando el compuesto **VP2.33** se une al *Sitio 3*. Las regiones que forman los residuos del 251 al 260 y del 330 al 347 también ven reducida su movilidad, aunque en este caso no tienen por qué afectar al funcionamiento catalítico del enzima ya que son regiones

expuestas al solvente. Esta rigidez puede sugerir la formación de un complejo **VP2.33-hAChE** muy estable, que es capaz de reducir su entropía⁶¹.

Para estudiar mejor el comportamiento de las puertas y los residuos de la garganta de *hAChE* se realizó un estudio con TRAPP de la trayectoria, de manera análoga al estudio del compuesto **SC251**. El comportamiento del *loop omega*, cuyo movimiento permite la apertura de la “puerta lateral”, se modifica durante la unión del compuesto **VP2.33** (**Figura 1.27**). Se puede apreciar, que en la “puerta lateral” no se forma un nuevo bolsillo, cosa que sí sucede en la dinámica *hAChE apo*. Además, este hecho está apoyado por el RMSF que muestra que los residuos que forman el *loop omega* se mueven menos durante la simulación.

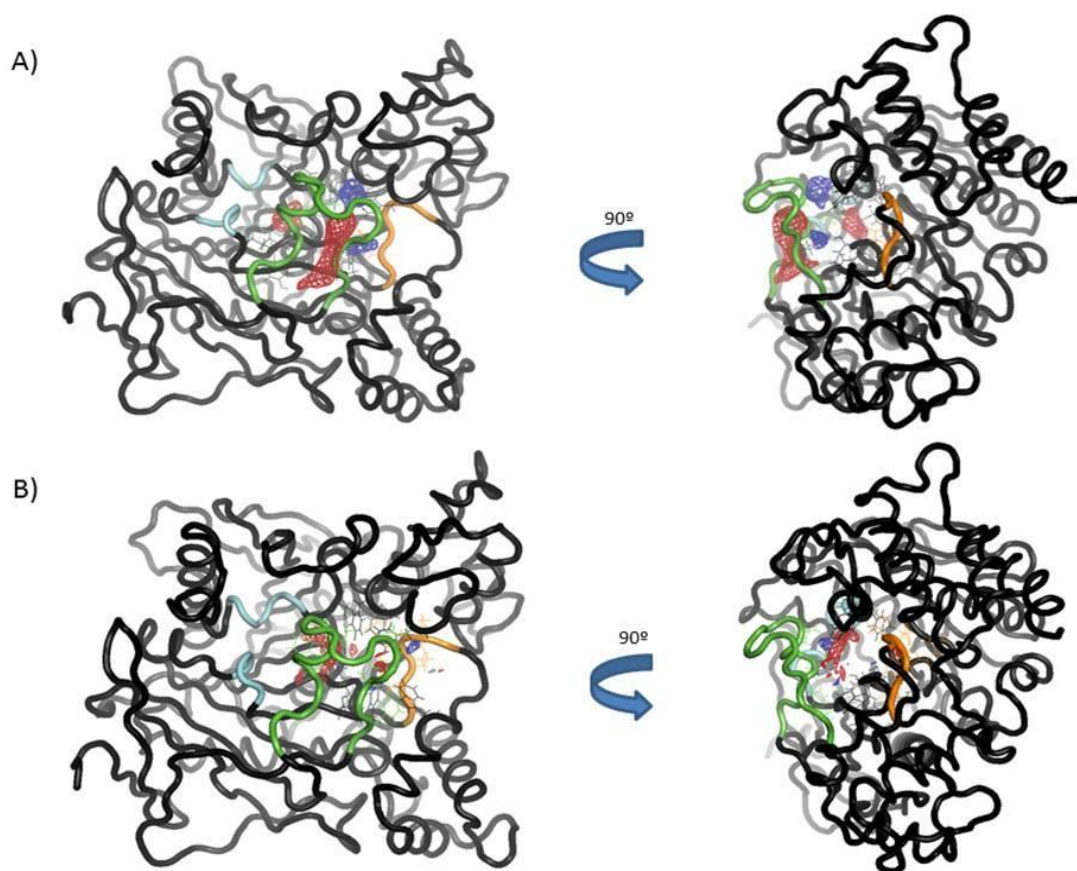


Figura 1.27. A) Resultados de análisis con TRAPP para la trayectoria de *hAChE apo*. B) Resultados del análisis con TRAPP para la trayectoria de *hAChE* en complejo con **VP2.33**. Regiones en azul representan las áreas que desaparecen en al menos el 50% de la trayectoria analizada; áreas rojas representan las regiones que aparecen en al menos el 50% de la trayectoria analizada; el loop verde se corresponde con la puerta lateral; el loop naranja corresponde al loop acilo, y los residuos en azul con la puerta trasera.

En el análisis del movimiento de la “puerta trasera”, no se aprecian diferencias significativas en el comportamiento de los residuos frente a la simulación sin ligando. Esto podría sugerir la hipótesis de que el compuesto **VP2.33** podría bloquear el aclaramiento de ACh sin modificar el comportamiento de los residuos implicados en la puerta. Por último, el análisis

del *loop acilo*, no revela grandes cambios cuando el ligando está unido, sugiriendo que este *loop* no tiene por qué estar relacionado con el mecanismo de acción del **VP2.33**.

Como resumen, el compuesto **VP2.33** permanece estable a lo largo de la simulación, interaccionando con los residuos Thr433 y Glu440, pudiendo bloquear el *Sitio 3* sin modificar el comportamiento dinámico de la “puerta trasera”. Además, también se observa que los residuos que forman parte de la puerta lateral presentan un menor movimiento, previniendo la apertura de la puerta, lo que podría ser otra de las razones de la actividad del compuesto **VP2.33**.

4. CONCLUSIONES

Los experimentos desarrollados han permitido el estudio racional de la estructura de un enzima clave para en la EA, la *hAChE*. Se han valorado los posibles sitios de unión alostéricos presentes en *hAChE* y los residuos con mayor capacidad de interacción en ellos, mostrándose los *Sitios 2* y *3* como los bolsillos de mayor interés para la búsqueda de compuestos moduladores alostéricos. Utilizando diferentes aproximaciones experimentales como la mecánica molecular, metodología PELE, estudios de *docking* y simulaciones de dinámica molecular, se puede proponer que el compuesto híbrido **TC04** se une a la *hAChE* en el denominado *Sitio 2*. Este compuesto es un modulador alostérico puro de *hAChE* y ha mostrado, además de una buena inhibición de la función hidrolítica de *hAChE*, buenas propiedades biológicas adicionales como un aumento en la tasa de supervivencia celular y en el crecimiento de neuritas. Estos resultados evidencian que los compuestos moduladores alostéricos de *hAChE* que se unan a sitios diferentes de la garganta catalítica, son capaces de modular las funciones no hidrolíticas, pudiendo ser muy beneficiosos en el tratamiento de la EA.

Los estudios de cribado virtual y dinámica molecular sobre dos de los sitios alostéricos determinados en *hAChE* han permitido la identificación de dos moduladores alostéricos del enzima, los compuestos **SC252** y **VP2.33**, que poseen un modo de unión teórico para los *Sitios 2* y *3* respectivamente. Estos compuestos tienen valores de inhibición de la función catalítica del enzima del rango micromolar, pudiendo resultar compuestos de interés farmacológico para posteriores estudios de su influencia en las funciones no clásicas de *hAChE*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Búsqueda de bolsillos

Para identificar los diferentes bolsillos y cavidades en AChE se utilizó el programa Fpocket⁴⁹ (<http://www.sourceforge.net/projects/fpocket>), un paquete informático de código abierto. Fpocket está basado en el concepto de las α -esferas. Estas esferas son capaces de contactar con cuatro átomos a su alrededor sin contener ningún átomo en su interior. Para una proteína, las esferas pequeñas son capaces de estar en las regiones más internas de la proteína, las esferas de mayor tamaño se localizan en el exterior, mientras que las esferas de un radio intermedio corresponden a los bolsillos y cavidades existentes en la superficie de la proteína⁶². Fpocket utiliza un algoritmo en tres etapas, siendo la primera de ellas el cálculo de todo el entramado de α -esferas tomando como referencia una estructura rígida de la proteína, y resultando un conjunto pre-filtrado de esferas. La segunda etapa consiste en la identificación de grupos de esferas próximas entre sí, identificando bolsillos y eliminando los conjuntos que no sean de interés. Por último, se procede al cálculo de las propiedades de cada bolsillo, teniendo en cuenta los átomos y residuos que forman parte de cada bolsillo, con el fin de puntuar y clasificar los bolsillos en función de sus propiedades para poder albergar ligandos.

Para su posterior cálculo con Fpocket se utilizaron catorce estructuras de hAChE y depositadas en Protein Data Bank (www.pdb.org) (PDB IDs: 1B41, 1F8U, 2X8B, 3LII, 4BDT, 4EY4, 4EY5, 4EY6, 4EY7, 4EY8, 4M0E, 4M0F, 4PQE, 5FPQ)⁵²⁻⁵⁸. Las estructuras fueron preparadas utilizando la herramienta *Protein Preparation Wizard*⁶³ de Maestro⁶⁴ para eliminar las moléculas de agua, ligandos e iones, así como para añadir los átomos de hidrógeno y asignar los órdenes de enlace. Tras el cálculo con Fpocket, los bolsillos de las catorce estructuras fueron analizados para identificar los bolsillos más conservados en el conjunto de estructuras mediante análisis de los residuos e inspección visual.

5.2 Análisis de los posibles puntos de unión ligando-proteína

El programa Fragment Hotspot maps (FHM)⁵⁰ es capaz de identificar la localización y calidad de los posibles puntos de unión en una proteína mediante el cálculo de *hotspots* atómicos y un posterior mapeo de la proteína mediante moléculas prueba simples (anilina, ciclohexa-2,5-dienona y bencilo). Estos mapas que produce FHM resumen sitios de unión de fragmentos o moléculas pequeñas y sus correspondientes farmacóforos. Las interacciones de enlace de hidrógeno aceptor, donador e interacciones apolares y aromáticas se analizan mediante este programa, produciendo una información interesante que se puede aplicar en la búsqueda de nuevos ligandos que se unan a las dianas y ayudando a proponer sustituciones en

fragmentos para mejorar su afinidad. Estos mapas pueden utilizarse tanto como una restricción farmacofórica a aplicar en estudios de *docking* y cribado virtual como visualmente, siendo los compuestos que sean capaces de ocupar las áreas del FHM los compuestos que puedan interactuar mejor con la diana y tener mayor afinidad.

Para el cálculo de FHM se utilizó una estructura de *hAChE* en su forma *apo* (PDB ID: 4ey4), que previamente había sido preparada siguiendo el protocolo previamente descrito. El cálculo de FHM se llevó a cabo utilizando un *script* propio, desarrollado por Chris Radoux en la Universidad de Cambridge. Los mapas de FHM fueron visualizados utilizando el programa PyMol⁶⁵, para poder identificar los residuos que podrían ser de interés en la interacción ligando-diana.

5.3 Estudio del modo de unión de híbridos de donepezilo y tacrina

5.3.1 Búsqueda de bolsillos de unión

El programa PELE⁵³ fue utilizado para realizar la búsqueda de los bolsillos de unión. PELE combina una aproximación Monte Carlo estocástica con algoritmos de predicción de estructura de proteína. Se basa en un algoritmo de tres pasos, que en su primera etapa lleva a cabo perturbaciones locales mediante pequeños desplazamientos en modo normal anisotrópico de baja frecuencia, minimizando los carbonos alfa y obteniendo nuevas posiciones para estos. El segundo paso es la búsqueda conformacional de las cadenas laterales de la proteína, produciéndose finalmente una optimización energética para localizar el mínimo energético local. El conjunto de tres etapas forman parte de un movimiento dinámico, que puede ser aceptado o rechazado en base a un criterio conocido como Metropolis. Esto significa que cuando cualquier trayectoria está significativamente más avanzada que cualquiera de las otras trayectorias, la trayectoria final se abandona y se reinicia desde la posición de la trayectoria principal. Esto permite un muestreo eficiente del espacio tridimensional y conformacional con un único objetivo: la búsqueda del bolsillo más probable de unión para cada ligando.

La búsqueda del bolsillo de unión más probable para los compuestos **TC02** y **TC04**, se realizó tomando la molécula de donepezilo como control positivo para la validación de este protocolo. Para ello se preparó la estructura *apo* de *hAChE* (PDB ID 4ey4) utilizando el protocolo previamente descrito.

5.3.2 Estudios de *docking*

Los estudios de *docking* para la evaluación del posible modo de unión de los compuestos **TC02** y **TC04** se llevaron a cabo utilizando el programa AutoDock v4.2⁶⁶. Para ello se seleccionó la estructura *apo* de hAChE (PDB ID 4ey4) preparada previamente. Los ligandos fueron preparados utilizando LigPrep de Maestro, ionizándolos a pH=7.2±0.2, resultando estructuras protonadas en el nitrógeno de la piperidina. La malla se centró en el punto medio de la mejor pose obtenida en la búsqueda de cavidades para el compuesto **TC04**. Se calculó una malla de 60x60x60 puntos con un espaciado entre puntos de 0.375Å, siendo los valores para algoritmo genético de 200 poses por compuesto, con una población de 150 y un número de evaluaciones de 250000. Las poses obtenidas para cada compuesto fueron evaluadas mediante su agrupamiento en grupos que no difieran en más de 2.0 de RMSD.

5.3.3 Dinámica molecular

Estudios de dinámica molecular se llevaron a cabo utilizando AMBER14 y su código para cálculos en GPU⁶⁷, con el objetivo de refinar las poses obtenidas mediante *docking* y realizar una hipótesis acerca del mecanismo de acción de estos compuestos. Para ello se utilizó el campo de fuerzas ff14SB⁶⁸. Se seleccionaron como punto inicial para estos estudios las tres mejores poses para cada sitio de unión de **TC04** y la mejor pose para el compuesto **TC02**. Además, también se calculó una trayectoria de hAChE en estado *apo* y sin ligando, para el análisis de su comportamiento normal y su comparación con los complejos.

La geometría de los diferentes ligandos se optimizó utilizando el programa Gaussian09⁶⁹, usando el método HF6-311++(d,p) y calculándose así las cargas RESP. Los sistemas fueron solvatados utilizando el modelo TIP3P⁷⁰, en una caja cúbica, neutralizando el sistema mediante la adición de átomos de Na⁺. Estos sistemas solvatados se optimizaron en 3 etapas de 8000 pasos, de los cuales los primeros 4500 se realizaron siguiendo el método *steep descent* y los 3500 finales utilizando gradiente conjugado. En la primera etapa se minimizaron los átomos de hidrógeno, en la segunda etapa, las moléculas de agua e iones y en la tercera etapa, el sistema al completo sin restricciones. El sistema se equilibró posteriormente a una temperatura de 300K y presión de 1 bar, aplicando una restricción a proteína y ligando de 15 kcal·mol⁻¹·Å. Estas restricciones fueron reduciéndose progresivamente hasta su desaparición. Por último, se calcularon trayectorias de 25 ns de tiempo utilizándose un corte de 10 Å para las interacciones de Lennard-Jones y activándose el algoritmo SHAKE⁷¹. Para regular la presión y temperatura del sistema se utilizó el baróstato de Berendsen⁷² y termostato de Langevin respectivamente. Las trayectorias fueron analizadas utilizando el módulo Cpptraj⁷³, se visualizaron en el programa VMD⁷⁴ y la producción de las gráficas se llevó a cabo con el programa Xmgrace⁷⁵. Se almacenaron uno de cada cinco *frames* o fotogramas de las trayectorias en nuevas trayectorias

en formato PDB para ser posteriormente analizadas mediante el programa TRAPP⁵⁹. Se analizó la variación de la garganta catalítica a lo largo de la simulación, y además, se realizó un análisis de PCA para la trayectoria, obteniendo los modelos más representativos de la conformación de la garganta catalítica en cada trayectoria.

5.4 Identificación de nuevos moduladores alostéricos

El cribado virtual, basado en la estructura de la diana, de los compuestos de la quimioteca del grupo (quimioteca MBC⁵⁶) se llevó a cabo utilizando el programa de *docking* Glide⁷⁶, en el modo de precisión extra (modo XP). Los estudios de *docking* para el cribado, se realizaron centrado la malla sobre los *Sitios* 2 y 3 en la estructura de 4ey4, que ya había sido previamente preparada. Para ello se seleccionaron todos los residuos del bolsillo y se tomó el centroide como el punto medio para la malla. Se volvió a seleccionar esta estructura debido a que se encuentra resuelta en su forma *apo* con buena resolución y validación.

Los 1830 compuestos de la quimioteca MBC se prepararon utilizando el módulo LigPrep de Maestro, ionizando los ligandos a pH=7.2±0.2. Las poses resultantes del *docking* fueron filtradas, seleccionando únicamente los compuestos que fueran capaces de interactuar mediante enlace de hidrógeno con los residuos críticos identificados mediante FHM. Más en detalle, para el *docking* centrado en el sitio 2, primero se realizó una clasificación de los ligandos por su puntuación GlideXP, obteniéndose valores que oscilaban entre -8.9 kcal/mol y 4.4 kcal/mol. En este protocolo, se incluyó el ácido rosmarínico como ligando control, clasificada su mejor pose con una puntuación de -8.5 kcal/mol. Como residuos clave para la interacción y posterior filtrado se seleccionaron His404, Glu414 y Trp532. En el caso del sitio 3, al no haber ningún compuesto descrito que se una a este bolsillo, no se usaron ligandos control. Los resultados de puntuación del *docking* se encontraron entre -7.7 kcal·mol⁻¹ hasta 1.8 kcal·mol⁻¹, aplicándose como residuos clave para la interacción Glu81, Glu452 y Arg463. Se seleccionaron para su evaluación biológica y estudios posteriores los ligandos capaces de interactuar con estos residuos, con mejor valor de puntuación GlideXP, y que encajasen mejor en el mapa FHM.

5.5 Ensayos biológicos

La actividad biológica de los compuestos seleccionados en el cribado virtual fue realizada por la Dra. Concepción Pérez. El método utilizado fue adaptado a partir del descrito por Ellman et al.⁵⁷. La solución de ensayo consistió en tampón de fosfato 0,1 M pH=8, ácido 5,5'-ditiobis (ácido-2-nitrobenzoico) 400 mM (DTNB, reactivo de Ellman), *hAChE* (0,05 unidades/ml, Sigma Chemical Co., acetilcolinesterasa humana recombinante) y yoduro de acetiltiocolina (800 mM) como sustrato de la reacción enzimática. Los compuestos ensayados se añadieron a la solución de ensayo y los cambios de absorbancia a 412 nm se registraron durante 5 minutos con un espectrofotómetro UV/Vis. Se compararon las velocidades de reacción, y se calculó el porcentaje de inhibición. La IC_{50} se define como la concentración de cada compuesto que reduce la actividad enzimática en un 50% con respecto a la que no tiene inhibidores. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.6 Dinámica molecular

Los estudios de dinámica molecular (MD) fueron llevados a cabo en una estación de trabajo Asus 1151 h170 LVX-GTX-980Ti, con procesador Intel Core i7-6500 K (12 M Cache, 3.40 GHz) y 16 GB DDR4 2133 MHz RAM. Esta estación de trabajo tiene disponible una tarjeta gráfica Nvidia GeForce GTX 980Ti para cálculos en GPU. Los estudios de MD se realizaron utilizando el programa AMBER14 con el código implementado para el cálculo en GPU⁶⁷ y el campo de fuerzas para proteínas ff14SB⁶⁸ con la finalidad de observar la estabilidad de los ligandos en sus bolsillos de unión y realizar una hipótesis de su mecanismo de acción. Además, se realizó una simulación de dinámica molecular de AChE en estado *apo*, para observar el comportamiento normal de la diana sin ligandos y compararlo con las trayectorias en complejo con ligando.

Se optimizó la geometría de los diferentes ligandos utilizando el programa Gaussian09⁶⁹, usando el método HF6-31++(d,p) y calculándose así las cargas RESP. Los sistemas fueron solvatados utilizando el modelo TIP3P⁷⁰, en una caja cúbica, neutralizando el sistema mediante la adición de átomos de Na⁺. Estos sistemas solvatados se optimizaron en 3 etapas de 8000 pasos, de los cuales los primeros 4500 se realizaron siguiendo el método *steep descent* y los 3500 finales utilizando gradiente conjugado. La primera etapa minimizó los átomos de hidrógeno, la segunda etapa, las moléculas de agua e iones y la tercera etapa, el sistema al completo sin restricciones. El sistema se equilibró posteriormente a una temperatura de 300K y presión de 1 bar, aplicando una restricción a proteína y ligando de 15 kcal·mol⁻¹·Å. Estas restricciones fueron reduciéndose progresivamente hasta su desaparición. Por último, se llevaron a cabo la producción de trayectorias de 25 ns de tiempo. Se utilizó un corte de 10 Å

para las interacciones de Lennard-Jones y se activó el algoritmo SHAKE⁷¹. Para regular la presión y temperatura del sistema se usaron el baróstato de Berendsen⁷² y termostato de Langevin respectivamente. Las trayectorias fueron analizadas utilizando el módulo Cpptraj⁷³, para su visualización el programa VMD⁷⁴ y para la producción de las gráficas el programa Xmgrace⁷⁵.

Se guardaron uno de cada cinco *frames* o fotogramas de las trayectorias en nuevas trayectorias en formato PDB para ser posteriormente analizadas mediante el programa TRAPP⁵⁹, un programa que permite la simulación, análisis y visualización de las dinámicas de las cavidades de una proteína para la detección de sub-bolsillos transitorios. De este modo se analizó la variación de la garganta catalítica a lo largo de las diferentes trayectorias de dinámica molecular.

6. REFERENCIAS

1. Hippus, H.; Neundorfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* **2003**, *5*, 101-8.
2. Ramirez-Bermudez, J. Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Arch Med Res* **2012**, *43*, 595-9.
3. <https://www.alz.co.uk/research/worldalzheimerreport2016sheet.> (09.01.2017).
4. Kuca, K.; Soukup, O.; Maresova, P.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Klimova, B.; Honegr, J.; Ramalho, T. C.; Franca, T. C. C. Current approaches against Alzheimer's disease in clinical trials. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 641e649.
5. Ferreira, S. T.; Vieira, M. N.; De Felice, F. G. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* **2007**, *59*, 332-45.
6. Kennedy, M. E.; Stamford, A. W.; Chen, X.; Cox, K.; Cumming, J. N.; Dockendorf, M. F.; Egan, M.; Ereshefsky, L.; Hodgson, R. A.; Hyde, L. A.; Jhee, S.; Kleijn, H. J.; Kuvelkar, R.; Li, W.; Mattson, B. A.; Mei, H.; Palcza, J.; Scott, J. D.; Tanen, M.; Troyer, M. D.; Tseng, J. L.; Stone, J. A.; Parker, E. M.; Forman, M. S. The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS beta-amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Sci Transl Med* **2016**, *8*, 363ra150.
7. Budni, J.; Garcez, M. L.; de Medeiros, J.; Cassaro, E.; Bellettini-Santos, T.; Mina, F.; Quevedo, J. The Anti-Inflammatory Role of Minocycline in Alzheimer s Disease. *Curr Alzheimer Res* **2016**, *13*, 1319-1329.
8. Seripa, D.; Solfrizzi, V.; Imbimbo, B. P.; Daniele, A.; Santamato, A.; Lozupone, M.; Zuliani, G.; Greco, A.; Logroscino, G.; Panza, F. Tau-directed approaches for the treatment of Alzheimer's disease: focus on leuco-methylthioninium. *Expert Rev Neurother* **2016**, *16*, 259-77.
9. Panza, F.; Seripa, D.; Solfrizzi, V.; Imbimbo, B. P.; Lozupone, M.; Leo, A.; Sardone, R.; Gagliardi, G.; Lofano, L.; Creanza, B. C.; Bisceglia, P.; Daniele, A.; Bellomo, A.; Greco, A.; Logroscino, G. Emerging drugs to reduce abnormal beta-amyloid protein in Alzheimer's disease patients. *Expert Opin Emerg Drugs* **2016**, *21*, 377-391.
10. Grossberg, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease:: getting on and staying on. *Curr Ther Res Clin Exp* **2003**, *64*, 216-35.
11. Bautista-Aguilera, O. M.; Hagenow, S.; Palomino-Antolin, A.; Farre-Alins, V.; Ismaili, L.; Joffrin, P. L.; Jimeno, M. L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Kalinowsky, L.; Proschak, E.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Schwed, J. S.; Romero Martinez, A.; Lopez-Munoz, F.; Chioua, M.; Egea, J.; Ramsay, R. R.; Marco-Contelles, J.; Stark, H. Multitarget-Directed Ligands Combining Cholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibition with Histamine H3 R Antagonism for Neurodegenerative Diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, *56*, 12765-12769.
12. Fang, Z.; Grutter, C.; Rauh, D. Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 58-70.
13. Melancon, B. J.; Hopkins, C. R.; Wood, M. R.; Emmitte, K. A.; Niswender, C. M.; Christopoulos, A.; Conn, P. J.; Lindsley, C. W. Allosteric modulation of seven transmembrane spanning receptors: theory, practice, and opportunities for central nervous system drug discovery. *J Med Chem* **2012**, *55*, 1445-64.
14. Monod, J.; Changeux, J. P.; Jacob, F. Allosteric Proteins and Cellular Control Systems. *J. Mol. Biol.* **1963**, *6*, 306-329.
15. Gunasekaran, K.; Ma, B.; Nussinov, R. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins* **2004**, *57*, 433-43.
16. Wenthur, C. J.; Gentry, P. R.; Mathews, T. P.; Lindsley, C. W. Drugs for allosteric sites on receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2014**, *54*, 165-84.
17. Nussinov, R.; Tsai, C. J. Allostery in disease and in drug discovery. *Cell* **2013**, *153*, 293-305.
18. Nemeth, E. F.; Heaton, W. H.; Miller, M.; Fox, J.; Balandrin, M. F.; Van Wagenen, B. C.; Colloton, M.; Karbon, W.; Scherrer, J.; Shatzen, E.; Rishton, G.; Scully, S.; Qi, M.; Harris, R.; Lacey, D.; Martin, D. Pharmacodynamics of the type II calcimimetic compound cinacalcet HCl. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, *308*, 627-35.
19. Meanwell, N. A.; Kadow, J. F. Maraviroc, a chemokine CCR5 receptor antagonist for the treatment of HIV infection and AIDS. *Curr Opin Investig Drugs* **2007**, *8*, 669-81.
20. Bradley, S. J.; Bourgognon, J. M.; Sanger, H. E.; Verity, N.; Mogg, A. J.; White, D. J.; Butcher, A. J.; Moreno, J. A.; Molloy, C.; Macedo-Hatch, T.; Edwards, J. M.; Wess, J.; Pawlak, R.; Read, D. J.; Sexton, P. M.; Broad, L. M.; Steinert, J. R.; Mallucci, G. R.; Christopoulos, A.; Felder, C. C.; Tobin, A.

- B. M1 muscarinic allosteric modulators slow prion neurodegeneration and restore memory loss. *J Clin Invest* **2017**, 127, 487-499.
21. Nachmansohn, D.; Wilson, I. B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **1951**, 12, 259-339.
 22. Rosenberry, T. L. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1975**, 43, 103-218.
 23. Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 5128-32.
 24. Sanson, B.; Colletier, J. P.; Xu, Y.; Lang, P. T.; Jiang, H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Weik, M. Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Protein Sci* **2011**, 20, 1114-8.
 25. Xu, Y.; Cheng, S.; Sussman, J. L.; Silman, I.; Jiang, H. Computational Studies on Acetylcholinesterases. *Molecules* **2017**, 22.
 26. Bennion, B. J.; Essiz, S. G.; Lau, E. Y.; Fattbert, J. L.; Emigh, A.; Lightstone, F. C. A wrench in the works of human acetylcholinesterase: soman induced conformational changes revealed by molecular dynamics simulations. *PLoS One* **2015**, 10, e0121092.
 27. Colletier, J. P.; Royant, A.; Specht, A.; Sanson, B.; Nachon, F.; Masson, P.; Zaccai, G.; Sussman, J. L.; Goeldner, M.; Silman, I.; Bourgeois, D.; Weik, M. Use of a 'caged' analogue to study the traffic of choline within acetylcholinesterase by kinetic crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2007**, 63, 1115-28.
 28. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolov, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, 253, 872-9.
 29. Radic, Z.; Reiner, E.; Taylor, P. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol* **1991**, 39, 98-104.
 30. Giacobini, E. New trends in cholinergic therapy for Alzheimer disease: nicotinic agonists or cholinesterase inhibitors? *Prog Brain Res* **1996**, 109, 311-23.
 31. Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem* **2012**, 55, 10282-6.
 32. Bar-On, P.; Millard, C. B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J. L.; Silman, I. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochemistry* **2002**, 41, 3555-3564.
 33. Jeffery, C. J. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet* **2003**, 19, 415-7.
 34. Nijholt, I.; Farchi, N.; Kye, M.; Sklan, E. H.; Shoham, S.; Verbeure, B.; Owen, D.; Hochner, B.; Spiess, J.; Soreq, H.; Blank, T. Stress-induced alternative splicing of acetylcholinesterase results in enhanced fear memory and long-term potentiation. *Mol Psychiatry* **2004**, 9, 174-83.
 35. Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **2005**, 5, 293-302.
 36. Halliday, A. C.; Greenfield, S. A. From protein to peptides: a spectrum of non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase. *Protein Pept Lett* **2012**, 19, 165-72.
 37. Zeev-Ben-Mordehai, T.; Rydberg, E. H.; Solomon, A.; Toker, L.; Auld, V. J.; Silman, I.; Botti, S.; Sussman, J. L. The intracellular domain of the *Drosophila* cholinesterase-like neural adhesion protein, gliotactin, is natively unfolded. *Proteins* **2003**, 53, 758-67.
 38. Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* **2001**, 2, 294-302.
 39. Castro, A.; Martinez, A. Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem* **2001**, 1, 267-72.
 40. Perez, D. I.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. From Bitopic Inhibitors to Multitarget Drugs for the Future Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Med Chem* **2015**, 22, 3789-806.
 41. Munoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; Garcia-Palomero, E.; Dorronsoro, I.; del Monte-Millan, M.; Valenzuela, R.; Usan, P.; de Austria, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Medina, M.; Martinez, A. Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J Med Chem* **2005**, 48, 7223-33.
 42. Castro, A.; Martinez, A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Pharm Des* **2006**, 12, 4377-87.
 43. Chierrito, T. P. C.; Pedersoli-Mantoani, S.; Roca, C.; Requena, C.; Sebastian-Perez, V.; Castillo, W. O.; Moreira, N. C. S.; Perez, C.; Sakamoto-Hojo, E. T.; Takahashi, C. S.; Jimenez-Barbero, J.;

- Canada, F. J.; Campillo, N. E.; Martinez, A.; Carvalho, I. From dual binding site acetylcholinesterase inhibitors to allosteric modulators: A new avenue for disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* **2017**, 139, 773-791.
44. Marcelo, F.; Dias, C.; Martins, A.; Madeira, P. J.; Jorge, T.; Florencio, M. H.; Canada, F. J.; Cabrita, E. J.; Jimenez-Barbero, J.; Rauter, A. P. Molecular recognition of rosmarinic acid from *Salvia sclareoides* extracts by acetylcholinesterase: a new binding site detected by NMR spectroscopy. *Chemistry* **2013**, 19, 6641-9.
45. Wilson, I. B.; Harrison, M. A. Turnover number of acetyl-cholinesterase. *J Biol Chem* **1961**, 236, 2292-5.
46. Fang, L.; Pan, Y.; Muzyka, J. L.; Zhan, C. G. Active site gating and substrate specificity of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: insights from molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B* **2011**, 115, 8797-805.
47. Broomhead, N. K.; Soliman, M. E. Can We Rely on Computational Predictions To Correctly Identify Ligand Binding Sites on Novel Protein Drug Targets? Assessment of Binding Site Prediction Methods and a Protocol for Validation of Predicted Binding Sites. *Cell Biochem Biophys* **2017**, 75, 15-23.
48. Seco, J.; Luque, F. J.; Barril, X. Binding site detection and druggability index from first principles. *J Med Chem* **2009**, 52, 2363-71.
49. Schmidtke, P.; Le Guilloux, V.; Maupetit, J.; Tuffery, P. fpocket: online tools for protein ensemble pocket detection and tracking. *Nucleic Acids Res* **2010**, 38, W582-9.
50. Radoux, C. J.; Olsson, T. S.; Pitt, W. R.; Groom, C. R.; Blundell, T. L. Identifying Interactions that Determine Fragment Binding at Protein Hotspots. *J Med Chem* **2016**, 59, 4314-25.
51. Alisaraie, L.; Fels, G. Molecular docking study on the "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase. *J Mol Model* **2006**, 12, 348-54.
52. Franklin, M. C.; Rudolph, M. J.; Ginter, C.; Cassidy, M. S.; Cheung, J. Structures of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase reveal perturbations of the acyl loop and the dimer interface. *Proteins* **2016**, 84, 1246-56.
53. Borrelli, K. W.; Vitalis, A.; Alcantara, R.; Guallar, V. PELE: Protein Energy Landscape Exploration. A Novel Monte Carlo Based Technique. *J Chem Theory Comput* **2005**, 1, 1304-11.
54. Lopes, F. M.; Schroder, R.; da Frota, M. L., Jr.; Zanotto-Filho, A.; Muller, C. B.; Pires, A. S.; Meurer, R. T.; Colpo, G. D.; Gelain, D. P.; Kapczinski, F.; Moreira, J. C.; Fernandes Mda, C.; Klamt, F. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res* **2010**, 1337, 85-94.
55. Lopes, F. M.; da Motta, L. L.; De Bastiani, M. A.; Pfaffenseller, B.; Aguiar, B. W.; de Souza, L. F.; Zanatta, G.; Vargas, D. M.; Schonhofen, P.; Londero, G. F.; de Medeiros, L. M.; Freire, V. N.; Dafre, A. L.; Castro, M. A.; Parsons, R. B.; Klamt, F. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res* **2017**, 31, 545-559.
56. Sebastian-Perez, V.; Roca, C.; Awale, M.; Reymond, J. L.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. Medicinal and Biological Chemistry (MBC) Library: An Efficient Source of New Hits. *J Chem Inf Model* **2017**, 57, 2143-2151.
57. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **1961**, 7, 88-95.
58. Gonzalez-Naranjo, P.; Campillo, N. E.; Perez, C.; Paez, J. A. Multitarget cannabinoids as novel strategy for Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* **2013**, 10, 229-39.
59. Stank, A.; Kokh, D. B.; Horn, M.; Sizikova, E.; Neil, R.; Panecka, J.; Richter, S.; Wade, R. C. TRAPP webserver: predicting protein binding site flexibility and detecting transient binding pockets. *Nucleic Acids Res* **2017**.
60. Laskowski, R. A.; Gerick, F.; Thornton, J. M. The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Lett* **2009**, 583, 1692-8.
61. Tsai, C. J.; del Sol, A.; Nussinov, R. Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play. *J Mol Biol* **2008**, 378, 1-11.
62. Le Guilloux, V.; Schmidtke, P.; Tuffery, P. Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics* **2009**, 10, 168.
63. Schrödinger Release 2015-4: Schrödinger Suite 2015-4 Protein Preparation Wizard; Epik S, L., New York, NY, 2015; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
64. Schrödinger Release 2015-4: Maestro S, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
65. The PyMOL Molecular Graphics System, V. S., LLC.

66. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **2009**, *30*, 2785-91.
67. Gotz, A. W.; Williamson, M. J.; Xu, D.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R. C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *J Chem Theory Comput* **2012**, *8*, 1542-1555.
68. Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* **2015**, *11*, 3696-713.
69. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J., J. A. ; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Tossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision A.02. *Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016*.
70. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.
71. Lippert, R. A.; Bowers, K. J.; Dror, R. O.; Eastwood, M. P.; Gregersen, B. A.; Klepeis, J. L.; Kolossvary, I.; Shaw, D. E. A common, avoidable source of error in molecular dynamics integrators. *J Chem Phys* **2007**, *126*, 046101.
72. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684.
73. Roe, D. R.; Cheatham, T. E., 3rd. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 3084-95.
74. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**, *14*, 33-8, 27-8.
75. XMGRACE, V. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR.: 2005.
76. Schrödinger Release 2017-1: Glide, S., LLC, New York, NY, 2017. *Glide, Schrödinger, 2017*.

CAPÍTULO 2

INHIBIDORES DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA PARA EL SÍNDROME DE FRÁGIL-X

*“El verdadero signo de la
inteligencia no es el
conocimiento
sino la imaginación”
Albert Einstein*

CAPITULO 2. INHIBIDORES DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA PARA EL SÍNDROME DE FRAGIL-X

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome de frágil-X (SFX) es una enfermedad causada por la ausencia o deficiencia de la proteína de retraso mental frágil X 1 (también conocida como regulador funcional sináptico 1, FMR1), una proteína de unión a ácido ribonucleico (ARN) con una función principal en la regulación de un gran número de ARN mensajeros (mARN) en neuronas post-sinápticas. La deficiencia de la proteína FMR1 viene causada por la expansión de la repetición del trinucleótido CGG en la región promotora de *FMR1*, localizada en el gen 27q3 del cromosoma X. Esta expansión de la repetición conlleva la metilación, el silenciamiento transcripcional y la ausencia o deficiencia de la proteína FMR1 (**Figura 2.1**)¹. El síndrome de frágil-X (SFX) se considera la causa más común de discapacidad intelectual y autismo. Esta enfermedad genética hereditaria, afecta a 1 de cada 5000-7000 hombres y a 1 de cada 4000-6000 mujeres en todo el mundo². Los pacientes con SFX a menudo muestran problemas en el desarrollo neurológico, tales como déficit de atención, trastorno de hiperactividad y comportamiento autista. No existe cura para esta patología, siendo actualmente su tratamiento sintomático en cada paciente.

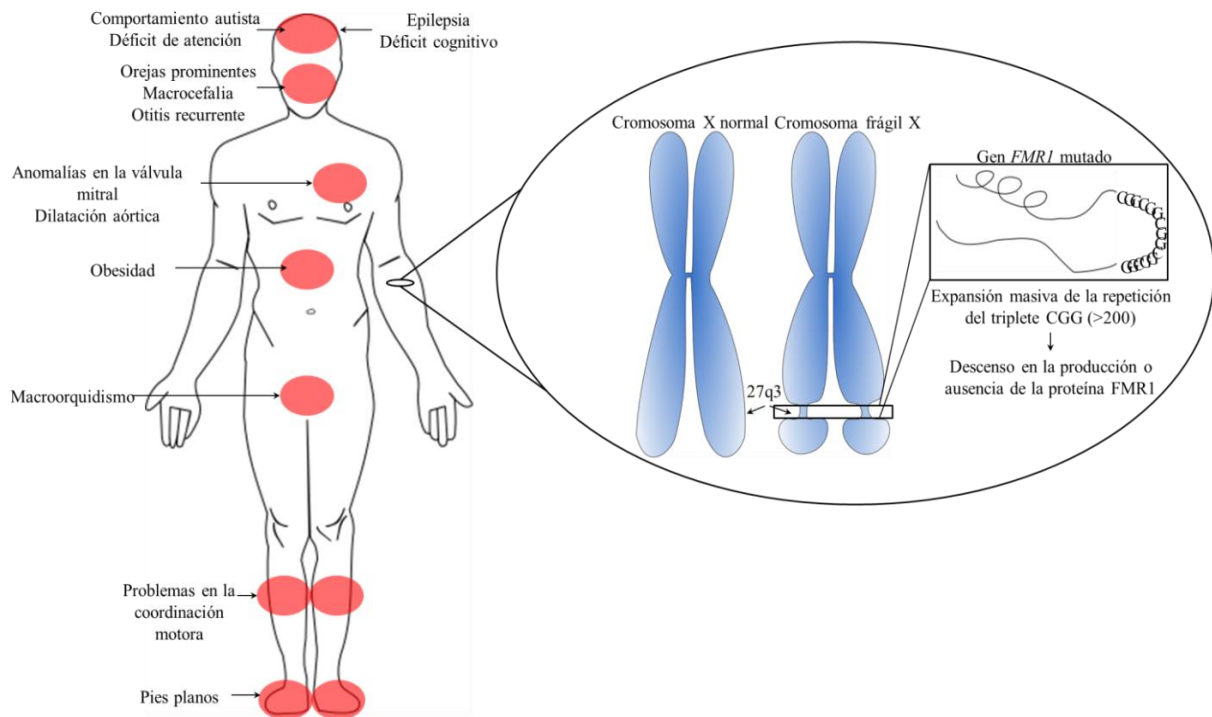


Figura 2.1. Esquema de las características clínicas del síndrome de frágil-X. Ampliado a la derecha se observa un esquema ejemplo un cromosoma X normal frente a un cromosoma con las mutaciones en el gen *FMR1* que provocan el síndrome de frágil-X.

Las características clínicas del SFX varían dependiendo del número de repeticiones del trinucleótido CGG, grado de metilación, el sexo, la variación del tejido y la cantidad de proteína FMR producida en cada individuo. Los varones con gran número de repeticiones tienen una producción de la proteína FMR baja o ausente, cursando con déficit cognitivo general y deficiente funcionalidad física. En las mujeres con gran número de repeticiones, el grado varía ampliamente. Las características clínicas de varones con SFX están asociadas a la edad. En la primera infancia las apariencias físicas son sutiles y pueden hacerse más evidentes con el avance de los años, por lo que niños con retraso en su desarrollo y características físicas como macrocefalia, cara larga y estrecha con frente y barbillas prominentes, orejas prominentes y macroorquidismo deben ser diagnosticados (**Figura 2.1**)³. Además en una edad temprana pueden aparecer problemas relacionados con el tejido conectivo como hiperflexibilidad articular, piel suave y elástica, prolapso de la válvula mitral y pies planos. Hasta la segunda década de vida no se desarrolla el fenotipo adulto de la enfermedad. El nivel cognitivo en varones con SFX varía, desde el funcionamiento límite-normal con dificultades en el aprendizaje, a discapacidad intelectual severa, estando correlacionado con la cantidad de proteína FMR producida en cada individuo. Por otra parte, la patología más común en las personas con SFX es un espectro de trastorno autista. Además, las personas con SFX tienen una frecuencia más alta (hasta un 20% más) de convulsiones epilépticas que la población general principalmente durante la infancia.

Actualmente no existe una cura para el SFX, siendo ésta una enfermedad huérfana, aunque hay varias áreas para el tratamiento e intervención farmacológica que puedan mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren SFX y sus familiares. Generalmente, el tratamiento farmacológico es individualizado y depende de la sintomatología de cada enfermo. Los tratamientos farmacológicos van encaminados al control de la ansiedad, trastorno de hiperactividad, cambios en el estado de ánimo, problemas en la adaptación social, irritabilidad y epilepsia entre otros. Algunos de los fármacos utilizados para ello son el metilfenidato (trastorno del déficit de atención e hiperactividad), clonidina (control de los problemas de sueño), inhibidores de la recaptación de la serotonina como sertalina (ansiedad y cambios de estado de ánimo), risperidona (irritabilidad, agresividad), carbamazepina y ácido valproico (epilepsia).

Aunque los tratamientos farmacológicos existentes implican una gran variedad de posibilidades en el tratamiento de la sintomatología clínica de los pacientes de SFX, es necesario el desarrollo de fármacos específicos para la fisiopatología de esta enfermedad, con la finalidad de obtener una terapia que reduzca no solo los síntomas más graves, sino que normalice tanto el estado físico como cognitivo de los pacientes. Una característica clave del SFX, común a todos los trastornos del comportamiento, es una desviación en el equilibrio sináptico normal. En los últimos años, la comunidad científica ha estudiado la disfunción sináptica presente en el SFX, que muestra una densidad de sinapsis anormalmente alta y una morfología aberrante. Por tanto, la regulación de la función sináptica puede ser una buena aproximación terapéutica para desarrollar un tratamiento farmacológico eficiente en esta enfermedad. Entre las líneas de investigación desarrolladas para ello destacan la modulación del receptor metabotrópico de glutamato mGluR5, la modulación de la señalización del receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA), los inhibidores de proteínas quinasas o los moduladores de canales iónicos entre otros⁴.

Los receptores metabotrópicos de glutamato son piezas claves en la neurotransmisión excitatoria e importantes reguladores de la plasticidad sináptica, implicados en la fisiopatología del neurodesarrollo en SFX⁵. Uno de los marcadores neuropatológicos más característicos del SFX es la morfología neuronal anormal, con largas y finas espinas dendríticas en las neuronas piramidales. Este fenotipo se ha atribuido a la superexpresión de los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR5, proponiendo estos receptores como posibles dianas o blancos terapéuticos como estrategia farmacológica⁶. Aun así, fármacos desarrollados para la modulación de esta diana han llegado a fase clínica 3, sin éxito.

El sistema GABA, formado por el neurotransmisor GABA y sus receptores GABA_A y GABA_B, tiene un papel importante también en este síndrome. El ácido γ -aminobutírico es el

neurotransmisor inhibitorio primario en el cerebro humano adulto, y su correcta regulación es esencial para el aprendizaje, la memoria, el estado de ánimo y el sueño. Dicho neurotransmisor actúa en dos clases de receptores de membrana, receptores ionotrópicos GABA_A (canales iónicos de cloro), y receptores metabotrópicos GABA_B. Aunque el GABA es un neurotransmisor inhibitorio en el cerebro humano, se piensa que actúa como un neurotransmisor excitatorio durante el desarrollo neuronal y también en adultos bajo ciertas condiciones patológicas. El equilibrio excitatorio-inhibitorio de GABA en el cerebro puede ser una de las causas centrales del SFX y ha motivado el desarrollo de varias terapias hasta fases clínicas⁷ (**Tabla 2.1**).

Por otro lado, estudios recientes han demostrado funciones muy variadas para la proteína FMR, que incluyen no solo el neurodesarrollo anormal, sino problemas como disfunción presináptica, neurogénesis adulta anormal y desregulación de diferentes proteínas quinasas como la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3)⁸, fosfoinositol-3 quinasa (PI3K)⁹ y quinasa regulada por señal extracelular (ERK)¹⁰, emergiendo como nuevas dianas terapéuticas. Algunas de las moléculas en desarrollo preclínico y clínico para las dianas mencionadas anteriormente se encuentran recogidas en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Resumen de algunos de los compuestos en desarrollo preclínico y clínico para el tratamiento de SFX.

Mecanismo o cascada de señalización diana	Fase de desarrollo	
	Preclínico	Clínico
Inhibición del receptor mGluR5	NPEP	AFQ056 (Fase 2) Fenobam (Fase 1) STX107 (Fase 1)
Bloqueo del exceso de actividad de la proteína producida en ausencia de la proteína FMR	Inhibidores de PDE	Rolipram (Fase 3) Minocilina (Fase 2)
Reducción o balanceo de la actividad mGluR5 a través de GABA	Baclofeno Ganaxona	Arbaclofeno (Fase 3) Acamprosato (Fase 2) Donepezilo (Fase 2)
Inhibición de la ruta de señalización de mGluR5	Inhibidores de GSK3 Inhibidores de PI3K	Litio Lovastatina (Fase 2) Metadoxina (Fase 2)

Por otro lado, también se han descrito diferentes funciones de la proteína FMR en los mecanismos de señalización intracelular de Ca²⁺. El Ca²⁺ regula gran variedad de procesos de transducción de señales neuronales en el cerebro y la retina. Los efectos de los cambios en el

Ca²⁺ neuronal están mediados principalmente por una clase de proteínas sensores de calcio neuronal (NCS) que pertenecen a la superfamilia *EF-hand*¹¹. Esta familia de proteínas también está formada por otros sensores como Calmodulina, Recoverina y KChIP¹². Los sensores de calcio neuronales son proteínas cuya función principal es la unión de Ca²⁺ y se expresan predominantemente en el sistema nervioso, donde se encargan de la regulación de la función neuronal. Se ha podido observar que la familia de proteínas de NCS están implicadas en una amplia gama de eventos de señalización de Ca²⁺ en neuronas y fotorreceptores¹². Estos procesos de señalización van desde funciones simples en la retina a funciones de mayor alcance en la liberación de neurotransmisores, regulación de canales y receptores, control de la transcripción génica, crecimiento neuronal y supervivencia.

Utilizando *Drosophila* como modelo, se ha demostrado que *dNCS-1* está implicada en la regulación de canales iónicos y receptores postsinápticos, con efectos sobre el crecimiento de neuritas y la transmisión sináptica. También se ha demostrado que *dNCS-1* se encuentra involucrada en patologías que resultan de un número anormal de sinapsis y de modificaciones en la probabilidad de liberación de neurotransmisor por sinapsis¹¹. NCS-1, en humanos, es una proteína de 21 kDa de masa molecular formada por una cadena de 190 residuos, con 10 regiones en forma de α -hélice, 8 β -láminas y cuatro dominios *EF-hand* cuya función es la unión de Ca²⁺. De los cuatro sitios *EF-hand*, únicamente tres de ellos han sido descritos como capaces de unir Ca²⁺ (sitios EF-2, EF-3 y EF-4) (**Figura 2.2A**).

Recientemente se ha publicado que NCS-1 es un regulador negativo de la proteína del factor de intercambio de guanina Ric8a mediante una interacción proteína-proteína¹³. Ric8a, mediante la activación de los complejos de proteína G, es responsable tanto de la regulación del número de sinapsis como de la liberación de neurotransmisor en éstas. La hipótesis más plausible es que Ric8a podría ser parte de un mecanismo de control de la liberación de neurotransmisores frente a la sinaptogénesis, lo que explicaría una regulación antagónica de *dNCS-1* y Ric8a. *dNCS-1* tiende a una mayor unión con Ric8a en ausencia de Ca²⁺, y cuando el Ca²⁺ se une a *dNCS-1* produce un cambio conformacional en la estructura de *dNCS-1* conduciendo a la liberación de Ric8a, y por lo tanto, activando la cascada de señalización para regular el número de sinapsis y la probabilidad de liberación de neurotransmisores¹³ (**Figura 2.2B**). Esta es nuestra hipótesis de trabajo.

La deficiencia en la expresión de proteína FMR en el SFX, causa una regulación anómala de la señalización entre NCS-1 y Ric8a. Ric8a presenta una mayor interacción con NCS-1 en la enfermedad que en sujetos sanos, produciendo así un desequilibrio en la señalización de proteínas G. La inhibición de la interacción proteína-proteína entre NCS-1 y Ric8a en la enfermedad podría modular esta señalización, normalizando la liberación de

neurotransmisor y el número de sinapsis. De este modo se estaría diseñando una terapia dirigida a la normalización del número de sinapsis en lugar del bloqueo de receptores de neurotransmisores¹⁴, co-regulando tanto la liberación de neurotransmisores en la sinapsis como el control del número de sinapsis.

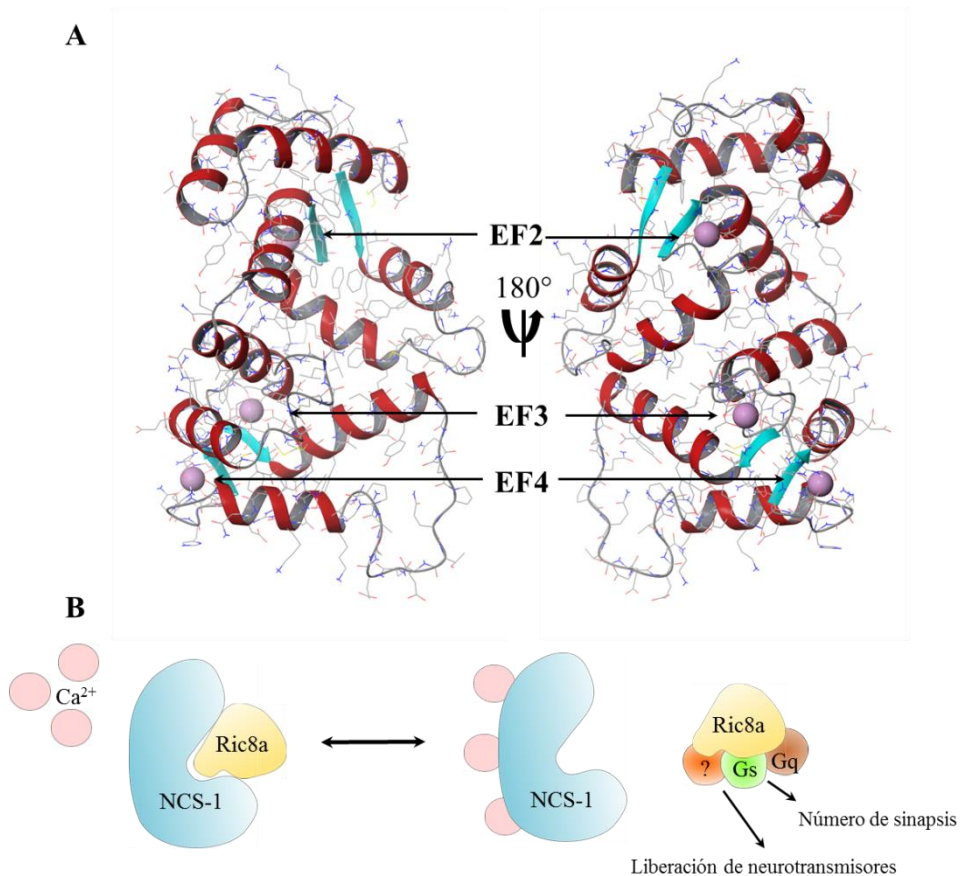


Figura 2.2. A) Vistas frontal y trasera de *dNCS-1*, en donde se muestran las α -hélices en rojo, β -láminas en azul, y se encuentran señalados los tres dominios *EF-hand* capaces de unir Ca^{2+} ; B) Esquema de la modulación de la interacción entre *NCS-1* y *Ric8a*. En ausencia de Ca^{2+} *Ric8a* se une a *NCS-1*, mientras que la unión de Ca^{2+} podría desplazar a *Ric8a*, que una vez libre activaría la señalización de algunas proteínas G¹³.

Las interacciones proteína-proteína (PPI) son fundamentales en múltiples procesos biológicos, a menudo desreguladas en enfermedades graves, tales como cáncer y enfermedades neurológicas. Actualmente, las PPI se consideran una nueva clase de dianas biológicas extremadamente difíciles de convertir en terapéuticas, debido a sus formas y tamaños variados y especiales. La resolución de estructuras en las décadas de 1980 y 1990 mostró interfaces de interacción proteína-proteína generalmente planas y largas (entre 1000-2000 Å²), en contraste con las cavidades cóncavas y profundas que típicamente unen pequeñas moléculas (300-500

Å²)¹⁵. En cualquier caso, el desarrollo de técnicas biofísicas y su uso integrador en conjunto con programas de química médica han llevado a inhibidores de PPI a su desarrollo clínico (como por ejemplo el antagonista de integrina, tirofiban), mostrando que algunas interacciones proteína-proteína pueden ser dinámicamente moduladas mediante la unión de moléculas tipo fármaco.

Hoy en día, las moléculas pequeñas están siendo desarrolladas como inhibidores de extensas superficies moleculares de PPIs, convirtiendo en una realidad actual, lo que hasta hace algo más de tres décadas era un sueño¹⁶.

1.1 Antecedentes del grupo de investigación

La información estructural disponible sobre el reconocimiento NCS-1/Ric8a¹³ y la función del complejo en el control del número de sinapsis¹³ llevó a la búsqueda de moléculas pequeñas que pudieran acoplarse a la interfaz de interacción de NCS-1/Ric8a para inhibir la formación del complejo. Teniendo en cuenta que previamente se había descrito que clorpromazina, una fenotiazina comercializada como antipsicótico, era capaz de unirse a NCS-1, se llevó a cabo un cribado virtual de compuestos similares a clorpromazina, identificando los compuestos **FD44** y **FD16** (**Figura 2.3**), dos fenotiazinas con un peso molecular menor de 500 Da, como moléculas capaces de unirse a Δ NCS-1 e inhibir su interacción con Ric8a, mediando la recuperación del número normal de sinapsis y mejorando el aprendizaje asociativo en un modelo de *Drosophila* frágil-X¹⁷.

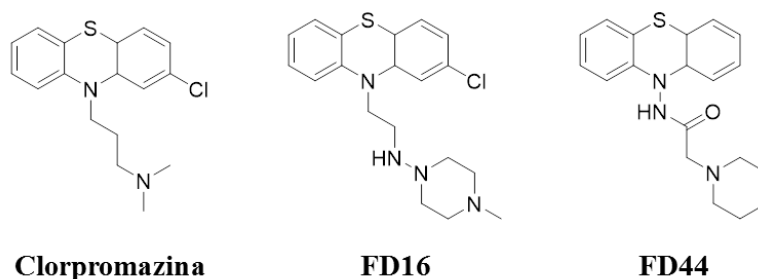


Figura 2.3. Estructura química de clorpromazina y de las dos nuevas fenotiazinas identificadas capaces de inhibir la interacción proteína-proteína entre NCS-1 y Ric8a, los compuestos **FD16** y **FD44**.

La resolución de la estructura del complejo Δ NCS-1/**FD44** por cristalografía de rayos-X demostró que **FD44** es un inhibidor alostérico que se une a la superficie de interacción de Ric8a con Δ NCS-1¹⁷. Esta superficie es una cavidad hidrofóbica grande, en donde la hélice c-terminal de NCS-1 (también llamada hélice H10) es capaz de introducirse en la cavidad, interaccionando con el ligando **FD44** y estabilizando el complejo. Al hacerlo, **FD44** impide la extrusión de esta hélice fuera de la cavidad, demostrando ser un factor esencial para el reconocimiento de Ric8a.

Capítulo 2 - Introducción

Los estudios de mutagénesis previos habían demostrado la importancia de la hélice H10 en el reconocimiento de Ric8a. Así, la eliminación de la hélice H10 inhibió la interacción entre dNCS-1 y Ric8a, mostrando que esta hélice es un factor clave en el reconocimiento entre ambas proteínas¹³.

2. OBJETIVOS

La inhibición de la interacción proteína-proteína entre NCS-1 y Ric8a mediante moléculas pequeñas como los compuestos **FD44**, **FD16** o clorpromazina ha demostrado ser una estrategia interesante para el tratamiento del SFX. La inhibición de la interacción mediante estas moléculas ha mostrado la capacidad de recuperar el número normal de sinapsis y mejorar el aprendizaje asociativo en modelos animales.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente en la introducción, el objetivo general de este capítulo es desarrollar inhibidores más eficientes de la interacción entre NCS1/Ric8a.

Los objetivos específicos de este capítulo son:

- Estudiar el comportamiento dinámico de NCS-1 y de la hélice H10 en el reconocimiento molecular.
- Estudiar el mecanismo de acción de los ligandos **FD44** y **FD16** mediante la aplicación de estudios en solución y estudios teóricos.
- Identificar nuevos inhibidores de la interacción NCS1/Ric8a más eficaces mediante cribado virtual.

3. RESULTADOS

3.1 Estudio del mecanismo de inhibición de la interacción proteína-proteína

3.1.1 Cambios conformacionales de NCS-1

El proceso de reconocimiento entre **FD44** y *d*NCS-1 y los elementos estructurales clave en la unión de la molécula pequeña a la gran superficie de interacción de *d*NCS-1 con Ric8a es fundamental para entender cómo moléculas pequeñas son capaces de romper la interacción proteína-proteína. Nuestro objetivo final es la identificación de nuevos inhibidores más eficaces y selectivos de esta interacción. El análisis de la interacción ligando-proteína se abordó estudiando de forma independiente ambos actores involucrados, *d*NCS-1 y **FD44**, así como su complejo. Se analizaron los cambios conformacionales que *d*NCS-1 sufría cuando se une el compuesto **FD44**. Como se ha descrito previamente, la hélice H10 de *d*NCS-1 (formada por los residuos Arg177 a Ser183) es un elemento móvil que regula la interacción con Ric8a, y la estabilización de esta hélice dentro de la cavidad hidrofóbica de *d*NCS-1 mediada por **FD44** es crítica para la inhibición de la interacción entre *d*NCS-1 y Ric8a^{13,17}. Se realizó una comparación de la forma *apo* de *d*NCS-1, en la que la hélice H10 se encuentra fuera de la cavidad hidrofóbica¹³, con el complejo de *d*NCS-1 unido a **FD44**¹⁷ (**Figura 2.4**).

Con respecto a *d*NCS-1, la orientación hacia el solvente de la hélice H10 en la estructura *apo* se encuentra respaldada por una red de interacciones con el dominio EF4, en la que los residuos cargados, contactan a través de enlace de hidrógeno e interacciones iónicas (**Figura 2.4**). El residuo implicado por parte de la hélice H10 es Arg177 mientras que por parte del dominio EF4 son los residuos de Glu166, Lys157, Glu170. El análisis estructural comparativo sugiere que un movimiento del residuo de Lys157, ubicado en el sitio de unión de Ca²⁺ EF4, sería suficiente para forzar una reorientación del resto de residuos, lo que a su vez daría libertad a la hélice H10 para moverse y reubicarse dentro de la grieta hidrofóbica. La reubicación de la hélice H10 permite la formación de una nueva interacción de enlace de hidrógeno intramolecular entre Met178 y Tyr108 que fija la hélice dentro de la cavidad hidrofóbica.

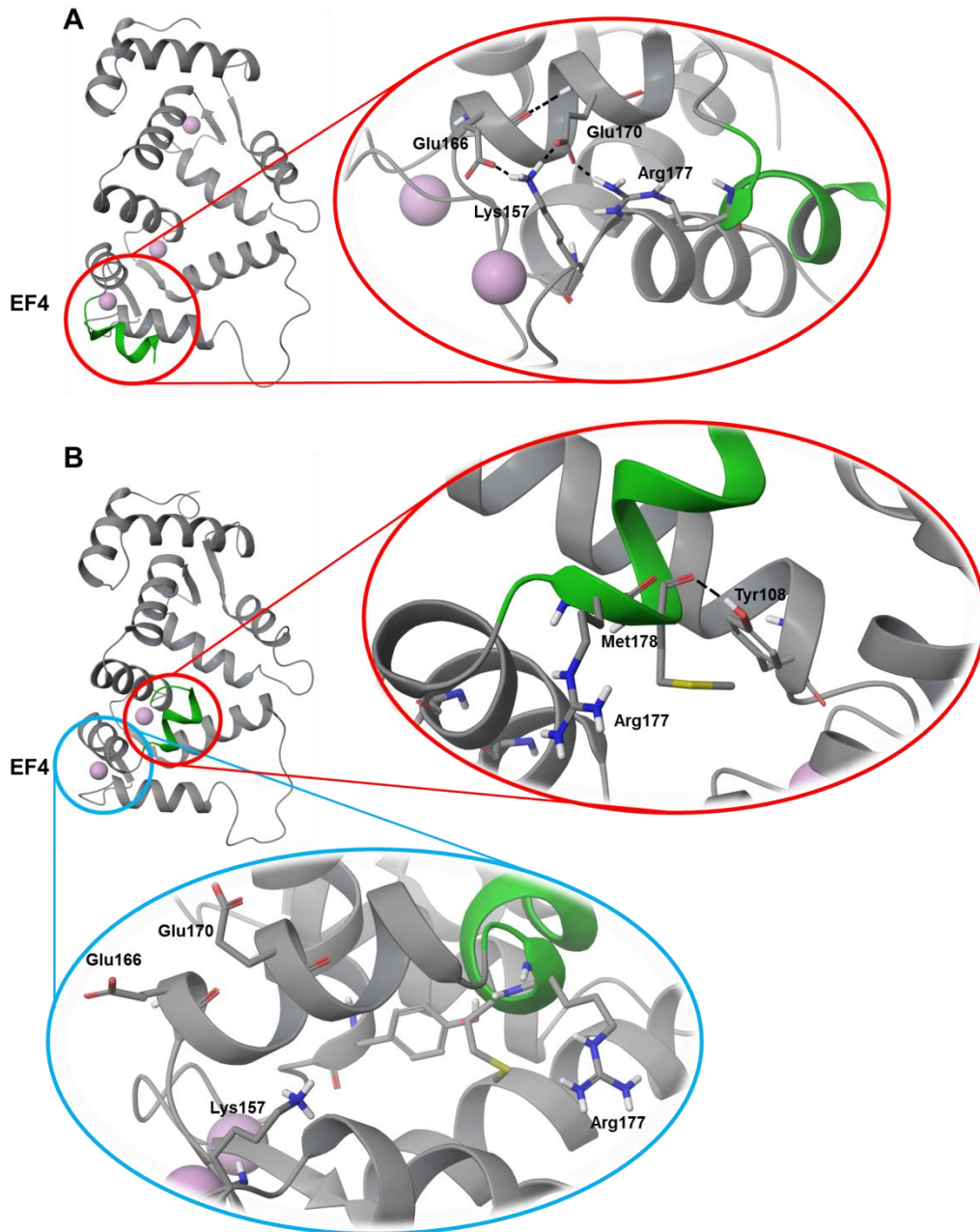


Figura 2.4. Comparativa estructural entre las estructuras: A) *dNCS-1* en estado *apo* (PDB ID 4by4) y B) *dNCS-1* en complejo con **FD44** (PDB ID 5aan). Se muestran ampliados los residuos que fijan la hélice H10 en ambas estructuras. La región c-terminal y la hélice H10 se muestran coloreados en verde. La ubicación del sitio de unión de Ca^{2+} *EF-hand* 4 (EF4) está indicada a la izquierda.

Para estudiar el movimiento, funcionalmente relevante y dinámico, de la hélice H10, inicialmente se realizaron una serie de dinámicas moleculares convencionales de un tiempo de 100 ns. En estos estudios no se logró observar el movimiento de la hélice H10 debido a que la búsqueda conformacional a lo largo del tiempo estudiado fue insuficiente. Debido a ello se planteó un estudio de dinámica molecular acelerada utilizando dinámica molecular escalada realizando simulaciones de un tiempo de 100 ns (SMD¹⁸) en la estructura de *dNCS-1* y ausencia de ligando. Las SMDs son experimentos en los que la energía potencial superficial de la

proteína se disminuye relativamente aplicando el factor λ , lo que mantiene el perfil energético de la proteína pero reduce los valores absolutos. Así, se favorece una búsqueda conformacional mayor en un tiempo de cálculo menor. Según la bibliografía, un valor de λ entre 1-0.5 es apropiado para valorar el movimiento de proteínas, mientras que valores inferiores de λ (0.4-0) pueden disminuir excesivamente el perfil de los valles energéticos, promoviendo la aparición de conformaciones energéticamente poco favorables. Por ello se decidió realizar el cálculo de cuatro trayectorias independientes, con valores de λ decrecientes: 0.9, 0.8, 0.7 y 0.6. Durante los 100 ns de cálculo, las trayectorias con valores de λ 0.9 y 0.8 no sufrieron cambios conformacionales en la hélice H10, manteniéndose ésta orientada hacia el solvente en todo momento. En las simulaciones con valores de λ 0.7 y 0.6 se observó el movimiento de la hélice H10 hacia el interior de la cavidad hidrofóbica. La trayectoria con valor de $\lambda = 0.7$ fue la seleccionada para un análisis más detallado, debido a que fue la trayectoria, que con una reducción energética menor, se observó el movimiento de la hélice.

El análisis de la variación de RMSD de los átomos de la cadena principal de la proteína y de RMSF durante el tiempo de simulación (**Figuras 2.5A y 2.5B**), mostró un movimiento del esqueleto importante a partir del nanosegundo 50, mostrando más detalladamente que los residuos del 125 al 140, que forman parte de un bucle muy flexible que conecta la hélice H7 y H8, y los residuos de la hélice H10 fueron los más móviles a lo largo de la trayectoria (**Figura 2.5B**). En la visualización de la trayectoria se pudo observar el movimiento de la hélice H10, entrando en la cavidad hidrofóbica tras aproximadamente 50 ns de la simulación. La reorganización de la hélice H10 se inicia con un movimiento fluctuante de Lys157. Esta fluctuación rompe una interacción iónica entre Arg177-Glu170, lo que permite el movimiento de la hélice H10 dentro de la cavidad hidrofóbica, comenzando una serie de cambios entre diferentes residuos (**Figura 2.5C**). La reordenación teórica de esta hélice obtenida de SMD concuerda con la conformación de la hélice observada en la estructura dNCS-1/**FD44**¹⁷, como se puede ver en la **Figura 2.5D**.

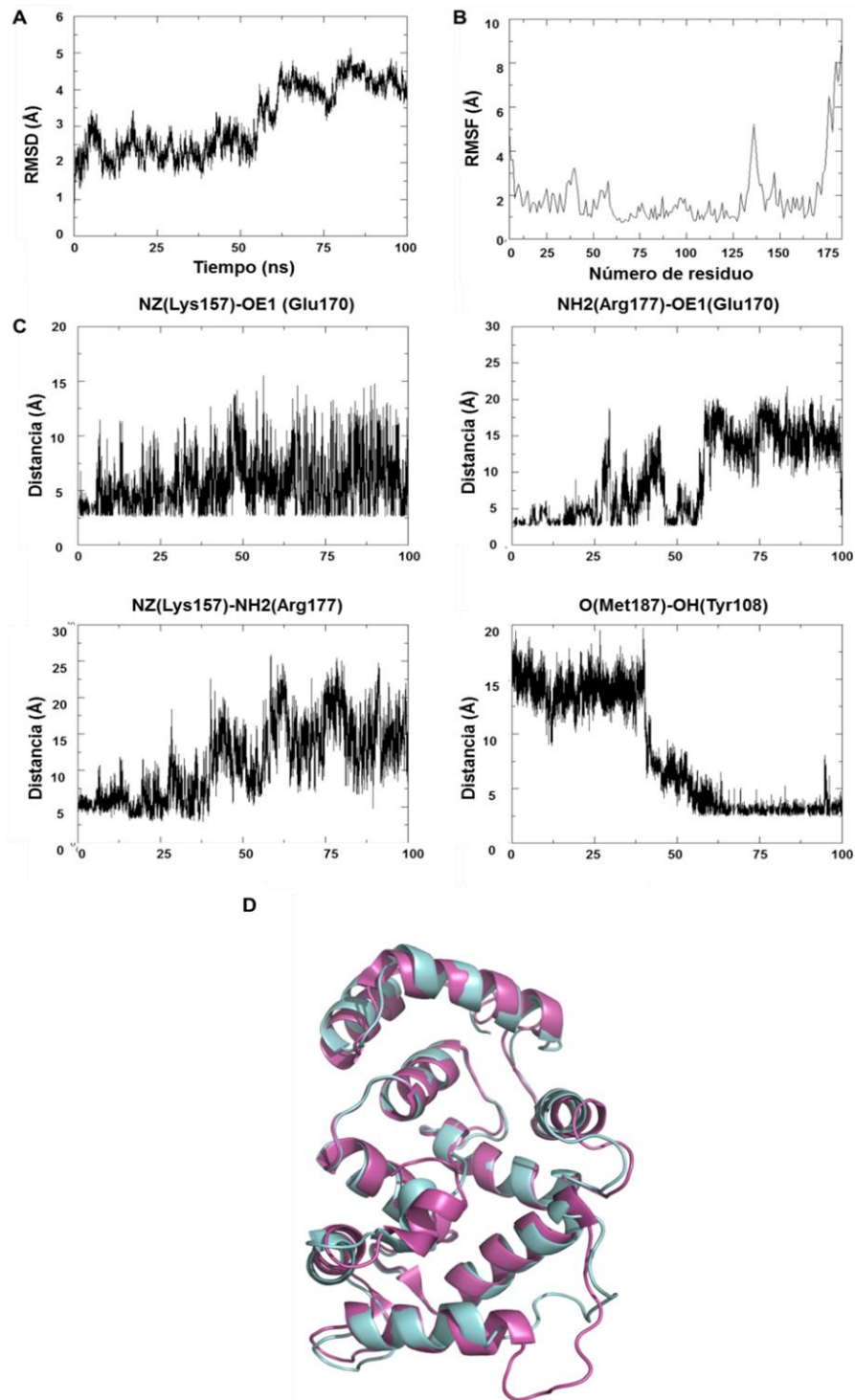


Figura 2.5. Entrada de la hélice H10 en la cavidad hidrofóbica durante la simulación de SMD: A) Valores de RMSD para los átomos de C, N y Ca del esqueleto de *d*NCS-1; B) Fluctuación de RMSF por residuo a lo largo de la simulación; C) Distancias en Å entre residuos clave que participan en el movimiento de la hélice H10. La fluctuación de Lys157 (arriba izquierda), la pérdida de la interacción entre Arg177 y Glu170 (arriba derecha) y la pérdida de interacción entre Lys157 y Arg157 (abajo izquierda), y la creación de nuevas interacciones cuando la hélice se introduce en la cavidad, como el enlace de hidrógeno entre Tyr108 y Met187 (abajo derecha); D) Superposición de la conformación final de *d*NCS-1 en la simulación de SMD (azul) y la estructura del complejo *d*NCS-1/**FD44** (rosa, PDB ID 5aan¹⁷).

El hecho de que el sitio de unión de Ca^{2+} EF4 esté implicado en la reordenación de la hélice H10 sugiere que la unión de Ca^{2+} puede tener un impacto en la dinámica o el posicionamiento de este importante elemento funcional, ya que es bien sabido que el reconocimiento de Ca^{2+} en los dominios *EF-hand* conlleva un cambio en la posición relativa de las llamadas hélices E y F, en este caso las hélices H8 y H9, respectivamente¹⁹.

3.1.2 Estudio del mecanismo de acción de **FD44** y **FD16**

Para analizar el complejo ligando-proteína y poder proponer un posible mecanismo de acción por parte de los inhibidores de la interacción entre NCS-1/Ric8a se realizaron una serie de estudios, integrando diferentes técnicas experimentales como la cristalografía del ligando en ausencia de *d*NCS-1, estudios de dinámica molecular para estudiar el comportamiento del complejo en un entorno fisiológico que permita la flexibilidad proteica y experimentos de RMN para el estudio del comportamiento del complejo en solución. En primer lugar se compararon las estructuras de **FD44** en ausencia de *d*NCS-1, con la estructura del ligando en el complejo *d*NCS-1/**FD44** (PDB ID 5aan¹⁷) (**Figura 2.6**).

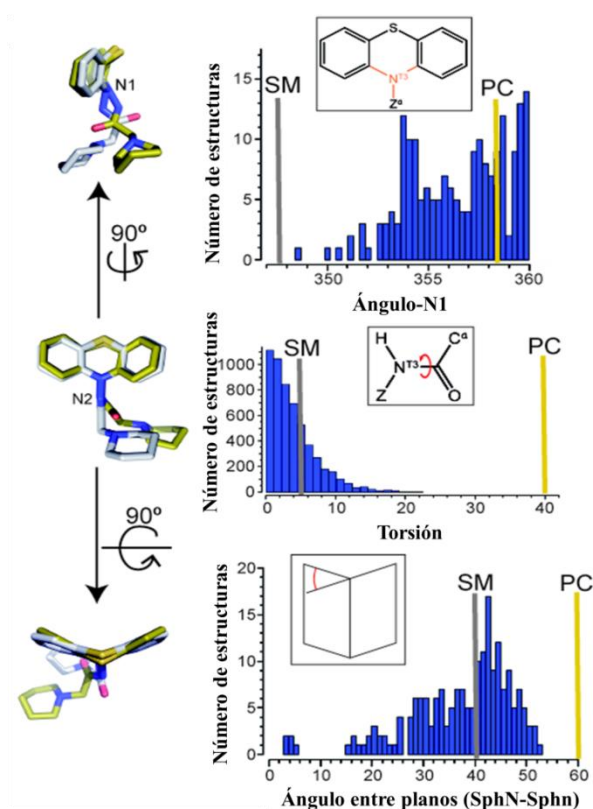


Figura 2.6. Diferentes vistas de la superposición de las estructuras cristalográficas de **FD44**, en estado libre (gris, SM) y en complejo con *d*NCS-1 (amarillo, PC). Las diferencias estructurales encontradas entre ambas estructuras analizadas con la base de datos estructural de Cambridge (CSD²⁰) se muestran en las gráficas de la derecha: en la gráfica superior se muestran los ángulos para el nitrógeno N1 de la fenotiazina, en la gráfica media se muestra la planaridad del grupo amida, y en la gráfica inferior el ángulo entre los planos de los anillos aromáticos de la fenotiazina.

El análisis de la estructura cristalográfica de **FD44** y su comparación con la estructura del ligando en el complejo *d*NCS-1/**FD44** permitió comprobar que la conformación bioactiva sufre un cambio en la hibridación del nitrógeno heterocíclico N1 que pasa de sp³ a sp² (**Figura 2.6**). El análisis de la geometría de ambas estructuras realizadas con el CSD²⁰ muestra claramente que la interacción de **FD44** con la proteína lleva al compuesto a una conformación bioactiva que solo puede explicarse en el contexto del complejo proteico, donde las interacciones con la proteína deberían compensar la energía conformacional comprometida del ligando.

Debido a la reorganización estructural observada, se realizaron cálculos de dinámica molecular convencional para estudiar el movimiento dinámico de **FD44** en su zona de interacción. Para este propósito, se realizó un estudio de *docking* de **FD44** en *d*NCS-1, seleccionando la mejor pose de **FD44** como punto de partida para realizar una dinámica molecular convencional de 20 ns. Se calculó la variación de RMSD de los átomos del ligando a lo largo de la trayectoria de dinámica molecular (**Figura 2.7**), observándose que en el nanosegundo 6 el ligando sufre un cambio conformacional, que se estabiliza a partir del nanosegundo 10. El ligando se mantiene estable el resto de la simulación, sufriendo otro cambio conformacional entre los nanosegundos 16 y 17 volviendo a la estabilidad tras este cambio. Para estudiar en más detalle cual es el cambio que sufre el ligando se analizaron las distancias entre los átomos del oxígeno de la amida y el átomo de azufre del anillo de fenotiazina a lo largo de la simulación (**Figura 2.7**). Durante los primeros 10 nanosegundos la distancia entre átomos fluctúa alrededor de 4.5 Å, estabilizándose a partir del nanosegundo 10 en una distancia de 6.0 Å. Esta distancia se recorta a 4.5 Å entre los nanosegundos 16 y 17, recuperando finalmente la distancia de 6.0 Å al final de la simulación. En conjunto estos datos muestran que el ligando **FD44** es capaz de invertir la geometría del nitrógeno N1 a lo largo de la simulación, favoreciendo una conformación similar a la obtenida en la estructura cristalográfica (PDB ID 5aan¹⁷).

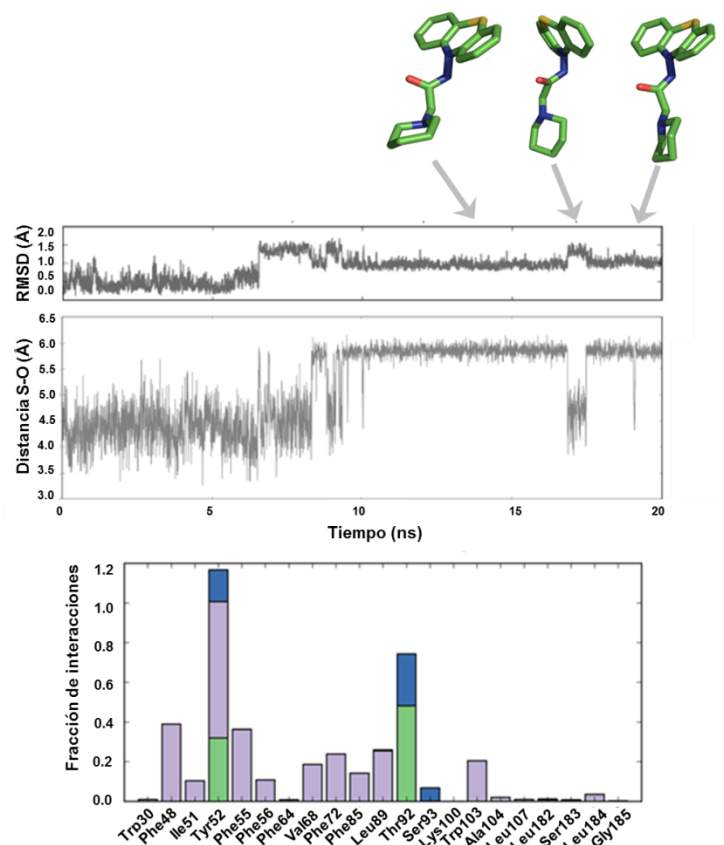


Figura 2.7. En la parte superior se encuentra la gráfica de la variación de RMSD de los átomos diferentes de hidrógeno del ligando **FD44**, con las poses representativas de **FD44** en diferentes momentos de la simulación, el gráfico inferior muestra la distancia entre el átomo de azufre y el átomo de oxígeno de la amida a lo largo de la simulación.

El comportamiento mostrado por el ligando **FD44** en su interacción con *d*NCS-1 se encuentra en concordancia con los estudios experimentales de cristalografía, aunque sugiere que estos cambios conformacionales deberían ser poco favorables para el ligando en términos energéticos. Para comprender el impacto de estos cambios conformacionales en la estabilización del complejo ligando-proteína y por lo tanto en la afinidad del ligando, se llevaron a cabo cálculos de energía libre mediante *Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area* (MM-GBSA²¹). La técnica de MM-GBSA es una aproximación de la mecánica molecular para el cálculo de la energía libre de Gibbs de un sistema durante una simulación de dinámica molecular tomando el modelo de solvente continuo de *Generalized Born*.

El análisis de la variación de la energía interna de **FD44** y de la energía libre del complejo *d*NCS1/**FD44** se llevó a cabo (**Tabla 2.2**), observándose que la energía interna del ligando aumentó 5 kcal·mol⁻¹ a lo largo de la simulación debido a los cambios conformacionales que sufre para maximizar las interacciones con *d*NCS-1. Esta pérdida energética se ve compensada con las nuevas interacciones que realiza con la diana, que mejoran la energía libre del complejo en casi 25 kcal·mol⁻¹.

Tabla 2.2. Resultados obtenidos en el cálculo de la energía interna del ligando y la energía libre del complejo *d*NCS-1/**FD44** en las etapas inicial y final de la simulación.

	Primeros 25 frames de la trayectoria	Últimos 25 frames de la trayectoria
Energía interna (FD44) (kcal·mol ⁻¹)	33.1178	38.2097
ΔG MM/GBSA (<i>d</i> NCS-1/ FD44) (kcal·mol ⁻¹)	-70.3686	-94.9659

Durante la simulación, **FD44** reconoce la cavidad hidrofóbica, interactuando con Thr92 a través de una interacción de enlace de hidrógeno, tanto directo y mediado por una molécula de agua. La simulación muestra principalmente tres tipos de interacciones entre **FD44** y *d*NCS-1: enlaces de hidrógeno con Thr92 y Tyr52 que fijan el ligando a la cavidad, interacciones hidrofóbicas entre el ligando y residuos aromáticos como Trp30, Phe48, Tyr52, Phe55, Phe56, Phe72 y Trp103 que estabilizan los anillos de fenotiazina en la cavidad, y ligeras interacciones entre el anillo de piperidina y la hélice H10 (**Figura 2.8**). El perfil de interacción ligando-proteína de **FD44** a lo largo de la simulación está en concordancia con la estructura cristalográfica del complejo *d*NCS-1/**FD44**. Se pudo observar que **FD44** muestra una interacción fuerte e inesperada con el residuo de Tyr52, que no está presente en la estructura cristalográfica. Este residuo parece ser importante para estabilizar **FD44** en la cavidad, a través de una interacción de enlace de hidrógeno con el nitrógeno N2 y las interacciones aromáticas con los anillos de la fenotiazina.

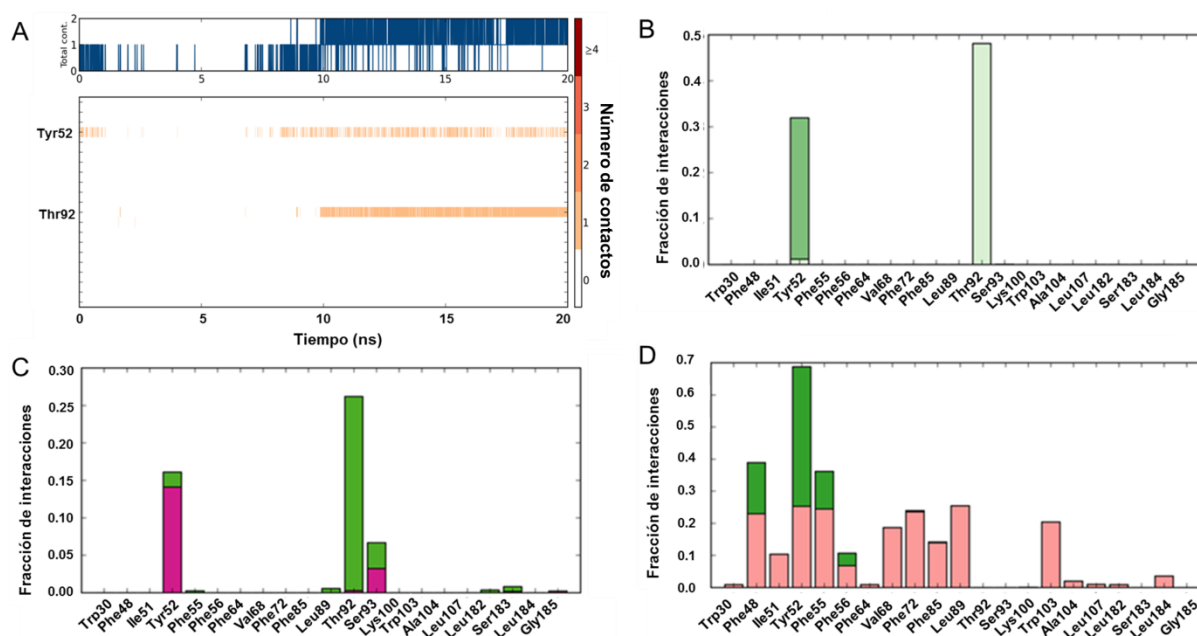


Figura 2.8. Análisis de las interacciones entre **FD44** y *d*NCS-1 a lo largo de la simulación. A) Aparición de las interacciones de enlace de hidrógeno; B) Interacciones de enlace de hidrógeno dador (verde oscuro) y aceptor (verde claro); C) Enlaces de hidrógeno mediados por molécula de agua dadores (rosa) y aceptores (verde); D) Interacciones hidrofóbicas (rosa) y aromáticas (verde).

Este protocolo de *docking* y dinámica molecular muestra ser capaz de predecir el reconocimiento del ligando **FD44** por la cavidad hidrofóbica de *dNCS-1*, siendo capaz no sólo de predecir la ya conocida interacción de enlace de hidrógeno con Thr92, sino además sugiriendo la posibilidad de que el residuo de Tyr52 también se encuentre implicado en el reconocimiento de **FD44** por esta proteína. También se ha podido comprobar que el nitrógeno N1 de **FD44** es capaz de invertir su geometría durante la dinámica, siendo la conformación más estable la misma que se encontró en la estructura cristalográfica (**Figura 2.9**).

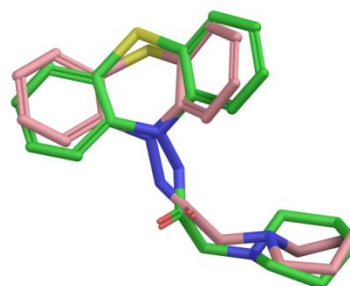


Figura 2.9. Superposición de la pose más representativa obtenida de la parte final de la simulación de dinámica molecular (verde) y la estructura de **FD44** en complejo con *dNCS-1* (rosa). El valor de la RMSD entre ambas poses es de 0.66 Å.

De manera análoga y siguiendo el mismo protocolo, se realizaron estudios de dinámica molecular para el compuesto **FD16**, otro de los compuestos previamente descritos con actividad inhibitoria de la interacción entre *dNCS-1* y Ric8a. La trayectoria de la dinámica molecular se analizó para obtener las interacciones entre ligando y diana a lo largo de la simulación (**Figura 2.10A-C**). El ligando **FD16** era capaz de interactuar con la cavidad hidrofóbica de *dNCS-1* mediante 3 tipos de interacciones diferentes: enlaces de hidrógeno con los residuos de Tyr52 y Thr92; interacciones hidrofóbicas y aromáticas con los residuos de Trp30, Phe48, Ile51, Tyr52, Phe55, Phe56, Val68, Phe72, Phe85, Leu89, Trp103, Leu182 y Leu184; e interacciones de enlace de hidrógeno mediados por molécula de agua con Tyr52, Thr92 y Ser93. Este perfil de interacciones ligando-diana se correlaciona correctamente con los obtenidos en la estructura cristalográfica (PDB ID 5fyx¹⁷). A lo largo de la trayectoria, el ligando **FD16** muestra una pose muy similar a la presente en la estructura cristalográfica, como se puede observar en la superposición de la estructura de **FD16** en la parte más estable de la trayectoria y en la estructura cristalográfica con PDB ID 5fyx¹⁷ (**Figura 2.10D**).

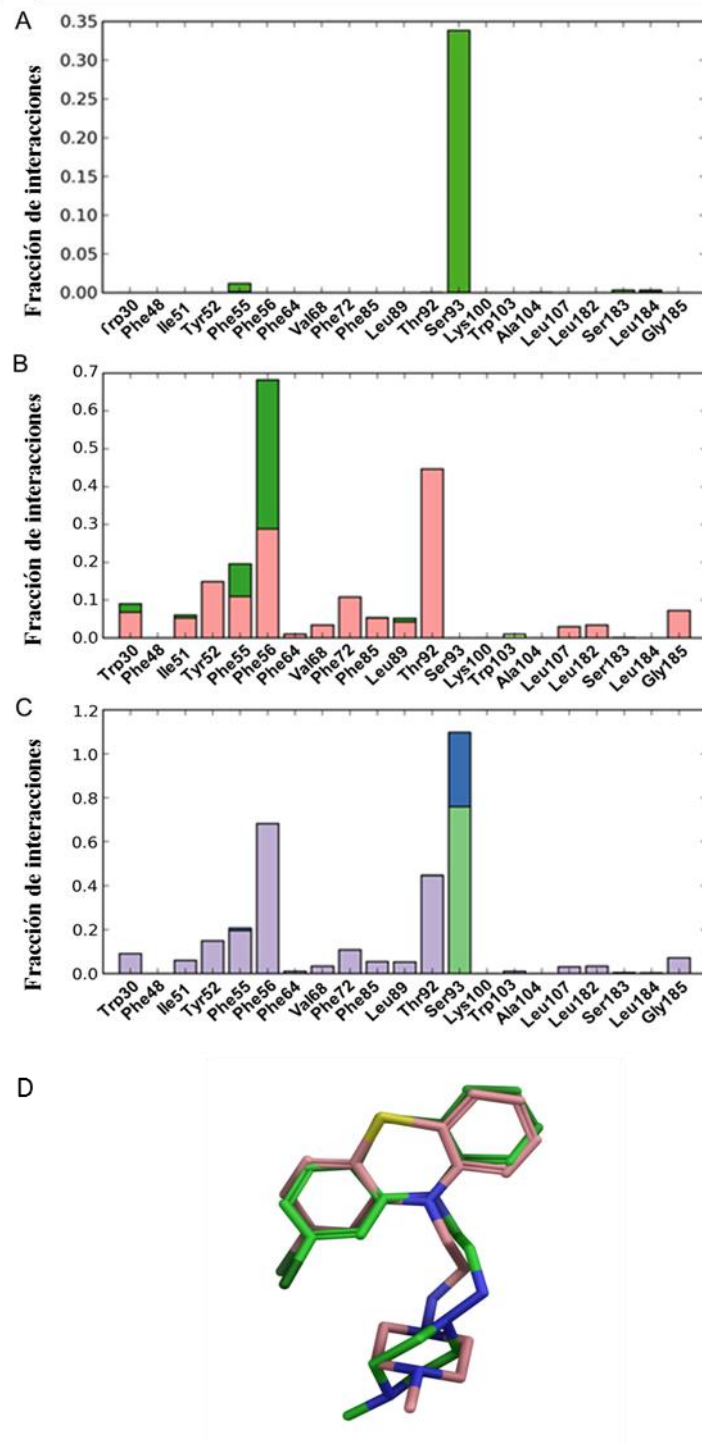


Figura 2.10. Análisis de las interacciones entre **FD16** y *dNCS-1* a lo largo de la simulación. A) Enlaces de hidrógeno mediados por molécula de agua dadores (rosa) y aceptores (verde); B) Interacciones hidrofóbicas (rosa) y aromáticas (verde); C) Interacciones totales de **FD16** con *dNCS-1*: enlaces de hidrógeno (verde), interacciones aromáticas/hidrofóbicas (gris) y mediadas por molécula de agua (azul); D) Superposición de la pose representativa de la trayectoria de la dinámica molecular de **FD16** (verde) y la estructura cristalográfica (PDB ID 5fyx).

El modo de unión entre los ligandos **FD44** y **FD16** es ligeramente diferente, debido a la diferente naturaleza química de estos. Se puede observar que ambos mantienen enlaces de hidrógeno con el residuo de Ser93, pero únicamente **FD44** es capaz de interactuar con el residuo de Tyr52. Teniendo en cuenta esta interacción diferente entre ambos ligandos, y que la afinidad reportada para **FD44** es de un orden mayor que en el caso de **FD16**, se puede concluir que la interacción con Tyr52 es una interacción que podría ser importante para mejorar la afinidad de ligandos por *d*NCS-1.

3.2 Experimentos de NCS-1 y **FD44** en solución

Los resultados obtenidos hasta el momento acerca del reconocimiento molecular entre **FD44** y *d*NCS-1 se realizaron tanto en estado sólido (experimentos de cristalografía) como de modo teórico en estado gaseoso (modelado molecular). Para estudiar desde otro punto de vista alternativo el reconocimiento molecular entre **FD44** y *d*NCS-1, se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) para completar así el estudio teniendo en cuenta una aproximación en solución más fisiológica. Para ello se llevaron a cabo experimentos de STD-RMN y tr-NOESY para estudiar las interacciones proteína-ligando desde el punto de vista del ligando²².

La técnica de STD-RMN²³ está basada en la transferencia de magnetización entre la diana, que es selectivamente irradiada mediante un conjunto de pulsos de radiofrecuencia, y cualquier ligando que se una a ella. El espectro STD es la diferencia de dos espectros ¹H: el espectro “en resonancia” (*on resonance*), en el cual el pulso de saturación es aplicado selectivamente sobre las señales del receptor, y el espectro “fuera de resonancia” (*off resonance*), en donde el pulso se aplica lejos de las señales tanto del ligando como del receptor. La diferencia de ambos espectros da como resultado un espectro diferencial que muestra las señales de aquellos núcleos del ligando que han recibido magnetización durante su unión con la macromolécula. El análisis del espectro diferencial permite no solo identificar compuestos que se unan a una diana, sino que también puede aportar información del epítipo de unión del ligando, debido a que los núcleos del ligando más próximos a la diana recibirán más transferencia de magnetización que aquellos que no participen en la unión²⁴.

Por otro lado, la técnica de tr-NOESY²⁵ se centra en el cambio de signo en los picos NOE del ligando, tras su unión con la diana. Esto es debido a que el signo NOE depende del tiempo de correlación del movimiento global de la molécula, es decir, depende del tamaño de la molécula. Los experimentos tr-NOESY son experimentos NOESY 2D en donde los picos de cruce del ligando cambian su signo NOE cuando se unen a una macromolécula, debido a que adoptan las propiedades de movimiento de la diana. Como resultado, los ligandos que no se unen a la proteína, no mostrarán cambio en el signo NOE (manteniéndose positivo), mientras

los ligandos que se unan cambiarán su signo (a signo negativo). El NOE observado es una contribución de los estados libre y unido del ligando, pero como el ratio de relajación del ligando unido es mucho mayor que en estado libre, el NOE es capaz de mostrar una predominancia del estado unido, por lo que este experimento es capaz de aportar información geométrica de la conformación del ligando en su forma unida.

Uno de los puntos clave y fundamentales para la realización de experimentos de STD-RMN es conseguir una muestra en disolución del complejo ligando-proteína en presencia de exceso de ligando en una proporción entre 20:1 a 30:1 (ligando:proteína), para así conseguir obtener espectros con picos suficientemente intensos para su estudio. Para la disolución del compuesto **FD44**, se planteó inicialmente utilizar una disolución tampón con las condiciones descritas para el experimento de fluorescencia¹⁷: tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 30 mM, pH 7.9, NaCl 125 mM, CaCl₂ 0.5 mM, EtOH al 14% o DMSO al 3%. La disolución madre de **FD44** se realizó tanto en EtOH-d₆ como en DMSO-d₆, llevándose la disolución tampón a concentraciones de 200 µM y 300 µM siendo insoluble y precipitando. Para intentar mejorar la solubilidad del compuesto, se realizaron diferentes pruebas en soluciones tampón con diferentes condiciones, acidificando el pH del tampón. El compuesto **FD44** tiene en su estructura un anillo de piperidina, que a pH ácido tiende a protonarse, pudiendo de este modo mejorar sus propiedades de solubilidad acuosa. Por ello se decidió utilizar una solución tampón fosfato deuterado (PBS), a pH 5.9 compuesto por 125 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM Na₂HPO₄ y 1.7 mM KH₂PO₄. Se tomó la decisión de cambiar Tris por PBS, ya que no introduce señales de protones adicionales que puedan interferir en la sensibilidad del experimento ni en las señales del ligando, pudiendo tamponar mejor la solución. En este punto se planteó que el calcio podía precipitar en tampón fosfato. Sin embargo, las condiciones utilizadas, pH ácido (5.9) y bajas concentraciones tanto de Ca²⁺ (0.5 mM) y fosfato total (por debajo de 12 mM) se encuentran en un rango seguro para evitar la precipitación de fosfato de calcio, que se encontraría favorecido a rangos de pH y concentraciones más altos²⁶.

Bajo las condiciones experimentales, se observaron dos series de señales de ¹H y se asignaron a los diferentes conformeros de **FD44** derivados de la inversión de nitrógeno N1²⁷. El espectro STD-RMN reveló que ambos conformeros de **FD44** se unen a dNCS-1 (**Figura 2.11A**). La mayor transferencia de saturación se encontró en la región aromática de **FD44** mientras que los protones de piperidina mostraron intensidades marginales de STD. Los datos de STD-RMN sugieren que el epítipo de unión se localiza principalmente en la región aromática de **FD44** (**Figura 2.11B**). Los estudios de tr-NOESY confirmaron la unión de **FD44** a la proteína en solución (**Figura 2.11C**). Así, se observaron picos cruzados con el mismo signo de diagonal, propios del ligando en forma unida²⁷, que confirmaron la formación del complejo **FD44/dNCS-1**.

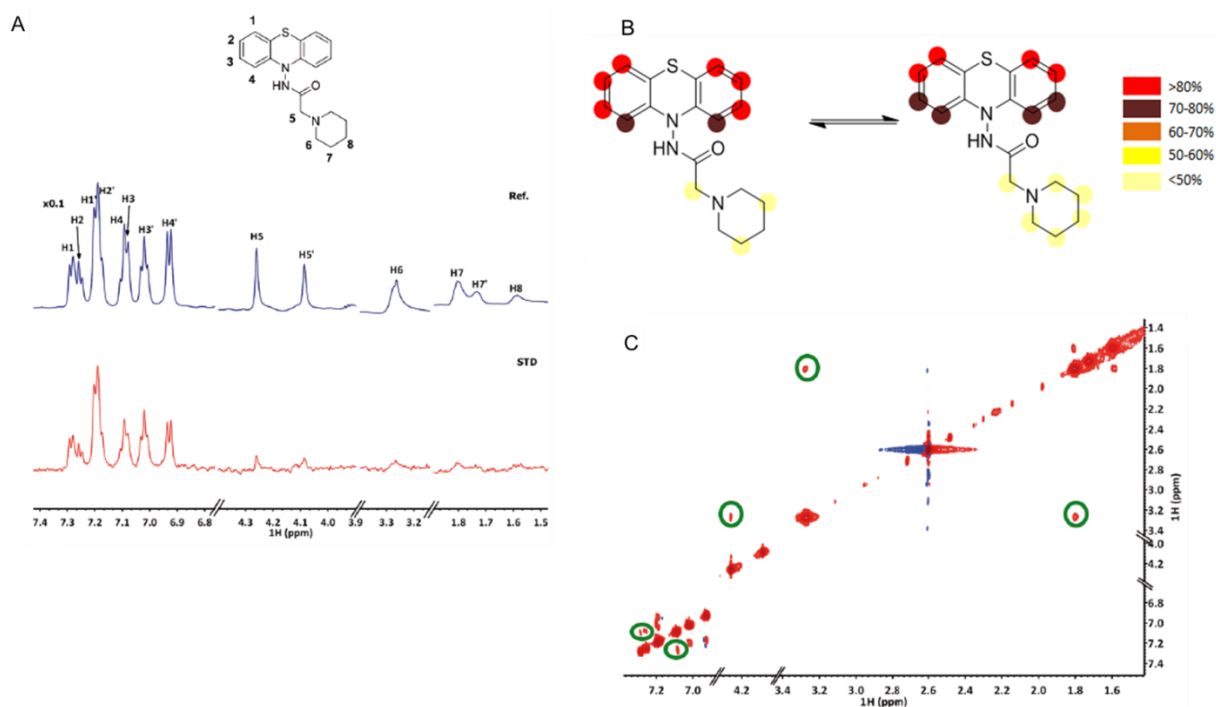


Figura 2.11. A) Espectro STD-RMN. En azul, espectro fuera de resonancia de **FD44**. En rojo, espectro de diferencia STD de **FD44** en presencia de *d*NCS-1 (20:1 ligando/proteína) tras dos segundos de irradiación en resonancia a -0.5 ppm; B) Epítipo del ligando **FD44** derivado de las intensidades del espectro STD-RMN; C) Espectro tr-NOESY con un tiempo de mezcla de 200 ms. Algunos picos de cruce que están resaltados en círculos verdes pertenecen a las señales de ^1H de **FD44** y corresponden a señales NOE de signo negativo, indicativos de unión con la proteína.

En resumen, los estudios de RMN respaldan los hallazgos previos mediante cristalografía de rayos-X y dinámica molecular que indican que el resto de fenotiazina establece contactos importantes con *d*NCS-1 mientras que la cola de piperidina más flexible explora múltiples posiciones con contactos menos definidos con la proteína. Además, estos experimentos confirman la existencia de dos conformaciones diferentes derivadas de la inversión del nitrógeno N1, mostrando ambas conformaciones como un perfil de epítipo que se encuentra en concordancia con los estudios de modelado molecular y cristalográfico. Como conclusión, la combinación de estudios de difracción cristalográfica, cálculos de dinámica molecular y datos de STD-RMN sugiere que Thr92 y/o Tyr52, junto con los aminoácidos localizados al final de hélice H10, son los residuos clave para la unión de moléculas pequeñas e interrumpir la interacción entre *d*NCS-1 y Ric8a, junto con los aminoácidos localizados al final de hélice H10.

3.3 Identificación de nuevos inhibidores de la interacción NCS-1/Ric8a

Con todo lo expuesto anteriormente, se puede decir que el compuesto **FD44** es un cabeza de serie prometedor para el desarrollo de fármacos en el tratamiento del SFX. Continuando con el desarrollo de un programa de Química Médica, nuestro siguiente objetivo fue la identificación de nuevos inhibidores más eficaces y selectivos que **FD44**. Siguiendo con un flujo racional de trabajo en el diseño y descubrimiento de fármacos, la integración de los datos estructurales sugieren en primer lugar, que el grupo de aminofenotiazina podría ser reemplazado por un esqueleto menos rígido que pueda interactuar con los residuos de Tyr52 y Thr92, y en segundo lugar, que el anillo de piperidina podría ser reemplazado por otros grupos que permitan optimizar las interacciones con los residuos de la hélice H10.

Para la identificación de nuevos compuestos se realizó un ensayo de cribado virtual, empleando diferentes filtros. Se utilizó la quimioteca MBC²⁸ y se diseñó un protocolo de búsqueda de compuestos con propiedades fisicoquímicas similares a **FD44**, que tuvieran la capacidad de interactuar con *d*NCS-1 mediante los residuos de Tyr52 y Thr92 (**Figura 2.12**).

En primer lugar, se aplicaron 5 filtros para la identificación de los compuestos con propiedades tipo fármaco similares a **FD44**: *Stars* ≤ 2, peso molecular entre 300-400 Da, número de enlaces rotables entre 1 y 6, grupos dadores de enlaces de hidrógeno entre 1 y 3 y grupos aceptores de enlaces de hidrógeno entre 4 y 6. De los 2000 compuestos iniciales, únicamente 175 compuestos cumplieron los requisitos deseados. Los 175 compuestos identificados fueron utilizados en un estudio de *docking* en dos etapas, un primer cálculo con precisión estándar de Glide²⁹ (SP Glide) y un *redocking* con precisión extra (XP Glide) para identificar los compuestos susceptibles de interactuar con los residuos propuestos.

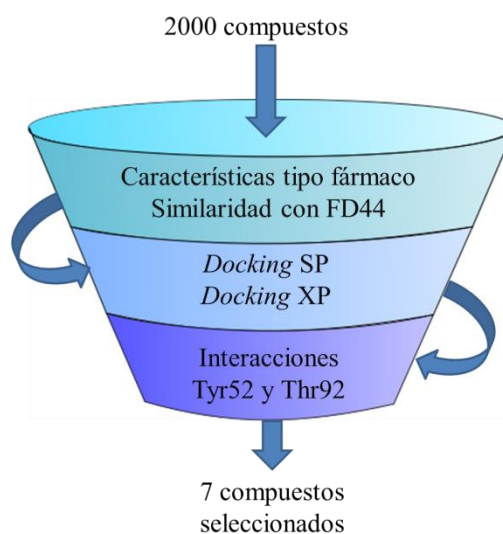
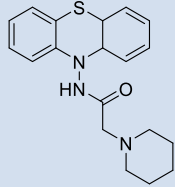
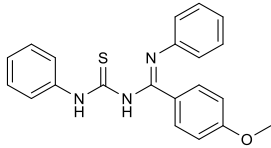
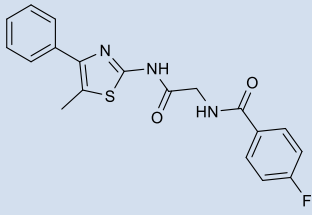
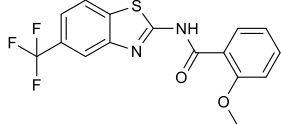
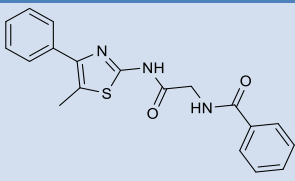
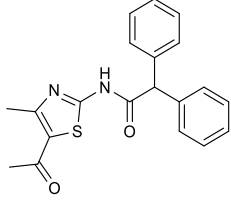
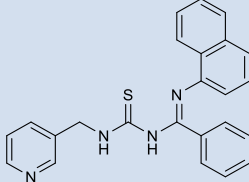
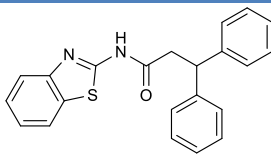


Figura 2.12. Esquema del proceso de cribado virtual llevado a cabo en la identificación de nuevas moléculas que se unan a *d*NCS-1.

Únicamente los compuestos con mejor puntuación de *docking* que fueran capaces de interactuar con Thr92 y/o Tyr52 se seleccionaron para determinar su actividad biológica experimentalmente (**Figura 2.13**). La **Tabla 2.3** recoge los compuestos seleccionados, presentando estos compuestos un esqueleto diferente al de fenotiazina (como **FD44** y **FD16**) y mostrando diversidad química entre ellos.

Tabla 2.3. Estructuras de los compuestos seleccionados mediante cribado virtual para su evaluación en la inhibición de la interacción *d*NCS-1/Ric8a. En primer lugar se muestra el compuesto **FD44**, utilizado como control positivo en todo el protocolo del cribado virtual.

Referencia	Puntuación de <i>docking</i> (kcal/mol)	Peso molecular (Da)	Estructura
FD44	-6.527	341.470	
VP1.39	-8.251	361.463	
MR4.43	-7.374	369.414	
IGS-3.31	-7.977	352.331	
MR2.17	-7.616	351.424	
IGS-2.68	-8.217	350.436	
VP2.8	-8.928	396.512	
IGS-1.76	-8.384	358.459	

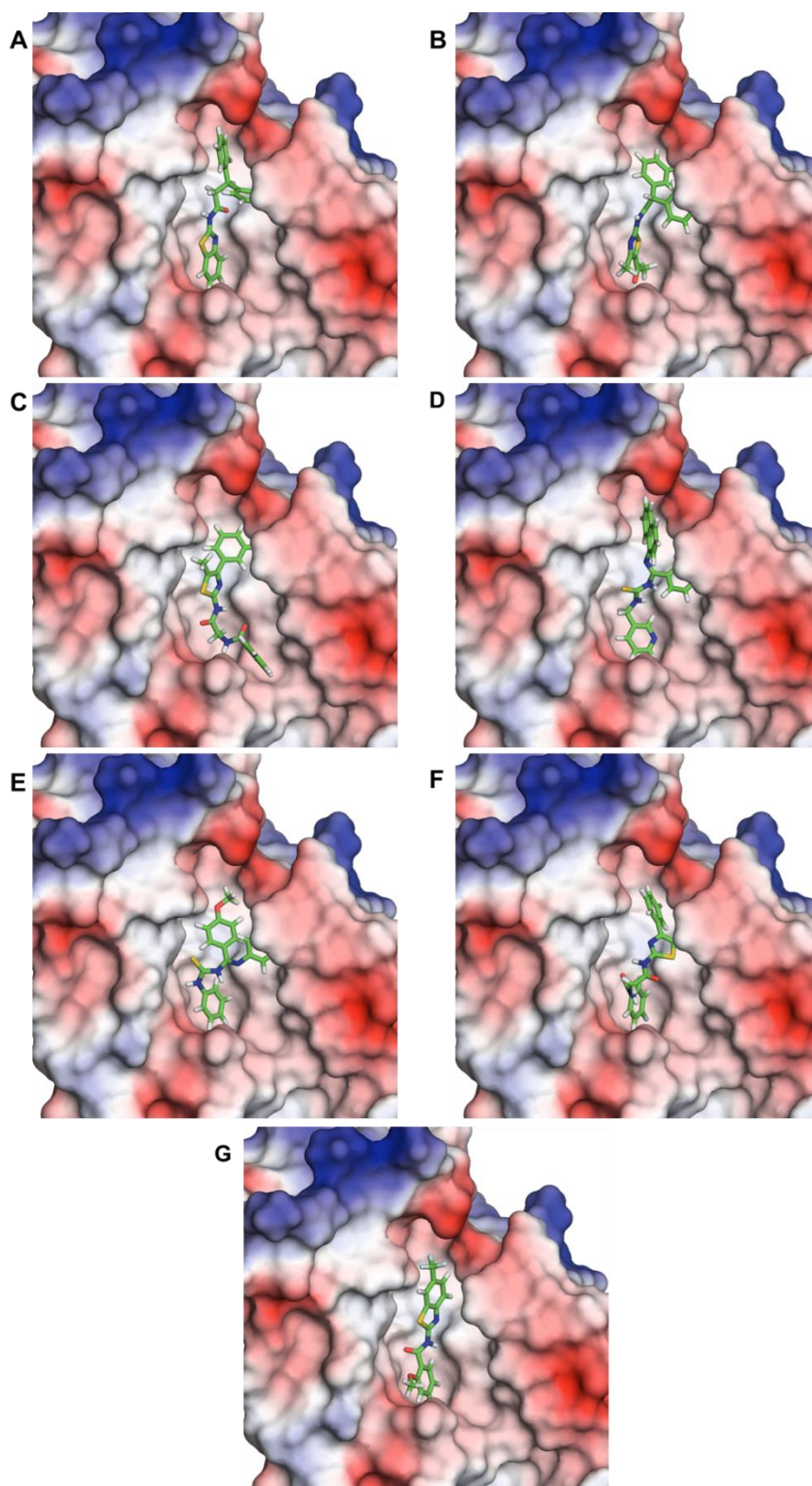


Figura 2.13. Pose obtenida para los mejores compuestos seleccionados en los estudios de *docking*: A) IGS-1.76; B) IGS-2.68; C) MR2.17; D) VP2.8; E) VP1.39; F) MR4.43; G) IGS-3.31

La capacidad de inhibir la interacción entre *hNCS-1* y Ric8a se analizó en un ensayo basado en una técnica de co-inmunoprecipitación¹⁷ (**Figura 2.14**). Mediante la aplicación de esta técnica, se transfectaron tanto *hNCS-1* como Ric8a marcado con una cola de V5 en cultivos de células HEK293. Los compuestos seleccionados se añadieron al cultivo celular y se lisaron las células. Posteriormente se co-inmunoprecipitó el complejo *hNCS-1*/Ric8a usando un anticuerpo contra *hNCS-1*, para finalmente realizar un *western blot* usando anticuerpos anti-V5 y anti-*hNCS-1*. De este modo las bandas observadas en el *western blot* se correspondieron con la presencia o ausencia de Ric8a. La ausencia de bandas de las muestras en las que aplicaron los compuestos **MR4.43**, **IGS-3.31** e **IGS-1.76** determinó la capacidad de estos tres compuestos de inhibir la interacción *hNCS-1*/Ric8a. Estos tres compuestos, que presentaron un porcentaje de inhibición de la interacción proteína-proteína mayor del 50%, fueron seleccionados para estudios posteriores. (**Figura 2.14**).

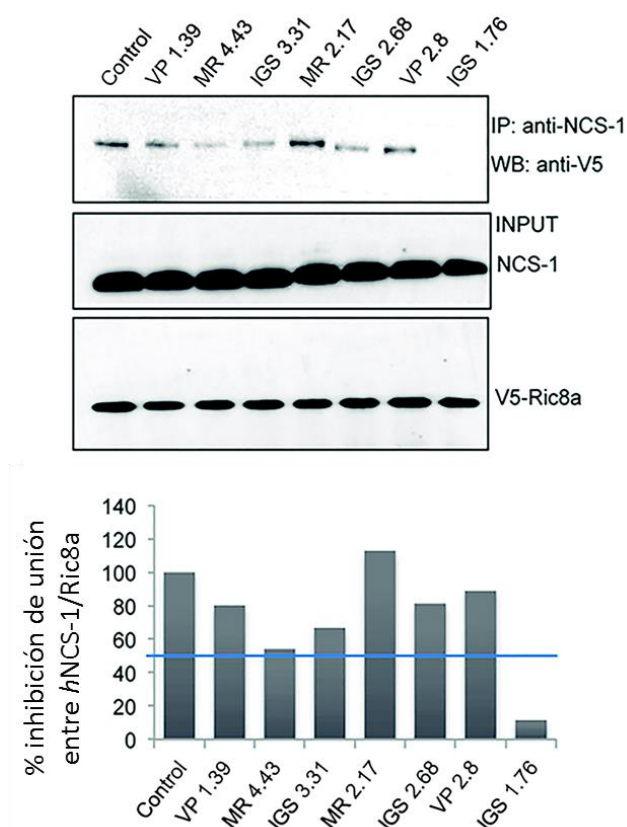


Figura 2.14. Inhibición de la formación del complejo *hNCS-1*/Ric8a mediante molécula pequeña. En la parte superior, ensayo de interacción entre *hNCS-1* y Ric8a en células HEK que expresan NCS-1 y Ric8a marcado con V5 en presencia de los compuestos seleccionados (IP inmunoprecipitación; WB *western blot*). En la parte inferior un gráfico representando la densitometría de bandas de la co-inmunoprecipitación. La línea azul indica el 50% de inhibición de la interacción.

Para determinar la afinidad de los tres ligandos identificados por *hNCS-1* y *dNCS-1*, se realizaron experimentos de emisión de fluorescencia de Trp a concentraciones crecientes de los compuestos seleccionados (**Tabla 2.4**). La afinidad reportada de **FD44** por *dNCS-1* es de 71 ± 4

μM^{17} . Utilizando las mismas condiciones experimentales el nuevo inhibidor de la interacción *d*NCS1-Ric8a, **IGS-1.76** mostró una afinidad de $1.13 \pm 0.35 \mu\text{M}$, un orden de magnitud más potente que el compuesto **FD44**. También se midió la afinidad del compuesto **IGS-1.76** por *h*NCS-1, siendo de $1.25 \pm 0.40 \mu\text{M}$. El segundo compuesto con mejor inhibición de la interacción proteína-proteína, el **MR4.43** fue insoluble bajo estas condiciones experimentales, por lo que no se pudieron obtener resultados de su afinidad. El tercer compuesto, **IGS-3.31**, mostró una afinidad por *h*NCS-1 de $11.53 \pm 1.60 \mu\text{M}$, siendo mejor que la del compuesto **FD44**, manteniéndose en el mismo orden de magnitud (**Tabla 2.4**). En resumen, esta estrategia de cribado virtual, guiada por la integración de datos estructurales y cálculos de dinámica molecular, ha permitido la identificación de dos nuevas moléculas, **IGS-1.76** e **IGS-3.31**, químicamente diferentes a **FD44**, con potentes propiedades inhibitoras de PPI y mejorando los valores de afinidad por NCS-1.

Tabla 2.4. Resumen de las afinidades medidas mediante fluorescencia para el compuesto **FD44** y los compuestos seleccionados mediante cribado virtual.

Referencia	K_d <i>d</i> NCS-1	K_d <i>h</i> NCS-1
FD44	$71 \pm 4 \mu\text{M}$	-
MR4.43	Insoluble	Insoluble
IGS-3.31	-	$11.53 \pm 1.60 \mu\text{M}$
IGS-1.76	$1.13 \pm 0.35 \mu\text{M}$	$1.25 \pm 0.40 \mu\text{M}$

Para confirmar la actividad a nivel molecular de **IGS-1.76** como un regulador del complejo NCS-1/Ric8a, se resolvió la estructura cristalina del complejo *d*NCS-1 unido a **IGS-1.76** a una resolución de 1.82 \AA (**Figura 2.15A**). La cavidad hidrófoba en la que **IGS-1.76** se une a *d*NCS-1 y la conformación que adopta la proteína son muy similares a las encontradas en el complejo *d*NCS-1/**FD44**, con un RMSD de 0.44 \AA para todos los átomos (**Figura 2.15B**).

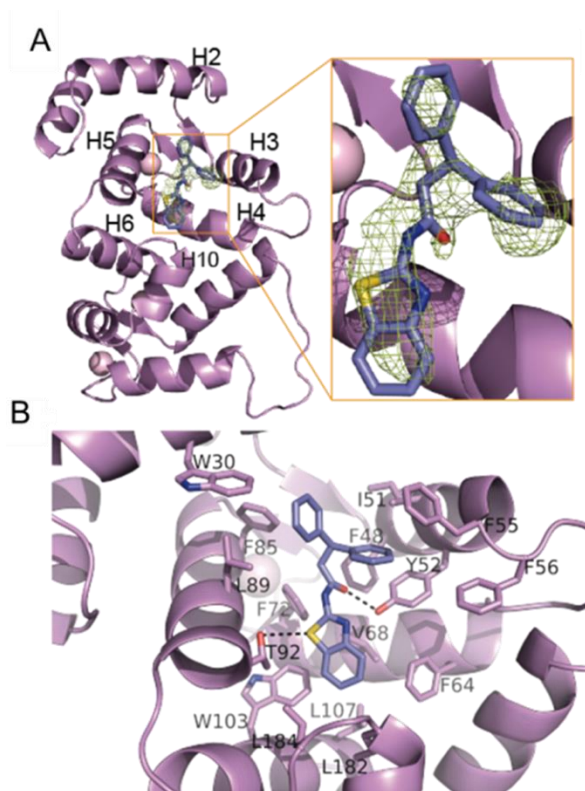


Figura 2.11. A) Estructura cristalográfica de **IGS-1.76** unido a *dNCS-1*. Representación en cintas de *dNCS-1* unido a Ca^{2+} (esferas rosas) e **IGS-1.76** (lila). A la derecha se muestra el ligando con mayor detalle; B) Imagen detallada de los residuos con los que interacciona **IGS-1.76**. Los enlaces de hidrógeno se resaltan con líneas de puntos.

Curiosamente, el átomo de oxígeno del grupo amida y el átomo de azufre del sustituyente benzotiazol apuntan a lados opuestos de la cavidad hidrofóbica para interactuar mediante enlace de hidrógeno con los residuos de Tyr52 y Thr92 respectivamente, los dos residuos que fueron seleccionados en los cribados virtuales como filtro para la interacción con los ligandos. Además, **IGS-1.76** establece múltiples interacciones de VdW con los residuos hidrofóbicos próximos (**Figura 2.15B**).

Los aminoácidos que participan en el reconocimiento **IGS-1.76** son casi los mismos que los implicados en el complejo *dNCS-1*/**FD44** y solo dos residuos adicionales (Val68 y Leu107), ubicados en la parte más profunda de la cavidad, interactúan con **IGS-1.76** (**Figura 2.16A**). A pesar de la similitud, el número de contactos entre *dNCS-1* e **IGS-1.76** es 2.8 veces mayor que los observados entre *dNCS-1* y **FD44** (315 frente a 112 contactos, respectivamente). El aumento se debe principalmente a dos razones: la flexibilidad conformacional de **IGS-1.76** y la presencia del grupo de benzotiazol. Por un lado, el grupo 2,2-difeniletilo de **IGS-1.76** ofrece una plasticidad de la que carece el anillo de fenotiazina de **FD44**. Esto a su vez influye en el grupo amida, que es capaz de apuntar hacia otras regiones de la cavidad, interactuando con el residuo de Tyr52 mediante enlace de hidrógeno (**Figura 2.15B**). Al hacerlo, la molécula puede adaptarse a la cavidad e introducirse más en ella, aumentando la cantidad de contactos y

reduciendo las distancias de unión. Por otro lado, el grupo de benzotiazol ofrece varias ventajas con respecto al anillo de piperidina de FD44. En primer lugar, la presencia de un grupo aceptor de enlaces de hidrógeno como el átomo de azufre permite una interacción con el residuo de Thr92 (**Figura 2.15B**). En segundo lugar, el mayor tamaño del grupo benzotiazol y su orientación planar con respecto a la cavidad permite tanto la formación de múltiples interacciones hidrofóbicas, participando nuevos residuos como Val68 y Leu107 (**Figura 2.16A**) como que la molécula se inserte más profundamente en la cavidad (**Figura 2.16B**). De este modo se favorece la formación de un buen número de nuevos contactos hidrofóbicos con la hélice H10 (principalmente con Leu182 y Leu184), que se incrementan significativamente con respecto a FD44 (**Figura 2.15B**). Esto es relevante, ya que se ha demostrado que la interacción de la molécula pequeña con la hélice H10 y su estabilización dentro de la grieta es un punto crucial para inhibir la formación del complejo NCS-1/Ric8a. En resumen, IGS-1.76 es reconocido de una manera más eficiente por *d*NCS-1, y el grupo de benzotiazol ancla la hélice H10 dentro de la cavidad mediante múltiples contactos. Esto explica la mayor afinidad y la buena actividad inhibidora del complejo *h*NCS-1/Ric8a.

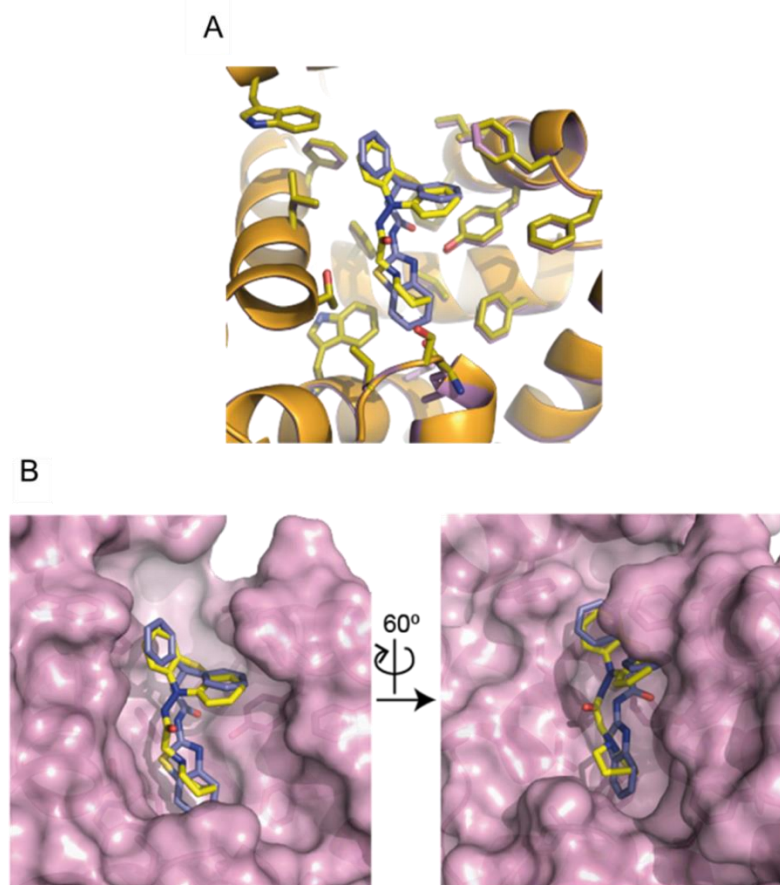


Figura 2.16. A) Superposición de *d*NCS-1/**FD44** (naranja/amarillo) y *d*NCS-1/**IGS-1.76** (rosa/lila); B) Vista frontal y lateral de la representación de la superficie de *d*NCS-1 mostrando cómo la cavidad es capaz de albergar pequeños ligandos.

En conjunto, se propone **IGS-1.76** como un nuevo inhibidor de la interacción entre NCS-1 y Ric8a con una mejor perspectiva farmacológica. Además, este compuesto ofrece oportunidades adicionales para un mayor desarrollo, ya que uno de los dos grupos fenilo apunta hacia la parte superior de la cavidad donde hay espacio para hacer crecer la molécula, aumentando la afinidad y, en consecuencia, la selectividad.

4. CONCLUSIONES

La identificación y desarrollo de inhibidores de interacciones proteína-proteína son objetivos desafiantes que llevan abordándose durante las últimas décadas en diferentes áreas terapéuticas. Debido a las características intrínsecas de las interacciones proteína-proteína, que presentan interfaces de interacción generalmente planos y largos, en contraste con las cavidades cóncavas y profundas que típicamente unen pequeñas moléculas, el diseño de moléculas tipo fármaco para inhibir tales interacciones supone un reto complicado.

El síndrome de Frágil-X, forma más común de discapacidad intelectual, como hemos visto a lo largo del capítulo, no tiene cura. Es posible tratar algunos síntomas con terapia educativa y farmacológica, pero es necesario el desarrollo de tratamientos eficaces para luchar contra esta enfermedad. La inhibición de la interacción entre NCS-1 y Ric8a, como estrategia innovadora en el tratamiento del SFX ha sido desarrollada previamente, mostrando buenos resultados en modelos animales. Estudios previos del grupo permitieron la identificación de una molécula, el compuesto **FD44**, capaz de inhibir la interacción entre NCS-1 y Ric8a. Partiendo de estos resultados iniciales se han realizado estudios, tanto teóricos como experimentales, permitiendo profundizar en el mecanismo de inhibición de la interacción proteína-proteína mediante molécula pequeña, así como la identificación y caracterización del sitio de unión.

Mediante estudios de modelado molecular y experimentos de RMN, se ha podido estudiar el comportamiento de estos ligandos en diferentes condiciones, tanto en solución, como en estado sólido y de modo teórico. Gracias a los estudios de dinámica molecular se ha podido identificar la interacción con el residuo de Tyr52, no presente en las estructuras cristalográficas, como una diferencia en el comportamiento entre **FD44** y **FD16**. Además, los estudios teóricos para estudiar el comportamiento de la hélice H10 de NCS-1 han permitido observar el movimiento dinámico de esta hélice, capaz de reconocer la cavidad hidrofóbica de NCS-1. El reconocimiento de la cavidad hidrofóbica de la hélice H10 puede ser un mecanismo autorregulatorio de la misma proteína, y la estabilización de esta conformación mediante una molécula pequeña conlleva una afectación del reconocimiento de Ric8a, que puede aprovecharse para la terapéutica en el tratamiento del SFX. Por último, la búsqueda de nuevos

inhibidores de la interacción entre proteínas nos ha permitido identificar dos nuevas moléculas, **IGS-1.76** e **IGS-3.31**, como dos compuestos capaces de inhibir la interacción entre NCS-1 y Ric8a, presentando una mayor afinidad por NCS-1 que FD44, el compuesto referencia hasta el momento. La identificación de estas dos nuevas moléculas abre el camino para el desarrollo de nuevas moléculas más afines por NCS-1, y aporta nuevas herramientas farmacológicas para posteriores estudios en modelos animales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Análisis del movimiento de la hélice H10

El movimiento dinámico de la hélice 10 y su estabilización en el interior del bolsillo hidrofóbico debido a la unión del compuesto **FD44** se estudió mediante dinámica molecular escalada (*Scaled Molecular Dynamics*; SMD). Este método permite un mayor muestreo conformacional de biomoléculas mediante el escalado de la energía potencial superficial sin sesgar las fluctuaciones de energía, dependiendo únicamente de las poblaciones de conformaciones que forman el conjunto canónico de estructuras de la trayectoria. Esta técnica se desarrolla aplicando una disminución relativa en la energía potencial superficial de la proteína, denominada λ , respetando el perfil energético de los valles (**Figura 2.17**).

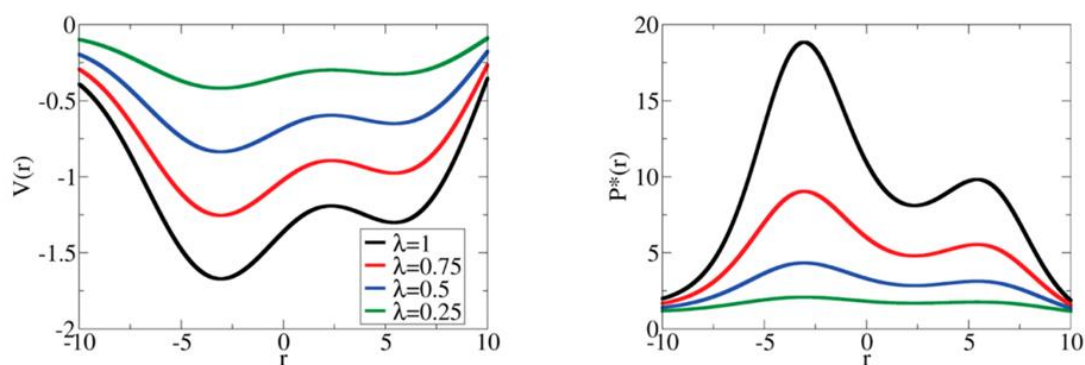


Figura 2.17. Imagen adaptada de Sinko, W. *et al.*¹⁸. Ilustración esquemática de una dinámica molecular escalada. A la izquierda está representado el potencial electrostático superficial (PES) molecular $V(r)$, que puede ser escalado mediante un factor λ para producir diferentes $V^*(r)$ (la línea negra muestra el PES original $\lambda=1$, rojo $\lambda=0.75$, azul $\lambda=0.5$ y verde $\lambda=0.25$). A la derecha se representan las correspondientes funciones de distribución de la probabilidad. Las funciones de probabilidad para todos los valores de λ obtenidos son equivalentes a las poblaciones derivadas del PES original

Este tipo de muestreo acelerado es muy útil para explorar diferentes conformaciones de proteínas en sus valles energéticos, por lo que para analizar el reordenamiento de la H10 puede ser una aproximación interesante. SMD permite realizar una gran exploración conformacional en poco tiempo de cálculo, por lo que en una simulación de 100 ns la búsqueda conformacional será mayor que en el mismo tiempo de una simulación convencional o acelerada. El modelo de partida fue la estructura de dNCS-1 sin ligando (PDB ID 4by4)¹³. La estructura se preparó utilizando Protein Preparation Wizard³⁰ implementado en Maestro³¹, añadiendo los átomos de hidrógeno, creando órdenes de enlace cero para los iones de calcio (los cuales fueron mantenidos coordinados en la estructura), las moléculas de agua fueron eliminadas y se modelaron los residuos no resueltos en la estructura (135 al 141) utilizando Prime. Los residuos

de la proteína fueron ionizados a pH = 7.6, llevándose a cabo un refinamiento de los enlaces de hidrógeno y una minimización de la proteína utilizando el campo de fuerzas de OPLS2005³².

Una vez preparada la proteína, se llevaron a cabo los experimentos de dinámica molecular escalada. Para ello se empleó Amber14³³, utilizando el campo de fuerzas AMBER14SB³⁴ para la proteína, con un modelo de TIP3P para las moléculas de agua³⁵. Los tres iones de calcio se mantuvieron en la simulación, añadiéndose átomos de sodio como contraiones hasta la neutralización del sistema. Se añadieron las moléculas de agua en una caja periódica con una distancia de 10 Å con los átomos de soluto. Las interacciones de largo alcance se calcularon utilizando Particle mesh Ewald³⁶. Las interacciones de van der Waals se truncaron a 10 Å con un modelo continuo aplicando corrección de largo alcance para la energía y presión del sistema. Los enlaces de hidrógeno se restringieron aplicando SHAKE³⁷. Las simulaciones se realizaron a 300 K utilizando el termostato de Langevin. El baróstato de Berendsen³⁸ se usó para ajustar la densidad del sistema a presión constante de 1 bar, equilibrando el sistema a lo largo de 1 ns. Finalmente, las cuatro simulaciones de 100 ns de dinámica molecular escalada se llevaron a cabo, utilizando como valores para λ respectivamente 0.9, 0.8, 0.7 y 0.6 a presión y temperatura constantes. Las energías y coordenadas se grabaron cada 1 ps. Las simulaciones se llevaron a cabo en una estación de trabajo Asus 1151 h170LVX-GTX-980Ti con procesadores Intel Core i7-6500K (12 M Cache, 3.40 GHz) y 16 GB DDR4 2133 MHz RAM. La estación de trabajo tiene una GPU disponible para los cálculos en Amber. La simulación fue visualizada con VMD³⁹ y analizada utilizando el módulo cpptraj⁴⁰.

5.2 Estudio del mecanismo de acción de FD44 y FD16

Para obtener la pose inicial de la que partir en los estudios de dinámica molecular de los compuestos **FD44** y **FD16**, se realizaron estudios de *docking* utilizando Glide²⁹ con precisión XP. La estructura *holo* de dNCS-1 (PDB ID 5aan¹⁷) se preparó usando Protein Preparation Wizard siguiendo el protocolo previamente descrito. La malla para los cálculos de *docking* se centró en el punto medio formado por los residuos de Trp30, Tyr52, Phe55, Th92 y Leu182, equivalente al punto medio de la cavidad hidrofóbica de dNCS-1. Para este estudio se usó el campo de fuerzas OPLS2005, obteniendo un máximo de 50 poses. La mejor pose obtenida de este estudio se utilizó como punto inicial para los estudios de dinámica molecular. La geometría de los ligandos **FD44** y **FD16** se optimizó con mecánica cuántica, utilizando el conjunto de bases HF-631* y calculando sus cargas RESP, con el programa Jaguar⁴¹. Una vez calculadas las cargas y geometrías optimizadas para ambos ligandos, los sistemas para la simulación se prepararon utilizando Desmond⁴². Los complejos ligando-proteína se solvataron en una caja ortorrómbica con moléculas de agua de modelo TIP4P, neutralizando el sistema con iones de sodio. Se llevó a cabo una simulación a presión y temperaturas constantes, a temperatura de 300

K con el termostato Noose-Hover, el baróstato Martyna-Tobias-Klein a 1.01 bar, con un periodo de relajación de 2 ps, un radio de 9 Å para las interacciones de corto alcance y Particle mesh Ewald para las interacciones de largo alcance. El protocolo estándar de Desmond se utilizó para equilibrar el sistema, llevándose a cabo simulaciones de 20 ns. Las simulaciones se analizaron mediante las herramientas *Simulation Quality Analysis* y *Simulation Event Analysis* de Maestro. Las interacciones ligando-diana fueron identificadas mediante la herramienta *Simulation Interaction Diagram*.

Se realizó un cálculo de energía libre del sistema (MM-GBSA) utilizando el programa Prime, para poder obtener un análisis más detallado de la contribución de los residuos clave en la unión. Estos cálculos se realizaron utilizando el modelo de solvatación continua VSGB2.0. Los cálculos se realizaron sobre los últimos 5 ns de cada una de las simulaciones, procesándose 1042 estructuras por cada trayectoria.

5.3 Ensayo de diferencia en la transferencia de saturación (STD-RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de STD y NOESY transferido (tr-NOESY) fueron realizados en un instrumento Bruker Advance a 600 MHz (frecuencia de ^1H) equipado con una criosonda. Para los experimentos de STD-RMN, la frecuencia de saturación se fijó a -0.5 ppm (región alifática) durante 2 segundos. El espectro STD-RMN fue recogido con un filtro *spin lock* corto para minimizar el ruido base de las señales de la proteína. Para los experimentos tr-NOESY se usó un tiempo de mezclado de 200 ms. La disolución *stock* de **FD44** se realizó en DMSO- d_6 , mientras que las muestras de *d*NCS-1 fueron preparadas en solución tampón PBS deuterado a pH 5.9 (125 mM NaCl, 0.5 mM CaCl_2 , 10 mM Na_2HPO_4 y 1.7 mM KH_2PO_4).

Los espectros de STD-RMN y tr-NOESY fueron realizados en una muestra que contenía una concentración 10 μM *d*NCS-1 y 200 μM **FD44** (ratio molar 1:20) a 298 K. Por otro lado, los experimentos de RMN estándar (^1H monodimensional y TOCSY con tiempo de mezclado 30 ms) fueron adquiridos en un imán Bruker 500 MHz en una muestra de 200 μM de **FD44** en una solución tampón PBS pH 5.9 y 5% de DMSO- d_6 .

5.4 Identificación de nuevos inhibidores de la interacción NCS-1/Ric8a

El protocolo de cribado virtual se compuso de varias etapas. En el primer paso, la quimioteca MBC^{28} se filtró con el objetivo de obtener solamente los compuestos con propiedades fisicoquímicas similares a la fenotiazina **FD44**. Se tuvieron en cuenta cinco filtros: *Stars* ≤ 2 , peso molecular entre 300-400 Da, número de enlaces rotables entre 1 y 6, grupos dadores de enlaces de hidrógeno entre 1 y 3 y grupos aceptores de enlaces de hidrógeno entre 4 y 6. El valor Stars es una propiedad interna del programa QikProp (utilizado para caracterizar

las propiedades de los compuestos de la quimioteca), que muestra el número de descriptores que se alejan en más 95% de los valores para fármacos comercializados. Un número de Stars alto sugiere que una molécula tiene menos propiedades tipo fármaco que una molécula con pocos Stars.

La segunda y tercera etapas del cribado virtual fueron cálculos de *docking* utilizando Glide²⁹ con precisión estándar (SP) seguido de un *docking* con precisión extra (XP). Para realizar los cálculos de *docking* se preparó la estructura de *dNCS-1 holo* (PDB ID 5aan¹⁷) siguiendo el procedimiento previamente descrito. La malla fue centrada en el punto medio formado por los residuos de Trp30, Tyr52, Phe55, Thr92 y Leu182, como en los estudios previos para los compuestos **FD44** y **FD16**. Se usó el campo de fuerzas OPLS2005, buscando un número máximo de poses por ligando de diez. En el *docking* con precisión estándar (SP Glide), se obtuvieron 1683 poses para 175 compuestos. El 60% de los compuestos mejor clasificados se seleccionaron para un segundo cálculo de *docking* con mayor precisión (XP Glide). En este caso se obtuvieron 1012 poses con un valor de puntuación en rango entre -8.9 kcal/mol y -4.2 kcal/mol. El último paso fue la selección de los compuestos cuyas poses pudieran interactuar con los residuos de Thr92, Tyr52 o con ambos a la vez, cuyas energías de unión fueran más favorables.

5.5 Ensayo de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y western blot

Los ensayos de co-inmunoprecipitación se llevaron, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente¹⁷. En resumen, las proteínas *hNCS-1* y Ric8a marcado-V5 se co-transfectaron en células HEK293. Un día después de la transfección, las células se trataron con los compuestos seleccionados en el cribado virtual a una concentración 20 μM diluidos en DMSO o solamente con DMSO como control. Tras 24 horas, las células transfectadas incubadas se lisaron. El complejo *hNCS-1/Ric8a* se co-inmunoprecipitó usando un anticuerpo contra *hNCS-1*. Durante la co-inmunoprecipitación todos los tampones contenían los compuestos ensayados a la concentración indicada. Se usaron procedimientos estándar para SDS-PAGE y transferencia de proteínas a membranas. Las proteínas Ric8a y *hNCS-1* se identificaron por *western blot*, usando anticuerpos contra V5-marcado y *hNCS-1* respectivamente¹⁷.

5.6 Experimentos de emisión de fluorescencia

Se midió la emisión de fluorescencia de triptófano (Trp) de *hNCS-1* y *dNCS-1* a una concentración de proteína de 0.9 μM y se registró la unión de los compuestos seleccionados mediante la adición de cantidades crecientes de **IGS-1.76** (0 a 9 μM) e **IGS-3.31** (0 a 72 μM) a 5°C, utilizando un espectrofluorímetro Jobin Yvon Fluoromax4 equipado con un termostato Peltier. La longitud de onda de excitación se ajustó a 295 nm y la emisión de fluorescencia se

registró entre 300-400 nm. Después de verificar que ambos compuestos no emitían en el rango de interés, el ensayo se realizó en un tampón Tris 30 mM, pH 7.9, NaCl 125 mM, CaCl 0.5 mM y EtOH al 14% o DMSO al 3%, dependiendo del disolvente que se usó para preparar las disoluciones madre de IGS-1.76 e IGS-3.31. Dado que la afinidad reportada para **FD44** se midió con la variante *d*NCS-1 y en presencia de EtOH¹⁷, se midió la afinidad por **IGS-1.76** en esas condiciones, con el fin de comparar la K_d final. Además, la afinidad por *h*NCS-1 también se midió en presencia de EtOH. La disolución *stock* de IGS-3.31 tuvo que prepararse en DMSO, debido a su falta de solubilidad en EtOH. Por lo tanto, la afinidad de *h*NCS-1 para **IGS-1.76** también se midió en DMSO con el fin de comparar adecuadamente los resultados finales. Se realizaron dos experimentos independientes para cada condición. Las intensidades de fluorescencia se normalizaron para comparar las diferentes curvas y se representaron como $(I - D)/I_0$. I representa la emisión de fluorescencia observada a 345 nm (máximo de fluorescencia), I_0 es la emisión de fluorescencia observada de la proteína sin ningún ligando. La constante de disociación aparente, K_d , se obtuvo utilizando un modelo de estequiometría 1:1⁴³.

5.7 Cristalización, colección de datos de difracción y resolución estructural

La cristalización, colección de datos y resolución de la estructura cristalográfica del ligando **FD44** y del complejo *d*NCS-1/**IGS-1.76** se llevó a cabo en una colaboración con la Dra. María José Sánchez Barrena, del Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR-CSIC). Los cristales de **FD44** crecieron en las mismas gotas donde se cristalizó previamente el complejo *d*NCS-1/**FD44**¹⁷, debido al exceso de ligando añadido en el experimento. Para cristalizar el complejo *d*NCS-1/**IGS-1.76**, se usaron diferentes equipos: Molecular Dimensions, Qiagen, Hampton Research y Jena Bioscience. Para aumentar la concentración de ligando en la gota de cristalización y evitar la adición de DMSO o EtOH, usados para solubilizar **IGS-1.76**, se diseñó el siguiente protocolo: en primer lugar, se preparó una solución madre de **IGS-1.76** a una concentración 4.5 mM en EtOH. En segundo lugar, 0.5 μ L de esta disolución se dispensaron gota a gota en una bandeja de cristalización dejándose secar para crear una película delgada del ligando. Como tercer paso, se añadieron 500 nL de solución precipitante sobre la película, seguido de un volumen igual de proteína, previamente dializada en agua Milli-Q y se concentró a 10 mg/ml^{13, 17}. Los cristales del complejo *d*NCS-1/**IGS-1.76** formados crecieron a partir de un sistema de separación de fases usando la solución ProPlex A11 (Hepes 0.1 M, pH 7.5 y 25% p/v PEG2000 MME), siendo esta la misma condición a partir de la cuál se obtuvieron los cristales del complejo *d*NCS-1/**FD44**. Los cristales de ligando **IGS-1.76** crecieron en la solución G6 JCSG ++ (0.2 M de malonato de sodio pH 7.0, 20% de PEG3350) siguiendo el mismo procedimiento.

Todos los cristales se crioprotegieron en su correspondiente solución de cristalización que contenía un 20% de glicerol y se congelaron rápidamente en N₂ líquido. Los datos de difracción del ligando **FD44** y el complejo *d*NCS-1/**IGS-1.76** se recogieron a 100 K en la fuente de radiación de sincrotrón ALBA (línea BL13) y se procesaron con XDS⁴⁴. Los cristales de IGS-1.76 se recogieron a 120 K, en un difractor BRUKER con fuente de Microfocus Incoatec (ImS 1.0 Cu) con un detector PHOTON. Los datos se procesaron con el paquete Apex2. Las estructuras cristalinas de **FD44** e **IGS-1.76** se resolvieron mediante métodos directos, utilizando el software SIR2004⁴⁵ y SHELXS⁴⁶ respectivamente, y el refinamiento se realizó con SHELXL⁴⁷. La estructura del complejo *d*NCS-1/**IGS-1.76** se resolvió mediante reemplazo molecular con Phaser⁴⁸ y utilizando como modelo la estructura de proteína libre de ligando (PDB ID 4by4¹³). El refinamiento se realizó con Phenix⁴⁹, así como el cálculo de los mapas OMIT de Polder⁵⁰. Los detalles sobre el procesamiento y refinamiento de datos se muestran en la publicación de Roca *et al.* REFERENCIA. El análisis de las estructuras se realizó con los programas CCP4⁵¹ y Cambridge Structural Database (CSD²⁰). Las imágenes se realizaron con los programas Pymol⁵² y Mercury⁵³. Las coordenadas atómicas y los factores de estructura del complejo *d*NCS-1/**IGS-1.76** se depositaron en el Protein Data Bank (www.pdb.org) con PDB ID 6epa, mientras que las coordenadas de los ligandos **FD44** e **IGS-1.76** se depositaron en el CSD (www.ccdc.cam.ac.uk/structures), con los números 1585781 y 1585782, respectivamente.

6. REFERENCIAS

1. Verkerk, A. J.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J. S.; Fu, Y. H.; Kuhl, D. P.; Pizzuti, A.; Reiner, O.; Richards, S.; Victoria, M. F.; Zhang, F. P.; et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **1991**, 65, 905-14.
2. Hunter, J.; Rivero-Arias, O.; Angelov, A.; Kim, E.; Fotheringham, I.; Leal, J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A* **2014**, 164A, 1648-58.
3. Kidd, S. A.; Lachiewicz, A.; Barbouth, D.; Blitz, R. K.; Delahunty, C.; McBrien, D.; Visootsak, J.; Berry-Kravis, E. Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. *Pediatrics* **2014**, 134, 995-1005.
4. Busquets-Garcia, A.; Maldonado, R.; Ozaita, A. New insights into the molecular pathophysiology of fragile X syndrome and therapeutic perspectives from the animal model. *Int J Biochem Cell Biol* **2014**, 53, 121-6.
5. D'Antoni, S.; Spatuzza, M.; Bonaccorso, C. M.; Musumeci, S. A.; Ciranna, L.; Nicoletti, F.; Huber, K. M.; Catania, M. V. Dysregulation of group-I metabotropic glutamate (mGlu) receptor mediated signalling in disorders associated with Intellectual Disability and Autism. *Neurosci Biobehav Rev* **2014**, 46 Pt 2, 228-41.
6. Bear, M. F.; Huber, K. M.; Warren, S. T. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* **2004**, 27, 370-7.
7. Gross, C.; Hoffmann, A.; Bassell, G. J.; Berry-Kravis, E. M. Therapeutic Strategies in Fragile X Syndrome: From Bench to Bedside and Back. *Neurotherapeutics* **2015**, 12, 584-608.
8. Mines, M. A.; Jope, R. S. Glycogen synthase kinase-3: a promising therapeutic target for fragile x syndrome. *Front Mol Neurosci* **2011**, 4, 35.
9. Gross, C.; Nakamoto, M.; Yao, X.; Chan, C. B.; Yim, S. Y.; Ye, K.; Warren, S. T.; Bassell, G. J. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. *J Neurosci* **2010**, 30, 10624-38.
10. Wang, X.; Snape, M.; Klann, E.; Stone, J. G.; Singh, A.; Petersen, R. B.; Castellani, R. J.; Casadesus, G.; Smith, M. A.; Zhu, X. Activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the behavioral deficit of fragile x-syndrome. *J Neurochem* **2012**, 121, 672-9.
11. Dason, J. S.; Romero-Pozuelo, J.; Atwood, H. L.; Ferrus, A. Multiple roles for frequenin/NCS-1 in synaptic function and development. *Mol Neurobiol* **2012**, 45, 388-402.
12. Burgoyne, R. D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat Rev Neurosci* **2007**, 8, 182-93.
13. Romero-Pozuelo, J.; Dason, J. S.; Mansilla, A.; Banos-Mateos, S.; Sardina, J. L.; Chaves-Sanjuan, A.; Jurado-Gomez, J.; Santana, E.; Atwood, H. L.; Hernandez-Hernandez, A.; Sanchez-Barrena, M. J.; Ferrus, A. The guanine-exchange factor Ric8a binds to the Ca(2)(+) sensor NCS-1 to regulate synapse number and neurotransmitter release. *J Cell Sci* **2014**, 127, 4246-59.
14. Sun, M. K.; Hongpaisan, J.; Alkon, D. L. Rescue of Synaptic Phenotypes and Spatial Memory in Young Fragile X Mice. *J Pharmacol Exp Ther* **2016**, 357, 300-10.
15. Hwang, H.; Vreven, T.; Janin, J.; Weng, Z. Protein-protein docking benchmark version 4.0. *Proteins* **2010**, 78, 3111-4.
16. Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chem Biol* **2014**, 21, 1102-14.
17. Mansilla, A.; Chaves-Sanjuan, A.; Campillo, N. E.; Semelidou, O.; Martinez-Gonzalez, L.; Infantes, L.; Gonzalez-Rubio, J. M.; Gil, C.; Conde, S.; Skoulakis, E. M.; Ferrus, A.; Martinez, A.; Sanchez-Barrena, M. J. Interference of the complex between NCS-1 and Ric8a with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, 114, E999-E1008.
18. Sinko, W.; Miao, Y.; de Oliveira, C. A.; McCammon, J. A. Population based reweighting of scaled molecular dynamics. *J Phys Chem B* **2013**, 117, 12759-68.
19. Sanchez-Barrena, M. J.; Fujii, H.; Angulo, I.; Martinez-Ripoll, M.; Zhu, J. K.; Albert, A. The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Mol Cell* **2007**, 26, 427-35.
20. Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater* **2016**, 72, 171-9.

21. Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 69-82.
22. Fronza, G.; Mondelli, R.; Scapini, G.; Ronsisvalle, G.; Vittorio, F. ¹³C NMR of N-heterocycles. Conformation of phenothiazines and 2,3-diazaphenothiazines. *Journal of Magnetic Resonance* **1969**, *23*, 437-454.
23. Mayer, M.; Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 1784-1788.
24. Mayer, M.; Meyer, B. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6108-6117.
25. Balaram, P.; Bothner-By, A. A.; Dadok, J. Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4015-4017.
26. Boulet, M.; Marier, J. R. Precipitation of calcium phosphates from solutions at near physiological concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1961**, *93*, 157-165.
27. Unione, L.; Galante, S.; Díaz, D.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. NMR and molecular recognition. The application of ligand-based NMR methods to monitor molecular interactions. *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 1280-1289.
28. Sebastian-Perez, V.; Roca, C.; Awale, M.; Reymond, J. L.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. Medicinal and Biological Chemistry (MBC) Library: An Efficient Source of New Hits. *J Chem Inf Model* **2017**, *57*, 2143-2151.
29. Schrödinger Release 2015-4: Glide, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
30. Schrödinger Release 2015-4: Schrödinger Suite 2015-4 Protein Preparation Wizard; Epik S, L., New York, NY, 2015; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
31. Schrödinger Release 2015-4: Maestro S, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
32. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225-11236.
33. Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, I. T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Gusarov, S.; Homeyer, N.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kolossváry, I.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K. M.; Paesani, F.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Salomon-Ferrer, R.; Seabra, G.; Simmerling, C. L.; Wang, S.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Kollman, P. A. *AMBER 14*, University of California, San Francisco, 2014.
34. Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* **2015**, *11*, 3696-713.
35. Jorgensen, W. L.; Chandrasekar, J.; Madura, J.; Impey, R.; Klein, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*. **1983**, *79*, 926-935.
36. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 10089.
37. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*. **1977**, *23*, 327-341.
38. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, *81*, 3684.
39. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**, *14*, 33-8, 27-8.
40. Roe, D. R.; Cheatham, T. E., 3rd. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 3084-95.
41. Schrödinger Release 2015-4: Jaguar, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
42. Schrödinger Release 2015-4: Desmond Molecular Dynamics System, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
43. Butterfield, S. M.; Waters, M. L. A designed beta-hairpin peptide for molecular recognition of ATP in water. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 9580-1.
44. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 125-32.
45. Burla, M. C.; Caliandro, R.; Camalli, M.; Carrozzini, B.; Cascarano, G. L.; De Caro, L.; Giacovazzo, C.; Polidori, G.; Spagna, R. SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement. *Journal of Applied Crystallography* **2005**, *38*, 381-388.

46. Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* **2008**, 64, 112-22.
47. Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr C Struct Chem* **2015**, 71, 3-8.
48. McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **2007**, 40, 658-674.
49. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, 66, 213-21.
50. Liebschner, D.; Afonine, P. V.; Moriarty, N. W.; Poon, B. K.; Sobolev, O. V.; Terwilliger, T. C.; Adams, P. D. Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2017**, 73, 148-157.
51. Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2011**, 67, 235-42.
52. The PyMOL Molecular Graphics System, V., Schrödinger L. L. C. 2013.
53. Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P. A. Mercury CSD 2.0 - new features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography* **2008**, 41, 466-470.

CAPÍTULO 3

CRIBADO VIRTUAL EN LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE JNK3

*“No hay ningún viento
favorable para el
que no sabe a qué
puerto se dirige”
Arthur Schopenhauer*

CAPITULO 3. CRIBADO VIRTUAL EN LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE JNK3

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha introducido previamente a lo largo de esta tesis, las enfermedades neurodegenerativas son multifactoriales, es decir, cursan con un conjunto de procesos diferentes que desembocan en la muerte de células neuronales. El origen de estos procesos puede ser conocido, como en el caso de atrofia muscular espinal (AME) debido a mutaciones genéticas, o incierto como en patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Este conjunto de sucesos celulares van desde el plegamiento erróneo de proteínas, la agregación de proteínas y la formación de depósitos, fallos en el funcionamiento de los procesos de autofagia, estrés mitocondrial, estrés oxidativo, errores en las vías de degradación de proteínas y/o neuroinflamación (**Figura 3.1**).

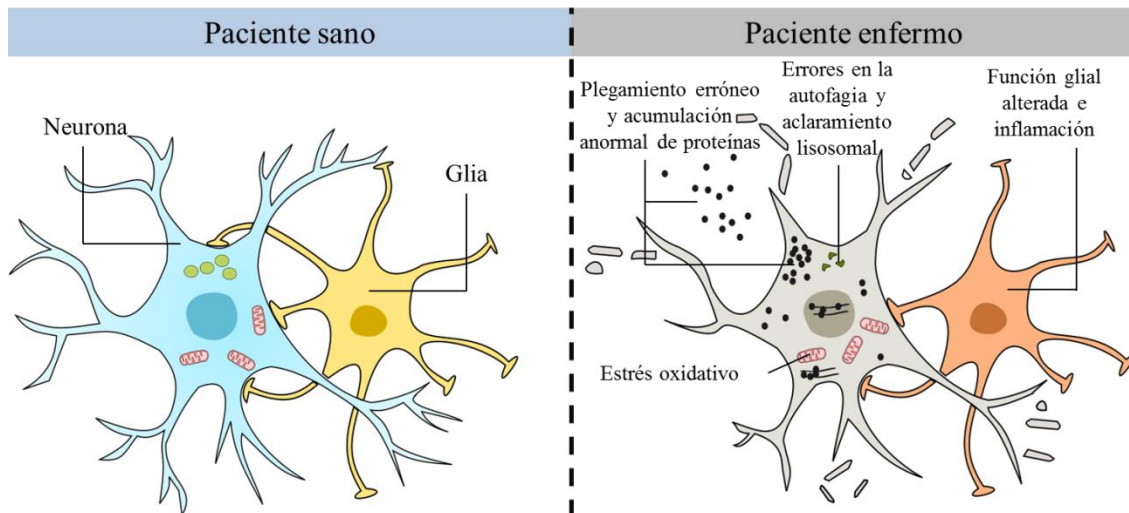


Figura 3.1. Esquema de los procesos celulares anómalos que suceden en las enfermedades neurodegenerativas. A la izquierda se observan una célula neuronal y glial normales. A la derecha se observan los cambios morfológicos debidos al plegamiento erróneo de proteínas y su acumulación anormal, defectos en los mecanismos de autofagia, estrés oxidativo y neuroinflamación.

Existen un gran número de evidencias que muestra una muerte celular aberrante en muchas enfermedades neurodegenerativas, identificándose algunas de las dianas involucradas en estos sucesos, apareciendo la posibilidad de que algún fármaco pueda detener la muerte celular anormal, evitando así una mayor neurodegeneración y retrasando la progresión de estas enfermedades. Muchos de los componentes de las cascadas de señalización de la muerte celular han sido identificados. Citoquinas y otras señales de estrés celular actúan al nivel de receptores en la superficie celular, activando cascadas de señalización intracelulares que convergen en la activación de las caspasas 3, 6 y 7, y consecuentemente, conduciendo a la muerte celular. Se piensa que existe un equilibrio entre la señalización positiva para la supervivencia celular y la señalización negativa para la muerte celular, que es la que determina si las células viven o mueren. Muchas de las vías de señalización involucradas en estos procesos están controladas mediante la fosforilación y transcripción. La transcripción de genes está controlada por conjuntos de factores de transcripción, que están a su vez regulados por proteínas quinasas. Una de las familias de proteínas quinasas que regulan factores de transcripción relacionados con la muerte celular son las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK).

Las MAPK son una familia de proteínas quinasas que fosforilan residuos de serina y treonina, que juegan un papel crítico en la transducción de múltiples señales de la superficie celular al núcleo en todas las especies eucariotas. Los miembros de la familia MAPK están englobados en las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) y las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs). Esta última subfamilia incluye tanto las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs) y las quinasas de p38, proteínas con funciones muy importantes a nivel de apoptosis y crecimiento celular. Todos los miembros de la familia de las MAPK son las

proteínas quinasas terminales de una cascada de tres escalones en los que las quinasas son sucesivamente fosforiladas por el escalón superior (**Figura 3.2**).

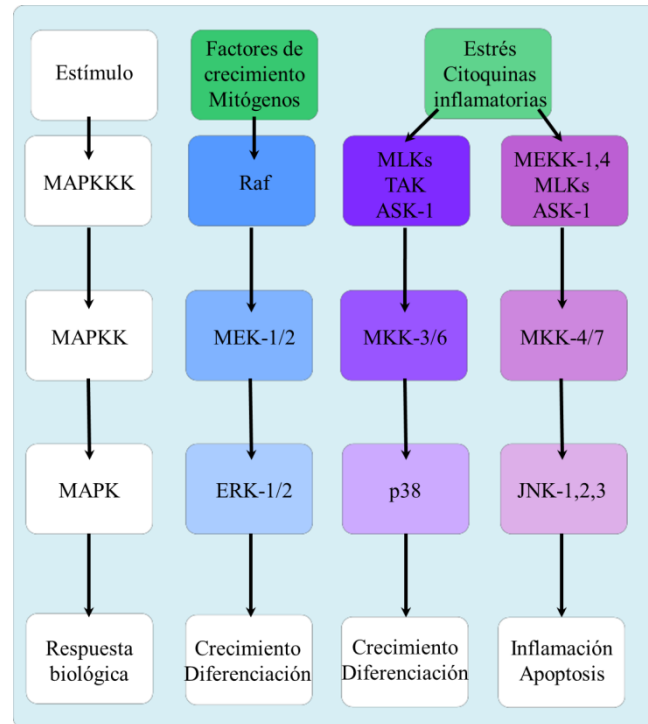


Figura 3.2. Esquema de las vías de señalización de tres familias de MAPKs: ERK, p38 y JNK.

Las MAPKs son fosforiladas, en residuos de tirosina y/o treonina en el motivo Thr-X-Tyr presente en el *loop* de activación del dominio quinasa, mediante los miembros de la familia MAPK quinasa (MAPKK). Estos, a su vez, se encuentran regulados mediante la fosforilación en residuos de serina y treonina, proceso que llevan a cabo MAPKK quinasas (MAPKKK), que incluyen Raf, ASK-1 y los miembros de la familia de las quinasas de linaje mixto (MLKs).

Una de las familias de MAPKs más estudiadas ha sido la familia JNK. Esta familia de MAPKs, se encuentra codificada por tres genes en humanos (*JNK1*, *JNK2* y *JNK3*) y diez isoformas que resultan de los diferentes empalmes de estos genes. Mientras JNK1 y JNK2 muestran una distribución variada en los tejidos, JNK3 se encuentra localizada fundamentalmente en el sistema nervioso central (SNC), aunque también se ha encontrado en tejidos de corazón y testículos.

La activación de JNK3 ha mostrado ser un punto clave como desencadenante de la apoptosis y patogénesis en varias enfermedades neurodegenerativas¹. En el cerebro adulto, la expresión de JNK3 se encuentra, principalmente, en las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA4 y subículo del hipocampo. Estas áreas se encuentran afectadas en enfermedades neurodegenerativas como la EA². Además también se ha podido comprobar que la apoptosis inducida por el péptido A β en neuronas corticales conlleva la activación de JNK y la

fosforilación de c-Jun³ y que en neuronas corticales deficientes de JNK-3, se muestra un menor porcentaje de muerte celular al inducir la apoptosis mediante el péptido A β ⁴. También se ha comprobado, en modelos animales, que JNK se co-localiza, tanto en los depósitos de β amiloide⁵, como en los ovillos de Tau, mostrando una mayor activación en cerebros con EA que en cerebros sanos⁶. Estos estudios sugieren un papel importante, tanto en el estrés causado por el péptido A β como en la hiperfosforilación de Tau en la EA.

Por otro lado, diferentes investigaciones han relacionado JNK3 con la enfermedad de Parkinson. Experimentos de inmunohistoquímica en cerebros de EP han mostrado una asociación entre los depósitos de α -sinucleína y JNK activada⁷, mientras que la fosforilación de c-Jun se mostró aumentada al comparar células dopaminérgicas de pacientes con EP (*post mortem*) frente a células no dopaminérgicas⁸. Diferentes estudios *in vitro* en células humanas e *in vivo* en modelos de EP de ratón han mostrado que la cascada de señalización de JNK se encuentra activada en EP, estando hiperactivada la MAPK quinasa MKK4⁹, y que la inhibición de JNK mediante el compuesto CEP1347 es capaz de antagonizar la apoptosis neuronal, la degeneración de neuritas y el estrés oxidativo inducido por dopamina¹⁰.

Otra de las enfermedades que cursan con neurodegeneración en la que JNK ha mostrado desempeñar un papel importante es la atrofia muscular espinal (AME). La AME es una enfermedad genética causada por la delección del exón 7 en el gen *Survival Motor Neuron 1* (*SMN1*), lo que conlleva la producción de bajos niveles de proteína SMN funcional, produciendo la degeneración de las motoneuronas espinales. La proteína SMN es una proteína expresada ubicuamente, aunque no está clara la razón de la degeneración selectiva de las neuronas motoras de la médula espinal inferior¹¹. La degeneración de las neuronas motoras sugiere que los niveles bajos de proteína SMN no son capaces de mantener las funciones celulares esenciales necesarias para el mantenimiento y supervivencia neuronales. Los defectos en las funciones celulares, incluyendo la biogénesis de ARNm causada por bajos niveles de SMN, deberían resultar en una activación de las vías de señalización de estrés oxidativo que median la neurodegeneración en AME. Los mecanismos intracelulares desencadenados por los bajos niveles de proteína SMN y que causan neurodegeneración permanecen aún inciertos. Aun así, se han realizado ciertos progresos en la comprensión de las cascadas de señalización intracelular que se activan y causan la neurodegeneración en esta patología. Las rutas de señalización de JNK3 han mostrado estar activadas debido a los bajos niveles de SMN, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (en cultivos celulares de motoneuronas de médula espinal de pacientes con AME y en modelos de ratón AME)¹².

Teniendo en cuenta todo lo descrito hasta el momento, se ha podido comprobar que JNK3 es un enzima crucial en la iniciación y ejecución de los procesos de muerte neuronal, en

diferentes enfermedades neurodegenerativas. La inhibición de JNK3 en diversas patologías neurodegenerativas puede dar como resultado un tratamiento farmacológico efectivo que evite la neurodegeneración y muerte neuronal.

Las diversas funciones que juega JNK3 en el SNC y la dificultad de inhibir selectivamente JNK3 podrían conllevar efectos adversos. Para intentar solventar estos posibles problemas, una de las posibilidades es la modulación de la cascada de señalización de JNK3 a niveles superiores, como podría ser la inhibición de MAPKKs como MKK4-7 o la inhibición de MAPKKKs como MLK3, ASK1 o MEKK1. En esta cascada de señalización, la inhibición en niveles superiores puede conllevar un tratamiento más seguro y específico pudiendo así prevenir de los efectos no deseados de una inhibición directa de JNK3. Debido a que varias MAPKKKs se encuentran activando esta vía de señalización, la inhibición selectiva de una MAPKKK patológicamente activada puede normalizar la señalización, sin que la vía de señalización quede totalmente inhibida y afuncional, y por lo tanto normalizando el comportamiento celular anómalo.

Una de las MAPKKKs con mayor potencial como diana terapéutica es la proteína quinasa de linaje mixto 3 (MLK3). Este enzima, también conocido como MAP3K11, es la más ampliamente expresada, estando presente en células neuronales¹³. MLK3 es un enzima compuesto por 847 residuos que se organizan en diferentes dominios: un dominio N-terminal de homología Src3 (SH3), que va seguido del dominio quinasa, una región de cremallera de leucina y el motivo de unión interactivo Cdc42/Rac (CRIB). Actualmente, el dominio SH3 ha sido resuelto mediante cristalografía de rayos X (PDB ID 5k26, 5k28), mientras que aún no se ha resuelto la estructura del dominio quinasa de MLK3. A nivel celular, MLK3 es activada por estrés, especies de oxígeno reactivas y factor de necrosis tumoral α (TNF α)^{14, 15}. A nivel molecular, es activada por Cdc42 y Rac, que interactúan con MLK3, promoviendo su dimerización por la región de cremallera de leucinas, resultando en una autofosforilación en los residuos de Thr277 y Ser281 (residuos presentes en el *loop* de activación) y activando el enzima (**Figura 3.3**)¹⁶. Además, se ha comprobado que MLK3 puede activarse tras la fosforilación mediada por GSK-3 β ¹⁷.

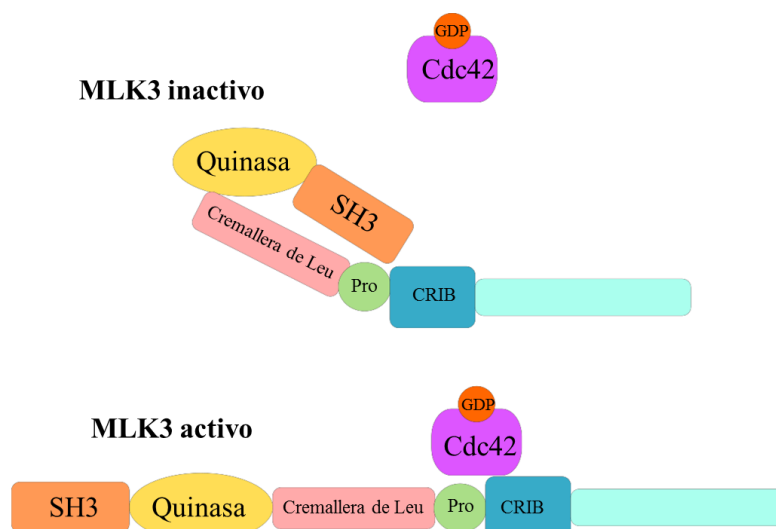


Figura 3.3. Esquema de la estructura de MLK3 con sus diferentes dominios: SH3, dominio quinasa, cremallera de leucinas, CRIB. En la parte superior se puede observar el mecanismo de autoinhibición de MLK3, mediado por el dominio SH3, que interacciona con una prolina adyacente al sitio catalítico del enzima. En la parte inferior se observa el mecanismo de activación de MLK3, mediado en este caso por Cdc42, que fosforila los residuos de Thr277 y Ser281, permitiendo la activación del dominio quinasa.

Previamente se han descrito algunos compuestos como inhibidores de MLK3: **CEP-1347** (MLK3 IC₅₀ 6 nM)¹⁸, **K252a** (MLK3 IC₅₀ 13 nM)¹⁹, **CEP-701** (MLK3 IC₅₀ 18 nM)²⁰, **CEP-11004** (MLK3 IC₅₀ 31 nM)²¹ y **URMC-099** (MLK3 IC₅₀ 14 nM)²² (**Figura 3.4**). Los primeros compuestos, desarrollados por la empresa Cephalon, han explorado ampliamente el esqueleto de indolocarbazol de Estaurosporina, un compuesto inhibidor de proteínas quinasas poco selectivo. El compuesto **URMC-099**, un derivado con esqueleto 7-azaindol, fue desarrollado por la empresa Califia Bio.

El compuesto **CEP-1347** ha sido utilizado como herramienta farmacológica, para explorar los efectos de la inhibición de MLK3 en algunas patologías que cursan con neurodegeneración, como la EP, o los desórdenes cognitivos asociados al virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), tanto en modelos celulares como animales²³. Ha mostrado buenos resultados impidiendo la muerte celular en modelos celulares y animales de EP, mostrando también efectos neuroprotectores en modelos animales de infección por VIH-1, revertiendo la activación de la microglía y restaurando la arquitectura sináptica²⁴. Desafortunadamente, este compuesto cayó en Fase clínica 2 como terapia para la EP por falta de eficacia²⁵. A pesar de ello, todos los resultados obtenidos han validado a MLK3 como una diana farmacológica muy interesante para el tratamiento de diferentes patologías neurodegenerativas, mostrando, por un lado, que es una diana capaz de ser modulada mediante moléculas tipo fármaco, como que su inhibición no causa efectos tóxicos en animales ni en humanos. La identificación de nuevas estructuras capaces de inhibir MLK3 de manera selectiva

podría aportar un posible tratamiento seguro para las patologías que cursen con neurodegeneración y neuroinflamación.

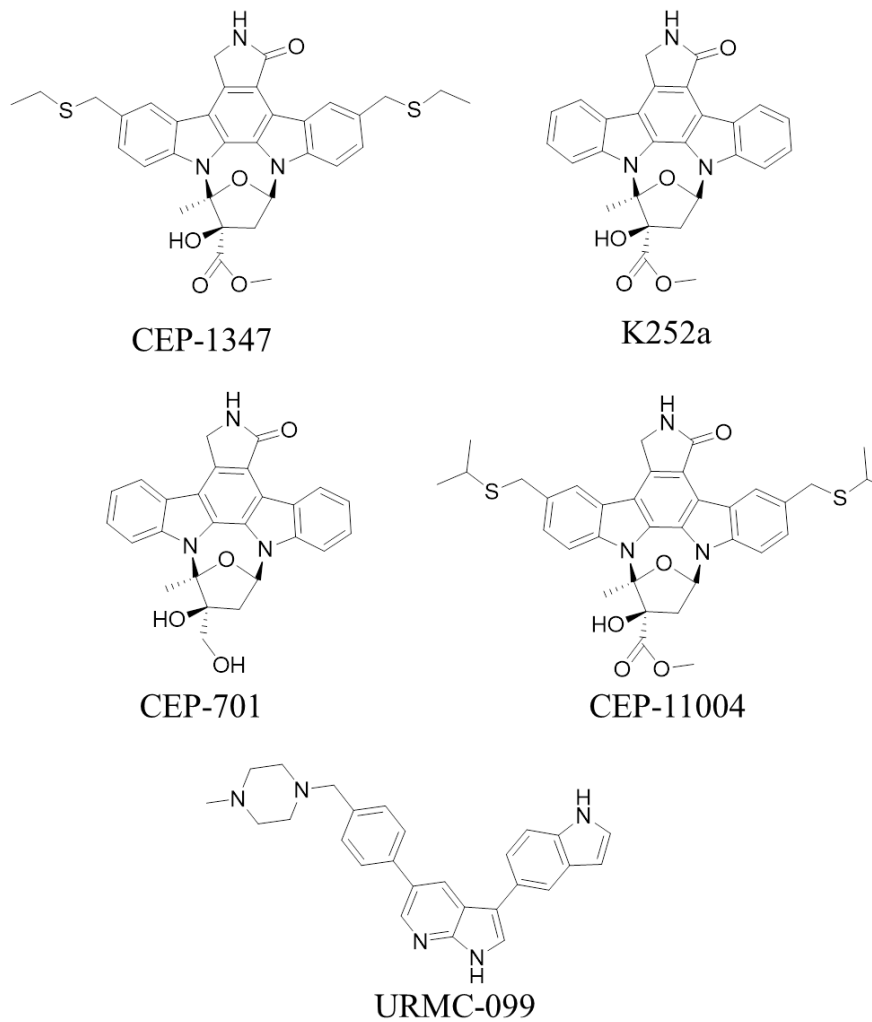


Figura 3.4. Estructuras de algunos de los compuestos descritos como inhibidores de MLK3.

2. OBJETIVOS

La quinasa de linaje mixto 3 (MLK3) ha sido identificada como una diana terapéutica involucrada en diversas patologías neurodegenerativas como EA, EP, EMA y patologías neuroinflamatorias como los desórdenes cognitivos asociados al VIH-1. La inhibición de MLK3 puede resultar un desafío interesante en la búsqueda de fármacos en el tratamiento de enfermedades que cursen con neuroinflamación y neurodegeneración. Actualmente, los únicos inhibidores descritos de MLK3 son compuestos derivados del esqueleto de indolocarbazol y del esqueleto de 7-azaindol, mostrando un interesante vacío químico que ocupar con nuevos compuestos. Por otro lado, teniendo en cuenta la ausencia de una estructura cristalográfica del dominio quinasa de MLK3, la búsqueda de inhibidores de MLK3 que compitan con ATP puede ser un reto doble.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, el objetivo fundamental de este capítulo es la identificación de inhibidores innovadores de MLK3.

Los objetivos específicos de este capítulo son:

- La obtención de un modelo tridimensional del dominio quinasa de MLK3.
- La identificación de nuevos inhibidores de MLK3 que posean esqueletos químicos variados mediante estrategias de cribado virtual.

3. RESULTADOS

3.1 Modelado y refinamiento

La identificación y descubrimiento de nuevos inhibidores de MLK3 mediante el uso de herramientas de modelado molecular tiene una primera aproximación compleja. Tanto las estrategias basadas en el ligando, como las estrategias basadas en la estructura de la proteína se encuentran deficientes de información. Por un lado, la presencia únicamente de dos familias químicas diversas de inhibidores de MLK3 hace difícil el abordaje mediante aproximaciones de QSAR o farmacóforo. Por otro lado, la ausencia de una estructura resuelta experimentalmente de MLK3 también complica la aproximación mediante técnicas de *docking* molecular.

En este capítulo se decidió llevar a cabo el desarrollo de un modelo tridimensional de MLK3 para abordar la identificación de nuevos inhibidores mediante estrategias basadas en la estructura de la diana. Un esquema del protocolo utilizado para ello se muestra en la **Figura 3.5**.

En primero lugar, para la realización del modelo por homología se realizó una búsqueda de proteínas homólogas con estructura tridimensional resuelta, encontrándose que la estructura del dominio quinasa de MLK1 se encontraba depositada en el PDB (PDBID: 3dtc²⁶; resolución 2.6Å). La estructura cristalográfica del dominio quinasa de MLK1 fue resuelta en complejo con

el inhibidor **CEP-6331 (Figura 3.6)**. Este compuesto es un inhibidor tanto de MLK1 (IC₅₀ 26nM) como de MLK3 (IC₅₀ 65nM)²⁶. El modo de unión de este compuesto en MLK1 se muestra en concordancia con el modo de unión “clásico” en el bolsillo de unión de ATP de proteínas quinasas, interaccionando mediante dos enlaces de hidrógeno con los átomos del esqueleto de la proteína, un enlace aceptor con el residuo de Ala223 y un enlace dador con el residuo de Glu221. Además, el inhibidor es capaz de interaccionar mediante un enlace de hidrógeno aceptor con el residuo de Arg203, un residuo que se ha mostrado clave para la interacción de otros inhibidores en estudios de modelado molecular²².

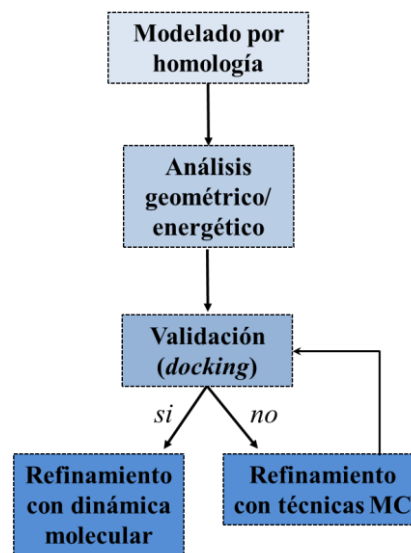


Figura 3.5. Esquema del protocolo de modelado y refinamiento estructural utilizado en este capítulo.

Una parte fundamental de todo procedimiento de modelado es la valoración de la precisión del modelo²⁸. La calidad del modelo se evalúa con la función de puntuación compuesta local QMEAN, que utiliza varios descriptores estadísticos expresados como potenciales de fuerza media: las características geométricas del modelo (distancias atómicas, ángulos de torsión, accesibilidad del solvente) se comparan con distribuciones estadísticas obtenidas a partir de experimentos estructurales. A cada residuo se le asigna una puntuación de fiabilidad entre 0 y 1, que trata de describir la similitud esperada con la estructura nativa. Los números más altos indican una mayor fiabilidad de los residuos. Además, las puntuaciones globales QMEAN se utilizan como indicadores para evaluar la calidad general del modelo. Las estimaciones globales de QMEAN se obtienen como un valor normalizado, Z-score, que relaciona los valores obtenidos con las puntuaciones calculadas a partir de un conjunto de estructuras obtenidas mediante difracción de rayos-X. Además de estos valores geométricos, los gráficos de Ramachandran se pueden utilizar también para medir la calidad de un modelo. El cálculo de los gráficos de Ramachandran, para las estructuras de MLK1 y el modelo obtenido de MLK3, se llevaron a cabo utilizando el servidor RAMPAGE²⁹ (**Figura 3.8**). Además, se llevaron a cabo los cálculos de diversos parámetros geométricos y energéticos de ambas estructuras, como Verify3D y QMEAN4 (**Tabla 3.1**). El conjunto de datos resultantes del análisis de ambas estructuras mostró que la estructura modelada cumplía con todos los requisitos geométricos y energéticos, incluso llegando a mejorar los valores presentes para la estructura de MLK1, confirmando la obtención de un modelo tridimensional del dominio quinasa de MLK3 que reúne buenas cualidades.

Tabla 3.1. Resultados del gráfico de Ramachandran. Número de residuos con ángulos favorables, permitidos y desfavorables de las estructuras de MLK1 y MLK3.

	MLK1 (PDBID 3dtc)	MLK3 (modelo)
Ramachandran		
Número de residuos en regiones favorables	216 (91.1%)	252 (96.6%)
Número de residuos en regiones permitidas	16 (6.8%)	6 (2.3%)
Número de residuos fuera de regiones permitidas	5 (2.1%)	3 (1.1%)
Verify3D		
% residuos con promedio de puntuación 3D-1D ≥ 0.2	94.69%	97.34%
QMEAN4		
Valores	-1.76	-1.31

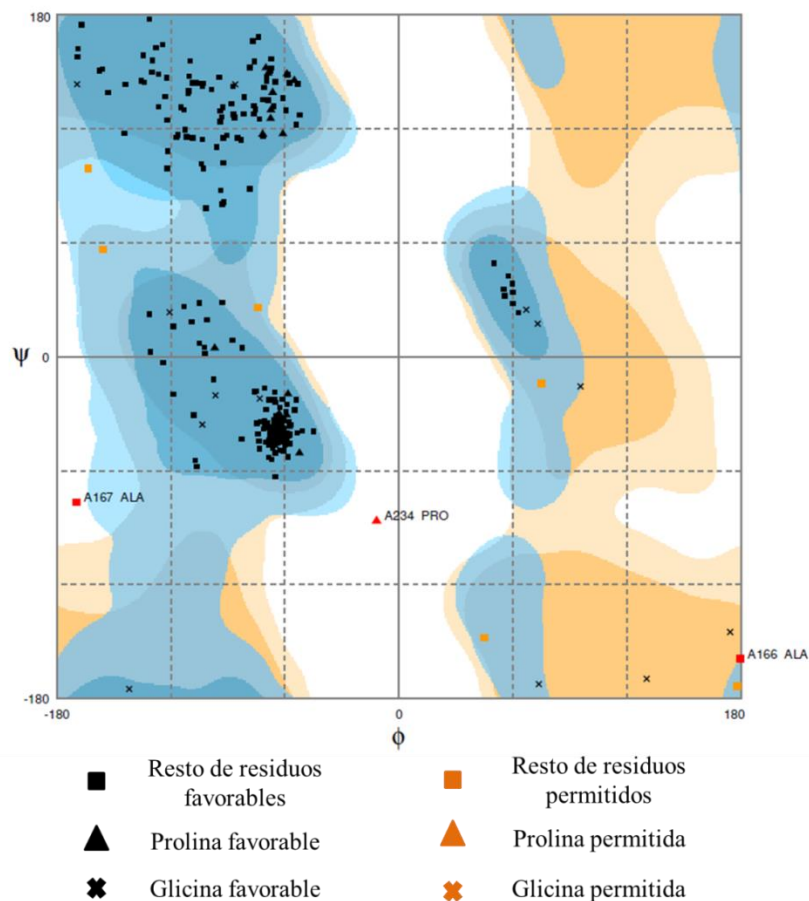


Figura 3.8. Gráfico de Ramachandran²⁹ del modelo de MLK3 obtenido a partir de SwissModel. Los residuos con valores de ángulos ψ y ϕ favorables, permitidos y desfavorables calculados muestran una mejor relación que los calculados para la estructura de MLK1 (PDB ID 3dtc)

Para validar el modelo como estructura sobre la que realizar estudios de cribado virtual, se realizó un estudio de *docking* utilizando para ello el compuesto **CEP-6331**, cristalizado en MLK1²⁶. Este compuesto es un inhibidor tanto de MLK1 como de MLK3 en el mismo orden de magnitud, por tanto el modo de unión en MLK3 debería ser muy similar al de MLK1 ya que los residuos con los que interacciona en el bolsillo de unión están todos conservados. Utilizando para ello el programa Glide, el modo de unión predicho por ambos programas fue inesperadamente diferente al presente en la estructura cristalográfica PDB ID 3dtc (**Figura 3.9**).

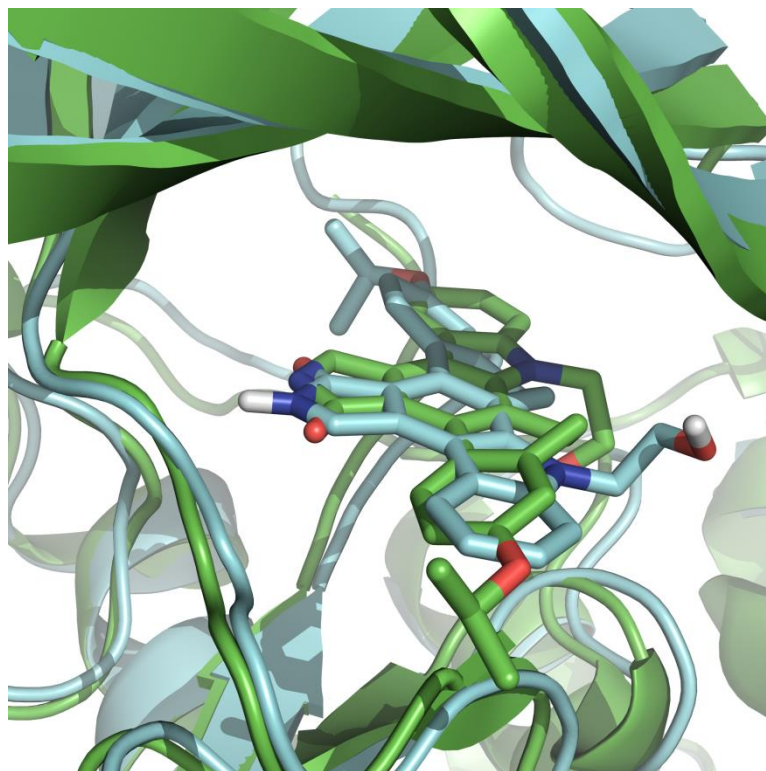


Figura 3.9. Superposición de la estructura cristalográfica de MLK1 PDB ID 3dtc (verde) y el resultado del *docking* del compuesto **CEP-6331** en el modelo de MLK3 (azul). El ligando invierte la posición del esqueleto heterocíclico, siendo incapaz de mantener el mismo modo de unión.

Se llevó a cabo un análisis de los residuos que pudieran tener alguna conformación diferente en nuestro modelo, y por lo tanto estuvieran influyendo en el resultado de los experimentos de *docking*. Se pudo observar que los residuos del bolsillo de unión de ATP mantenían conformaciones muy similares entre nuestro modelo y la estructura de MLK1, exceptuando el residuo de Arg203 (**Figura 3.10**). Este residuo tiene una gran importancia en la unión del ligando **CEP-6331**, como se ha comentado previamente²². Debido a su gran flexibilidad conformacional puede orientarse tanto hacia la cavidad, para favorecer la interacción con el ligando, como orientarse hacia el solvente. La orientación de este residuo parece ser fundamental para la unión adecuada del ligando **CEP-6331**.

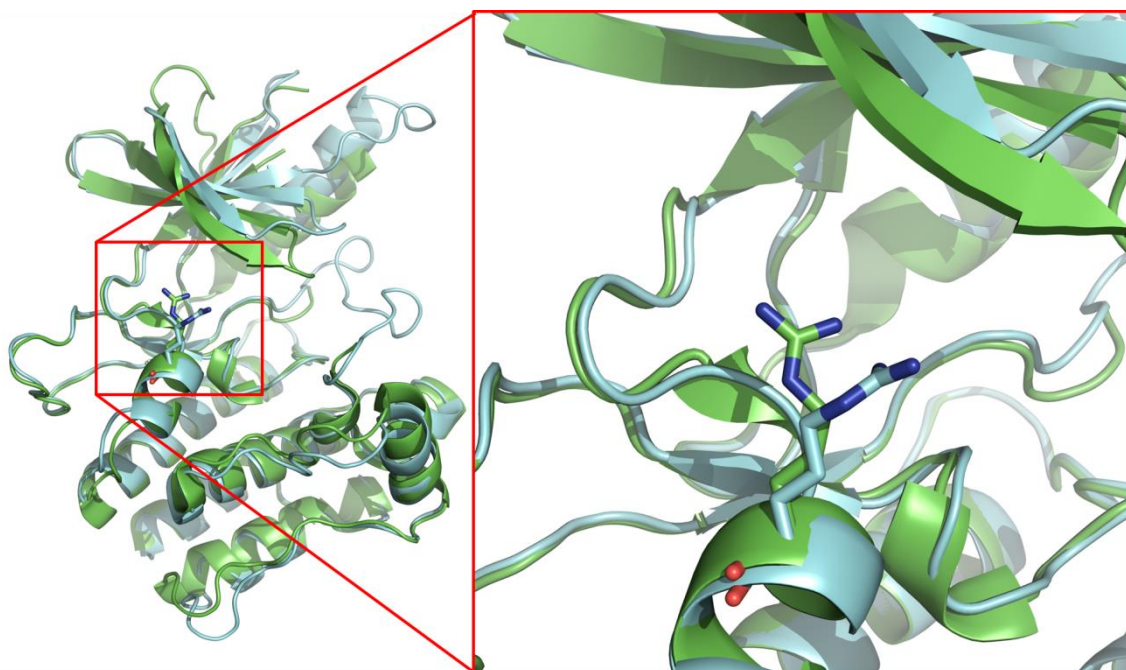


Figura 3.10. Superposición de MLK1 PDBID 3dtc (verde) y el modelo obtenido para MLK3 (azul). El residuo de Arg203 se orienta hacia la cavidad para interactuar con el ligando, mientras que en el modelo de MLK3 este residuo se orienta hacia el solvente, alejándose 4Å, no encontrándose a una distancia aceptable para la interacción con el ligando.

Teniendo en cuenta el comportamiento del modelo en los estudios de *docking* y su posible relación con la diferente conformación del residuo de Arg203, se propuso un refinamiento de la estructura de MLK3 mediante dinámica molecular. Previamente a la realización de las simulaciones de dinámica molecular, se superpuso el ligando **CEP-6331** en el bolsillo de unión de ATP para refinar la estructura del modelo utilizando algoritmos de Monte Carlo híbrido. Tras los pasos de minimización, el residuo de Arg203, modificó su geometría e interactuando con el ligando de manera análoga al cristal 3dtc. Esta estructura refinada fue utilizada para repetir un experimento de *docking* con el compuesto **CEP-6331**, utilizando Glide, con el objetivo de comprobar si tras este refinamiento del modelo de MLK3 se conseguía reproducir el modo de unión en MLK1 (**Figura 3.11**).

Los resultados mostraron que el compuesto **CEP-6331** era capaz de unirse con un modo de unión idéntico que en el caso de MLK1. Para completar el análisis de este modo de unión obtenido, se calculó la energía libre para la pose del compuesto **CEP-6331** en complejo con MLK1, en complejo con el modelo de MLK3 tras el refinamiento y tras el experimento de *docking* (**Tabla 3.2**). Los resultados muestran una tendencia que se corresponde con los valores de IC_{50} descritos para este compuesto²².

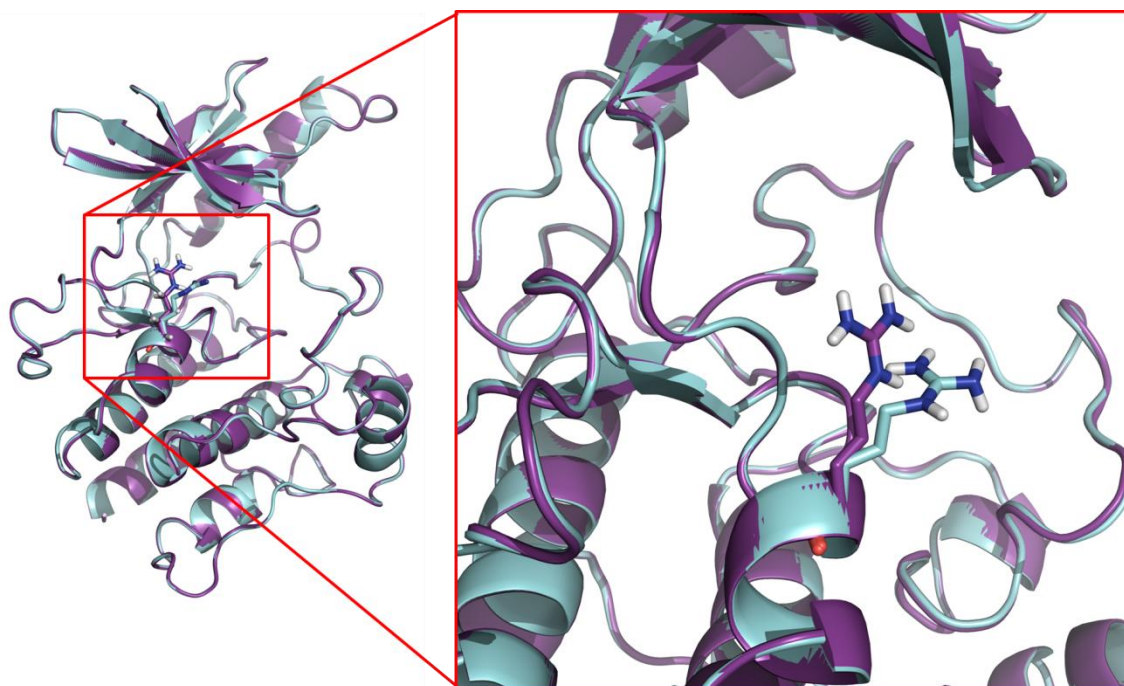


Figura 3.11. Superposición de los modelos de MLK3 antes (azul) y después (morado) del refinamiento con método de Monte Carlo híbrido. El residuo de Arg203 se repositona orientándose hacia la cavidad para interactuar con el compuesto **CEP-6331**.

Tabla 3.2. Energías libres de unión calculadas mediante MM/GBSA para el compuesto **CEP-6331** en complejo con MLK1 y MLK3 (en el modelo refinado y en la pose de *docking*). La energía libre muestra una mayor afinidad para el compuesto en MLK1 que en MLK3, lo que se podría relacionar con una mejor actividad inhibitoria del enzima.

	CEP-6331/MLK1 (PDBID 3DTC)	CEP-6331/MLK3 refinado con MC	CEP-6331/MLK3 pose de <i>docking</i>
MM/GBSA (kcal·mol⁻¹)	-110.49	-98.47	-98.17
IC₅₀ (nM)	26.0	64.0	64.0

Dado que finalmente la pose de *docking* del compuesto **CEP-6331** fue capaz de reproducir el modo de unión en MLK1 para nuestro modelo, esta pose fue tomada como punta de partida para los estudios de dinámica molecular. El estudio se realizó con Amber14³⁰ con una duración de 10 ns. En este caso se decidió que el tiempo de la simulación fuera un periodo relativamente corto, puesto que el objetivo es refinar ligeramente la estructura general de la diana. La pose del compuesto se mantuvo estable a lo largo de la dinámica. Se extrajeron las poses medias del complejo ligando-proteína para intervalos de 1 ns a lo largo de los últimos 5 ns y analizándose las conformaciones de los residuos de la cavidad y la variación de RMSD y RMSF (**Figura 3.12**). A lo largo de la simulación, los átomos del esqueleto de MLK3 se mantienen estables, sin observarse cambios conformacionales importantes, como se puede ver en los valores de RMSD que se mantienen estables entre 1.5 y 1.75Å. Analizando los residuos del bolsillo de unión de ATP a lo largo de las diferentes estructuras obtenidas, se observó que

los residuos que presentaban un mayor movimiento eran el residuo de Arg203, orientado tanto hacia el solvente como hacia la cavidad, y el residuo de Lys144, uno de los dos residuos catalíticos del enzima (**Figura 3.13**). Además, los valores de RMSF de los diferentes intervalos mostraron un mayor movimiento de los residuos de MLK3 entre los nanosegundos 8 y 9 que en el resto de intervalos. Este movimiento se puede relacionar con una mayor flexibilización de las cadenas laterales de la proteína. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió tomar, tanto la estructura media del intervalo 8-9 ns, con Arg203 hacia el solvente, (a partir de ahora nombrado Modelo 1) como la estructura promedio del intervalo 9-10 ns, con el residuo de Arg203 orientado hacia la cavidad, (nombrado como Modelo 2) como modelos que representan el comportamiento dual de este residuo.

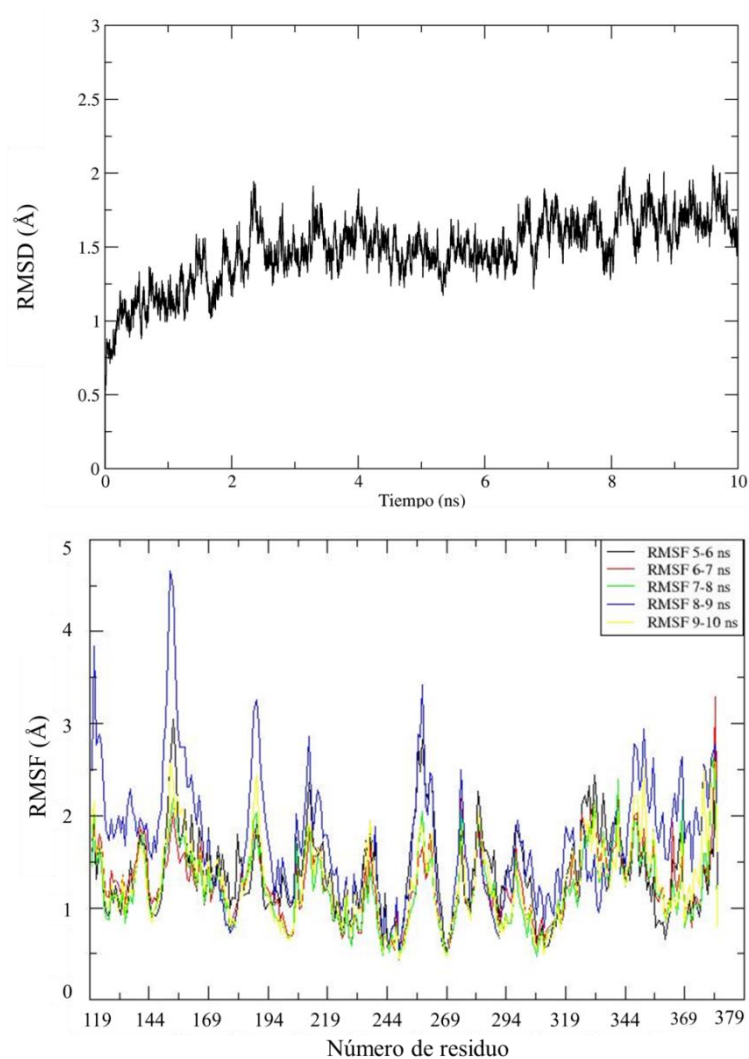


Figura 3.12. Valores de RMSD de los átomos del esqueleto de MLK3 a lo largo de la simulación (arriba) y valores de RMSF obtenidos para cada intervalo de cada uno de los últimos 5 ns de la simulación (abajo). En el intervalo entre los nanosegundos 8 y 9 se observó un mayor movimiento de la proteína.

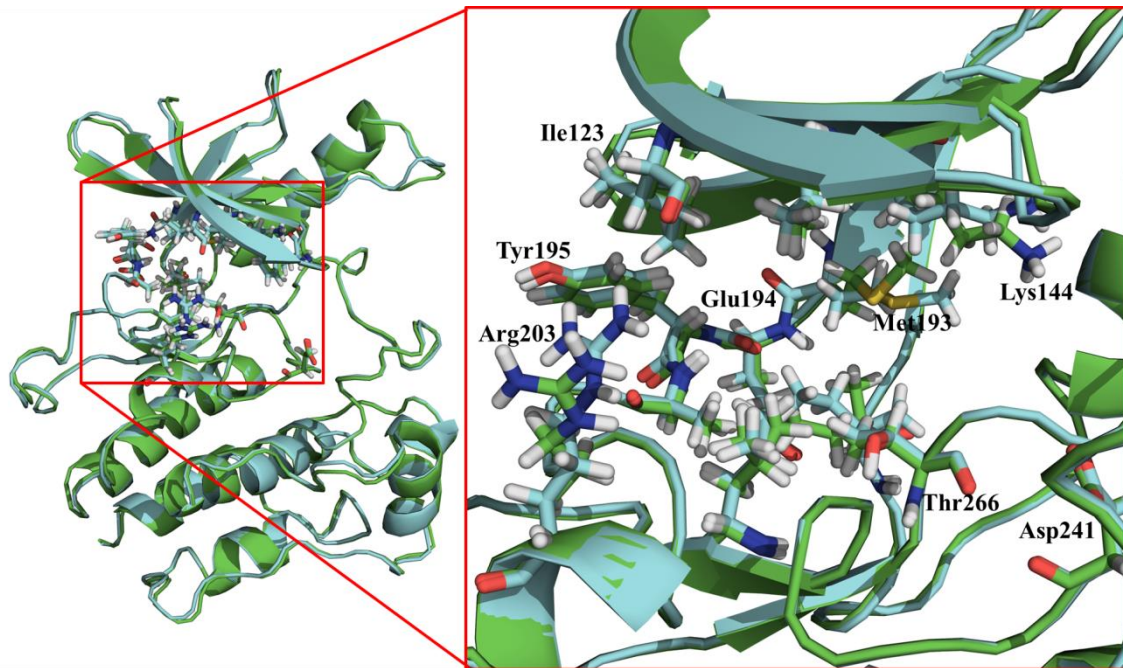


Figura 3.13. Superposición de las estructuras promedio obtenidas de los modelos 1 (verde) y 2 (azul).

El cálculo de los ángulos ϕ y ψ y su representación mediante el gráfico de Ramachandran para ambos modelos obtenidos (**Figura 3.14**) mostró que la simulación de dinámica molecular fue capaz de refinar los ángulos de los residuos, ya que los ángulos desfavorables que presentaba el modelo inicialmente, no se encuentran presentes en ambas estructuras refinadas como se muestra en la **Tabla 3.3**.

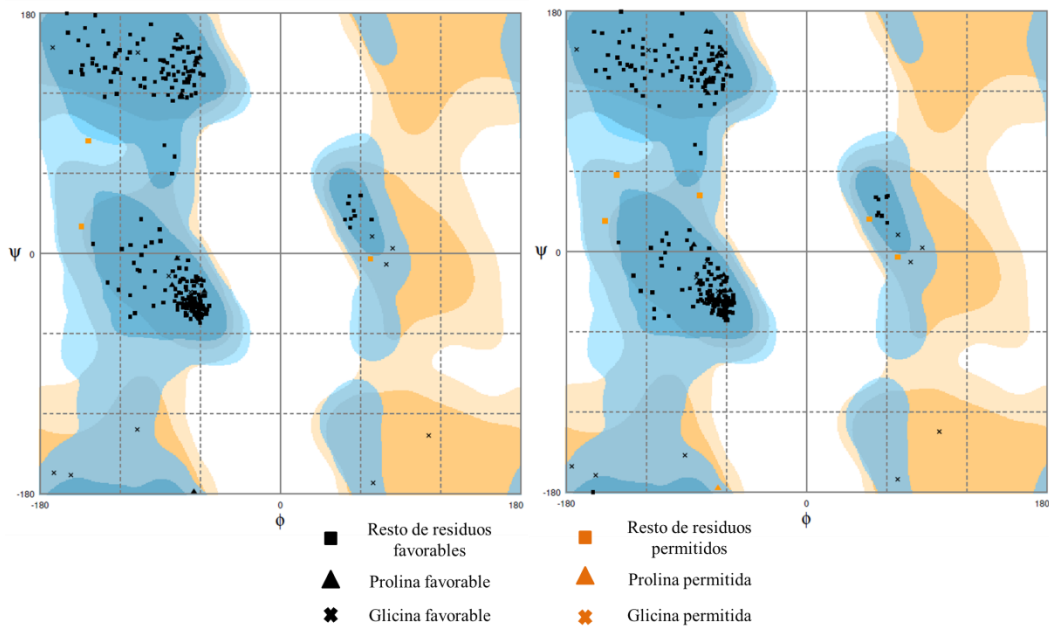


Figura 3.14. Gráfico de Ramachandran de las estructuras promedio de los modelos 1 (izquierda) y 2 (derecha).

Tabla 3.3. Resultados del gráfico de Ramachandran. Número de residuos con ángulos favorables, permitidos y desfavorables de los modelos 1 y 2 de MLK3.

	MLK3 modelo 1	MLK3 modelo 2
Ramachandran		
Número de residuos en regiones favorables	258 (98.9%)	255 (97.7%)
Número de residuos en regiones permitidas	3 (1.1%)	6 (2.3%)
Número de residuos fuera de regiones permitidas	0 (0%)	0 (0%)

Todos estos resultados muestran que el refinamiento mediante una corta simulación de dinámica molecular ha logrado mejorar los valores geométricos de la estructura obtenida inicialmente. El resultado del refinamiento han sido dos modelos de estructuras tridimensionales del dominio quinasa de MLK3, que presentan diferentes conformaciones para los residuos de Lys144 y Arg203. El comportamiento flexible de estos residuos será muy importante para posteriores estudios basados en la estructura que se lleven a cabo utilizando estos dos modelos.

3.2 Identificación de nuevos inhibidores de MLK3

3.2.1 Validación del protocolo

El desarrollo de un modelo del dominio quinasa de MLK3 nos permite el planteamiento de un estudio de cribado virtual basado en la estructura de la diana para la identificación de nuevos inhibidores de MLK3. Para ello, se tendrán en cuenta inicialmente ambos modelos obtenidos a partir del refinamiento del modelo inicial. Se diseñó un protocolo en dos etapas para la realización de un cribado virtual, utilizando la quimioteca MBC³¹. En primer lugar se realizó un experimento de *docking* utilizando Glide³²; en segundo lugar, se llevó a cabo el cálculo y análisis de los *Fragment Hotspot Maps* (FHM³³) para su uso como filtro de interacciones en esta diana.

Previamente al cribado virtual de los compuestos de la quimioteca, se llevó a cabo la validación del protocolo de *docking*. Para ello se tomaron un conjunto de doce inhibidores conocidos de MLK3 (**Figura 3.15**) seleccionados de la base de datos Binding Data Base³⁴, realizándose los experimentos de *docking* sobre las estructuras de ambos modelos de MLK3. Los doce compuestos seleccionados fueron utilizados para la creación de 50 DUDs por cada uno. Los DUDs son estructuras con propiedades fisicoquímicas (logP, masa molecular, número de grupos dadores/aceptores de enlaces de hidrógeno) similares a los compuestos referencia pero con topologías atómicas totalmente diferentes. Esto quiere decir que los DUDs son compuestos que van a ser teóricamente inactivos pero que poseen propiedades fisicoquímicas similares a los compuestos activos, siendo un buen conjunto de ensayo para valorar la capacidad de filtrado de compuestos del protocolo³⁵.

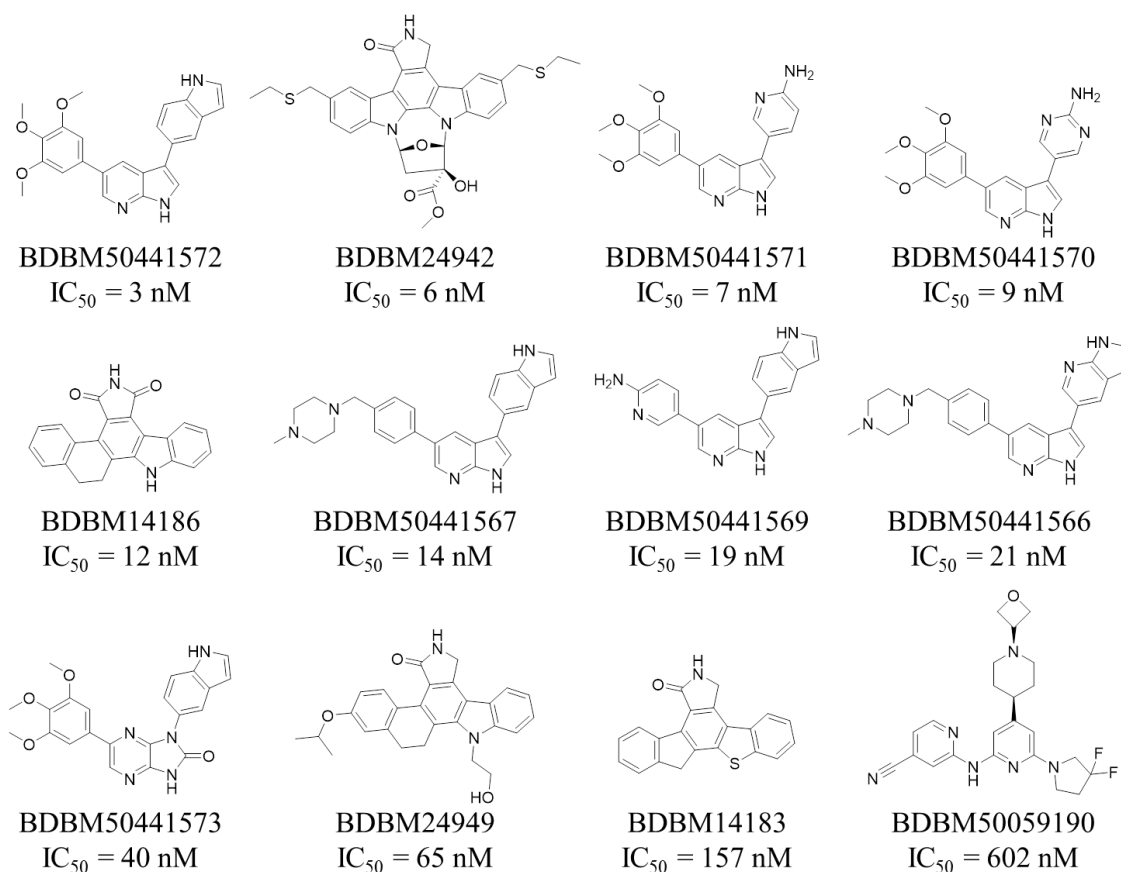


Figura 3.15. Estructuras, referencias de Binding DataBase y actividades de los doce compuestos seleccionados como controles para la validación del protocolo de *docking*.

Los 612 compuestos (doce compuestos activos y 600 DUDs generados) fueron utilizados para los cálculos de *docking* en el sitio de unión de ATP de ambos modelos. Los resultados en ambos modelos fueron satisfactorios, aunque en la estructura promedio de los nanosegundos 8-9 (Arg203 expuesta hacia el solvente), los valores de la puntuación de *docking* fueron ligeramente mejores y la predicción de las poses fue en concordancia con lo descrito en la bibliografía. Teniendo en cuenta los valores de puntuación de *docking* se realizó una curva ROC, que muestra la capacidad de predecir con mejor clasificación los compuestos activos frente a los inactivos (**Figura 3.16**). El experimento realizado sobre el modelo 1 mostró un valor del área bajo la curva de 0.821, mientras que en el modelo 2 mostró 0.649. Los valores por encima de 0.5 demuestran ser mejores que una selección aleatoria, por lo que ambos experimentos obtuvieron resultados positivos. Aun así, el experimento con la estructura del modelo 1 obtuvo un resultado mejor a la hora de discriminar compuestos inactivos frente a activos.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados por los doce compuestos control y los DUDs en ambos modelos, se seleccionó la estructura del modelo 1 como estructura sobre la que realizar el cribado virtual de compuestos de la quimioteca del grupo.

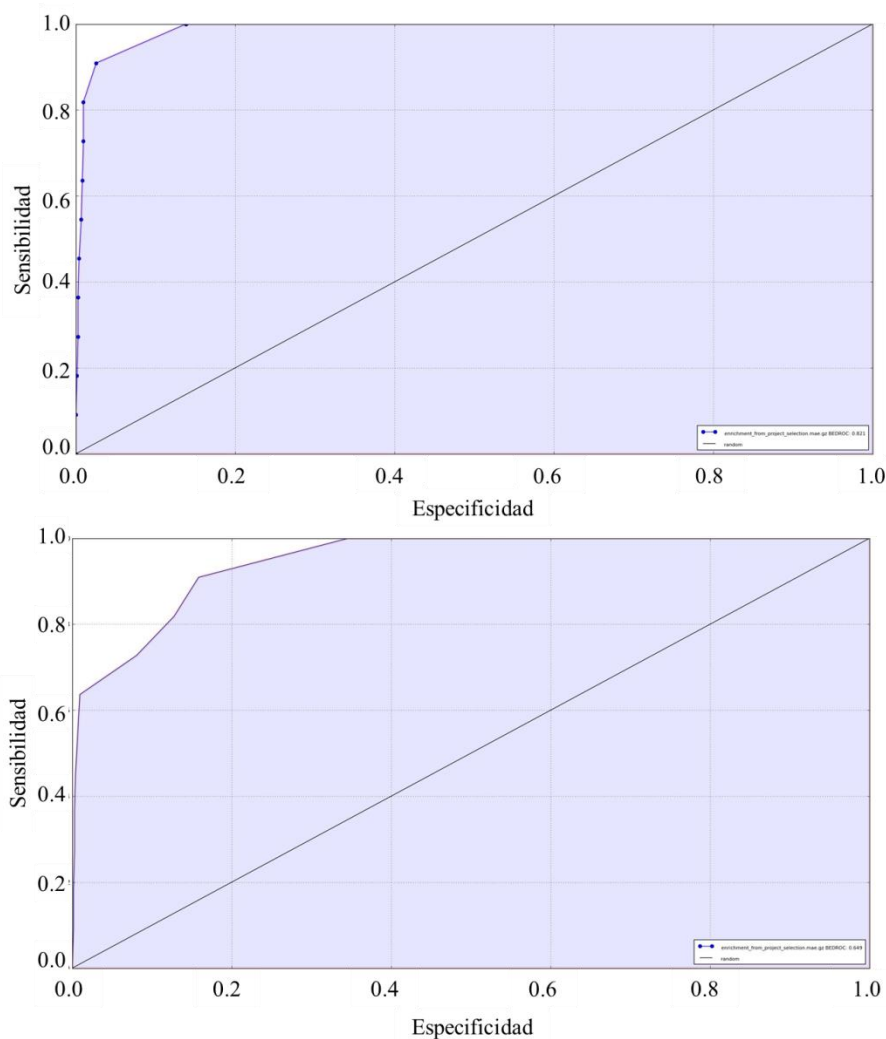


Figura 3.16. Curvas ROC obtenidas para los estudios de *docking* en el modelo del dominio quinasa de MLK3 del modelo 1 (arriba) y 2 (abajo).

3.2.2 Cribado virtual y selección de compuestos

Para realizar el cribado virtual, se calcularon los FHM del modelo de MLK3. Estos mapas aportan información acerca de las posibles interacciones de enlaces de hidrógeno e interacciones aromáticas/hidrofóbicas que se pueden formar entre ligando y diana. En el modelo seleccionado para el cribado virtual, los FHM mostraron dos interacciones de enlace de hidrógeno en la región de unión de ATP: una interacción aceptora de enlaces de hidrógeno por parte de carbonilo del esqueleto de Glu194 y una interacción dadora de puentes de hidrógeno por parte del grupo amino del esqueleto de Ala196 (**Figura 3.17**). Estas dos interacciones, dadora/aceptora, están presentes en la mayoría de inhibidores competitivos de proteínas quinazas, siendo fundamentales también en el inhibidor cristalizado de MLK1 en el PDBID 3dtc²⁶.

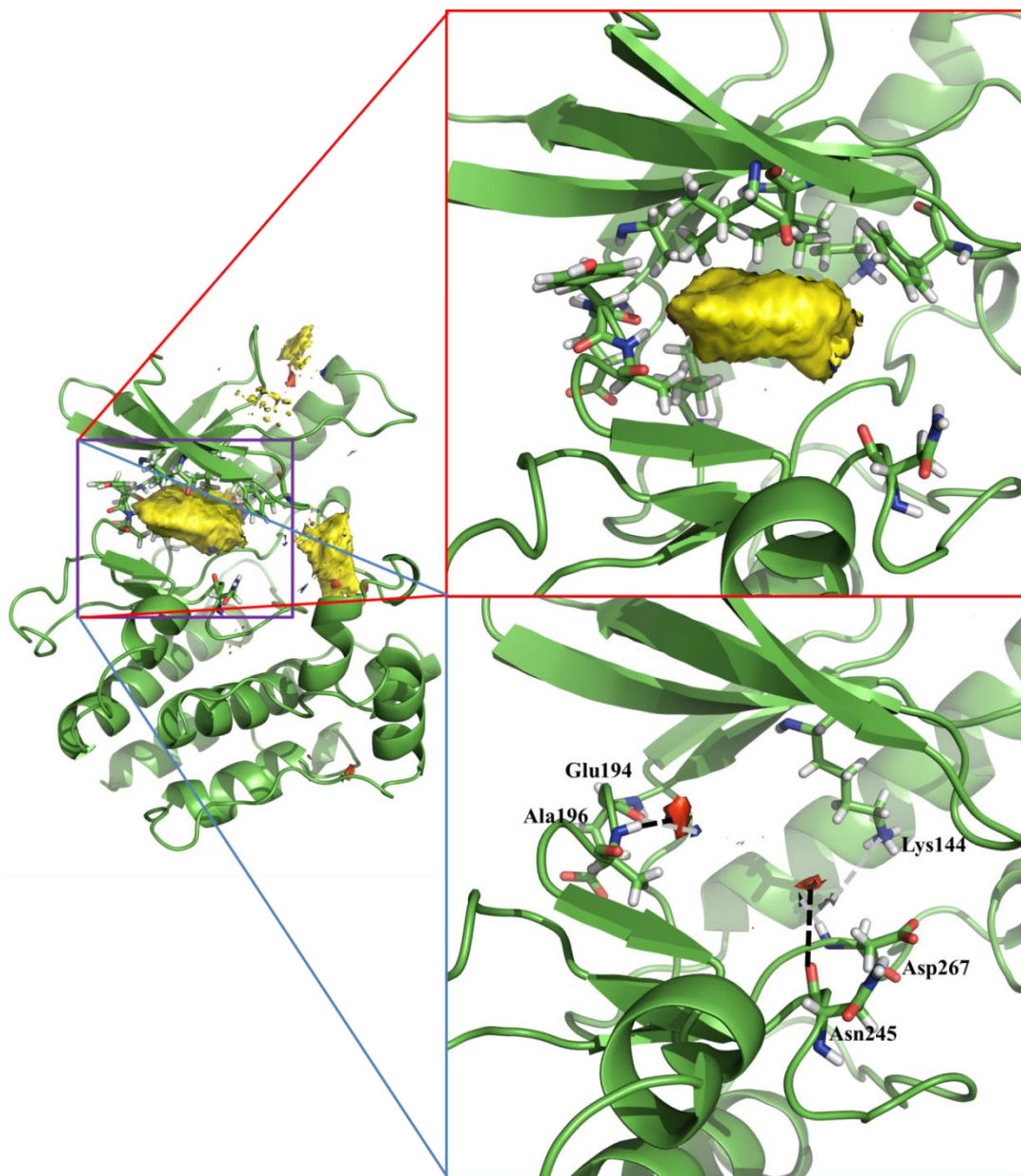


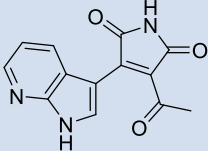
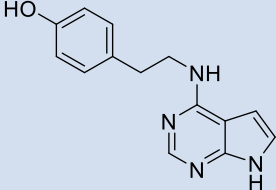
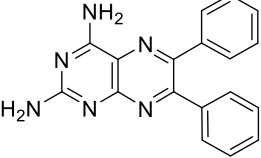
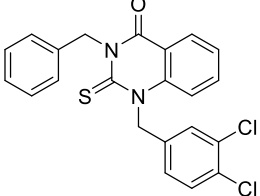
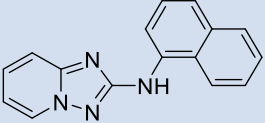
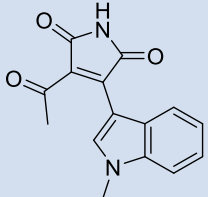
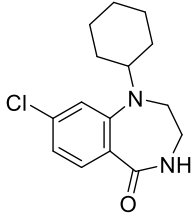
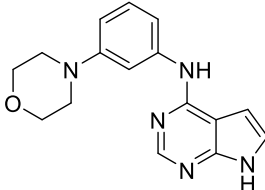
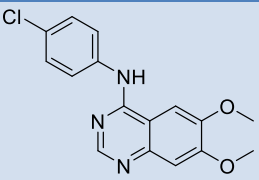
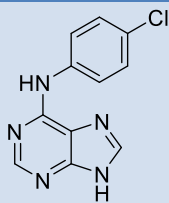
Figura 3.17. Resultados del cálculo de *Hotspots* en el modelo de MLK3. Volúmenes en rojo muestran regiones en las que los ligandos pueden interactuar mediante un enlace de hidrógeno aceptor, regiones azules muestran posibles interacciones por enlaces de hidrógeno dadores y las regiones amarillas se relacionan con interacciones aromáticas/hidrofóbicas.

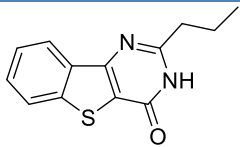
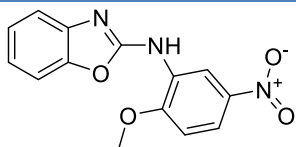
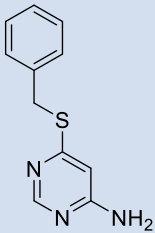
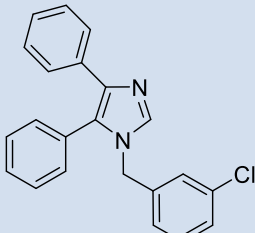
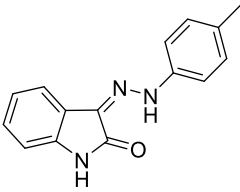
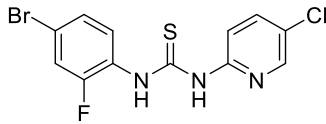
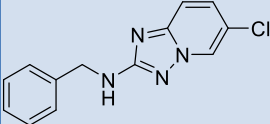
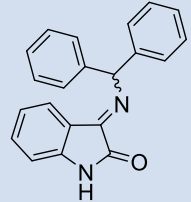
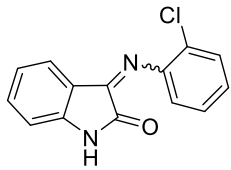
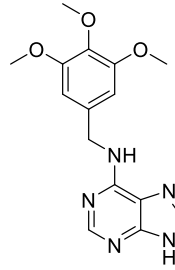
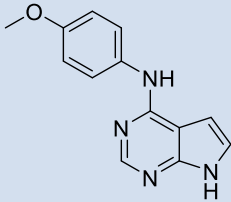
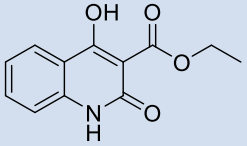
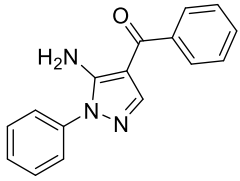
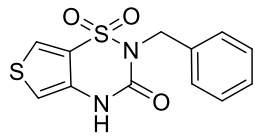
Además, también se pudieron observar posibles interacciones de enlace de hidrógeno con los residuos de Lys144, Asn245 y Asp267. El bolsillo de unión de ATP presenta una importante región hidrofóbica enfrentada a los residuos de Glu194 y Ala196, por lo que compuestos que posicionen anillos aromáticos o alifáticos en esa área podrían mostrar mejores valores de afinidad.

Utilizando el mismo *grid* generado previamente para el bolsillo de unión de ATP del modelo 1 de MLK3 (estructura promedio de los nanosegundos 8-9), se realizó el *docking* de los compuestos de la quimioteca MBC. Todos los compuestos fueron clasificados mediante su

puntuación de *docking*, para ser posteriormente filtrados con el objetivo de encontrar únicamente los compuestos capaces de mantener enlaces de hidrógeno con los residuos de Glu194 y Ala196. De los cerca de 2000 compuestos iniciales, únicamente 89 mostraron la capacidad de interactuar mediante dos enlaces de hidrógeno con estos residuos. Los 89 compuestos fueron superpuestos con el mapa de FHM y mediante selección visual, los compuestos que encajasen mejor en las áreas FHM, fueron seleccionados para su evaluación biológica (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Compuestos seleccionados del cribado virtual como posibles inhibidores de MLK3.

Ref.	Estructura	Puntuación de <i>docking</i>	Ref.	Estructura	Puntuación de <i>docking</i>
MD1.6		-10.02	VNG-1.13		-8.78
SC242		-9.63	CG112b		-8.40
JC140		-9.21	VP3.36a		-8.22
SC693		-8.96	VNG-1.38		-8.19
VNG1.36		-8.93	GMH1.20		-8.18

AL010		-8.03	SMP1.17		-6.79
CFR-1.5		-7.73	IGS1.17		-6.78
IGS-4.49		-7.63	JC057		-6.51
JC064		-7.47	IGS4.48		-6.44
IGS-4.19		-7.37	ERP-1.32		-5.94
VNG-1.35		-7.33	VP59		-5.34
SC687		-6.90	SC531		-2.65

Los 24 compuestos seleccionados obtuvieron puntuaciones de *docking* que variaron entre -10.02 y -2.65 kcal/mol, mostrando todos ellos al menos un puente de hidrógeno con los residuos de Glu194 y Ala196. Algunas de las poses obtenidas para los compuestos seleccionados se muestran en la **Figura 3.18**, en donde se puede apreciar la capacidad de estos

compuestos de interactuar con los átomos del esqueleto de la región “bisagra” de MLK3 (residuos Glu194 y Ala196).

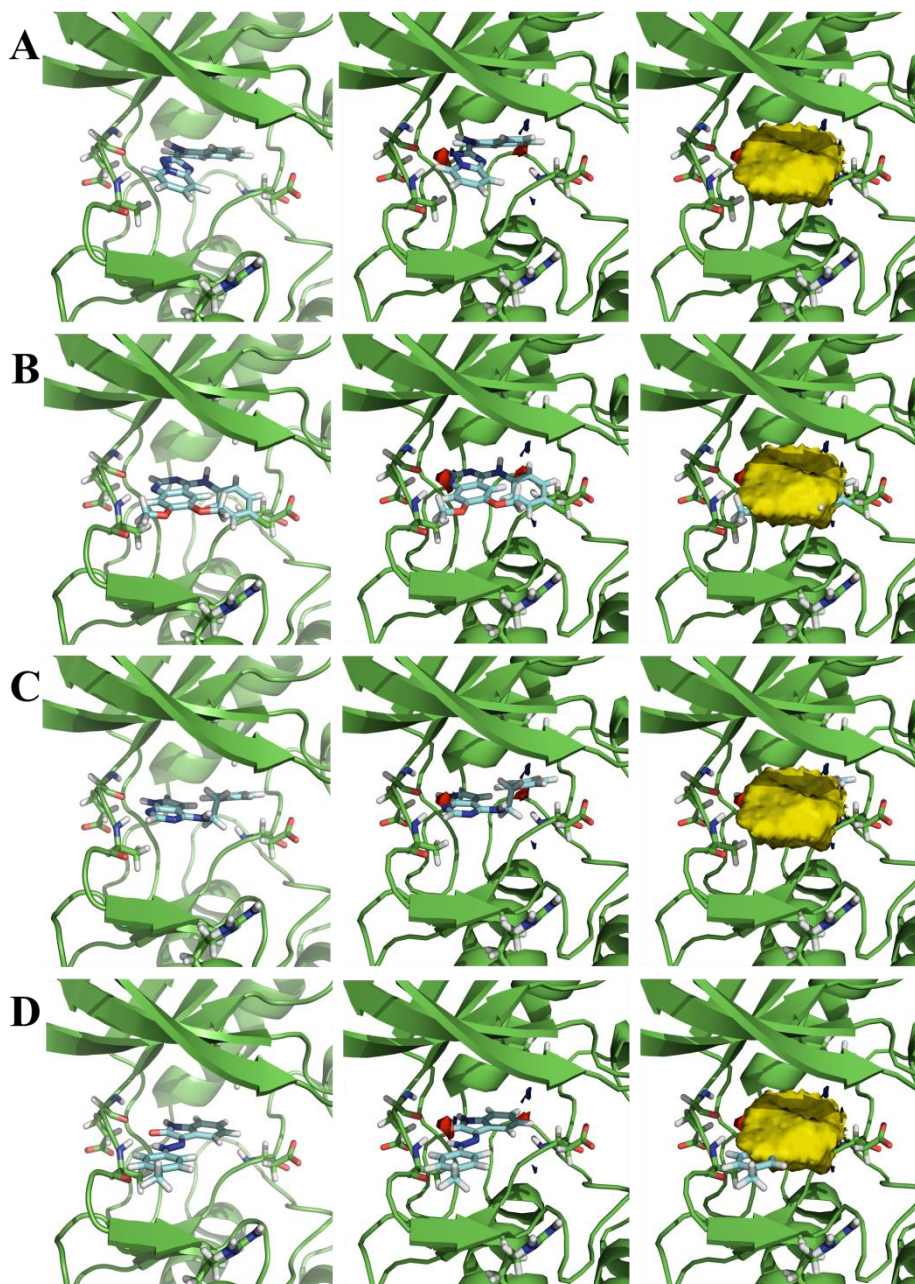


Figura 3.18. Modo de unión predicho en los estudios de *docking* y superposición con los FHM de los compuestos: A) JC140; B) VNG-1.36; C) VNG-1.13; D) IGS-4.49.

3.2.3 Evaluación biológica

La capacidad inhibitoria de MLK3 de los 24 compuestos seleccionados fue evaluada en el Centro Internacional para la evaluación de Quinasas, de la Universidad de Dundee (Escocia). Además, también se evaluó la capacidad de estos compuestos de inhibir JNK3, con el fin de conocer la especificidad de estos compuestos en su cascada de señalización. Todos los compuestos fueron evaluados siguiendo el protocolo descrito por Hastie *et al*³⁶. Para una

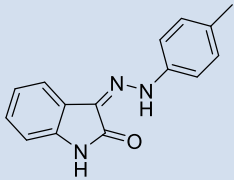
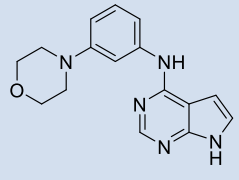
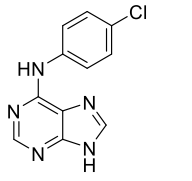
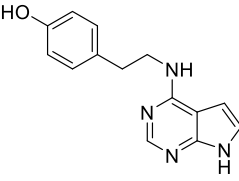
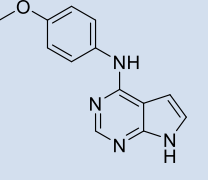
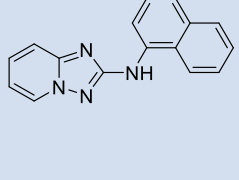
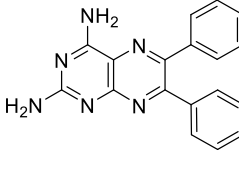
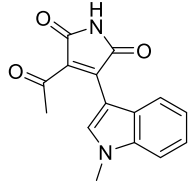
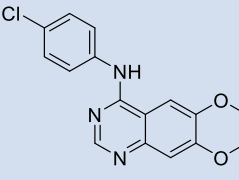
primera evaluación de la actividad inhibitoria, se evaluó el porcentaje de inhibición de ambas dianas a una concentración de 10 μM de los ligandos (**Tabla 3.5**). Este ensayo se realizó por duplicado.

Tabla 3.5. Valores de inhibición de JNK3 y MLK3 a 10 μM de los compuestos seleccionados a partir del cribado virtual. Los valores se calcularon en dos ensayos independientes tomando la media de ambos como porcentaje de inhibición.

Referencia	% inhibición de JNK3	% inhibición de MLK3	Referencia	% inhibición de JNK3	% inhibición de MLK3
IGS-4.49	18.3 \pm 13.3	83.5 \pm 7.0	SC242	5.2 \pm 6.0	44.0 \pm 3.0
GMH1.20	20.0 \pm 15.6	85.3 \pm 0.4	SC687	8.5 \pm 15.6	0.0 \pm 2.3
VNG-1.35	10.4 \pm 13.4	90.2 \pm 0.8	SC693	0.0 \pm 11.9	0.0 \pm 12.4
VNG-1.38	9.6 \pm 8.1	80.4 \pm 3.0	VNG1.36	22.6 \pm 0.2	87.0 \pm 1.2
VNG-1.13	3.0 \pm 15.0	89.8 \pm 1.9	JC064	23.3 \pm 12.1	0.2 \pm 2.9
ERP-1.32	14.9 \pm 2.6	1.4 \pm 7.4	SMP1.17	2.3 \pm 0.8	3.3 \pm 10.2
MD1.6	0.0 \pm 28.7	14.0 \pm 2.2	JC140	42.0 \pm 0.8	56.0 \pm 6.6
VP59	0.0 \pm 15.7	0.0 \pm 5.6	JC057	0.0 \pm 0.5	1.9 \pm 7.9
VP3.36a	0.5 \pm 7.2	54.6 \pm 2.3	IGS4.48	2.6 \pm 17.2	7.5 \pm 7.4
IGS-4.19	9.9 \pm 12.0	10.0 \pm 3.3	SC531	0.0 \pm 3.2	0.0 \pm 0.5
CFR-1.5	2.8 \pm 5.8	25.9 \pm 7.7	IGS1.17	13.8 \pm 13.0	10.1 \pm 8.5
CG112b	20.2 \pm 20.6	2.7 \pm 8.2	AL010	0.7 \pm 5.3	7.4 \pm 6.9

Los compuestos **IGS-4.49**, **GMH1.20**, **VNG-1.13**, **VNG-1.35**, **VNG-1.38** y **VNG-1.36** mostraron porcentajes de inhibición de MLK3 mayores del 80%, mientras que los compuestos **VP3.36a**, **SC242** y **JC140** inhibieron MLK3 en torno al 50%. Ninguno de los compuestos presentó porcentajes de inhibición de JNK3 mayores del 50%, manifestando la selectividad de estos compuestos por MLK3 frente a JNK3 en su cascada de señalización. Los nueve compuestos con mejor porcentaje de inhibición de MLK3 fueron seleccionados para el cálculo de su IC_{50} en MLK3 (**Tabla 3.6**). Los compuestos **IGS-4.49** ($\text{IC}_{50}=0.46 \mu\text{M}$), **VNG-1.13** ($\text{IC}_{50}=0.78 \mu\text{M}$) y **VNG-1.36** ($\text{IC}_{50}=0.8 \mu\text{M}$) presentaron valores de IC_{50} del orden submicromolar, siendo los inhibidores más potentes identificados mediante este estudio. Además, cabe resaltar, que estos tres compuestos poseen tres esqueletos químicos diferentes a los de los inhibidores de MLK3 descritos (isatina, quinazolina y 7-deazapurina respectivamente).

Tabla 3.6. Valores de IC₅₀ obtenidos para los compuestos seleccionados a partir del cribado virtual.

Ref.	Estructura	IC ₅₀ MLK3 (μM)	Ref.	Estructura	IC ₅₀ MLK3 (μM)
IGS-4.49		0.46	VNG-1.38		3.31
GMH1.20		1.65	VNG-1.13		0.78
VNG-1.35		1.54	JC140		3.6
SC242		12.35	VP3.36a		14.51
VNG1.36		0.8			

Los otros seis compuestos ensayados mostraron actividades que varían entre 1.54 μM y 14.51 μM, siendo inhibidores de MLK3 menos potentes, pero de naturaleza química diversa (pteridina, maleimida, triazolopiridina, purina y deazapurina).

Mediante la aplicación de técnicas de cribado virtual basado en la estructura de la diana hemos conseguido identificar nueve nuevos inhibidores de MLK3, con esqueletos químicos diversos y diferentes a los de los compuestos conocidos hasta el momento. De todos ellos, tres compuestos han mostrado una potencia del rango submicromolar.

3.3 Protección en motoneuronas derivadas de iPSC

La cascada de señalización de JNK3 ha demostrado ser un factor importante en enfermedades neurodegenerativas y/o que cursen con neuroinflamación como ya se ha descrito en la Introducción de este capítulo. La identificación de los nuevos inhibidores de MLK3 abre nuevas puertas en el estudio de la relación de esta cascada de señalización con varias patologías neurodegenerativas, aportando nuevas herramientas farmacológicas para ello. Una de las patologías en las que esta cascada se encuentra involucrada es la atrofia muscular espinal (AME).

Por todo lo visto, una regulación a la baja de la activación de JNK3 mediante la inhibición de MLK3 podría ser una alternativa terapéutica útil en el tratamiento de AME. Aprovechando una colaboración del grupo con la doctora Natalia Rodríguez Muela, de la Universidad de Harvard, se realizaron ensayos *in vitro* utilizando motoneuronas humanas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las iPSC son un tipo de células madre, capaces de generar la mayoría de tejidos, que se derivan artificialmente de una célula que inicialmente no era pluripotencial. Las células iPSC, en la actualidad, son uno de los mejores modelos celulares de enfermedad, ya que son células específicas de pacientes, siendo capaces de expresar de un modo muy preciso las características de las patologías de los pacientes.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron células diferenciadas en motoneuronas de pacientes de AME tipo 1 (I-38G), AME tipo 2 (I-51C) y dos líneas celulares de sujetos sanos (1016A Wt y BJ Wt) y se analizó la posible influencia de los compuestos **VNG-1.13**, **VNG-1.35** e **IGS-4.49** en la supervivencia de las motoneuronas a lo largo de 7 días (**Figura 3.19**).

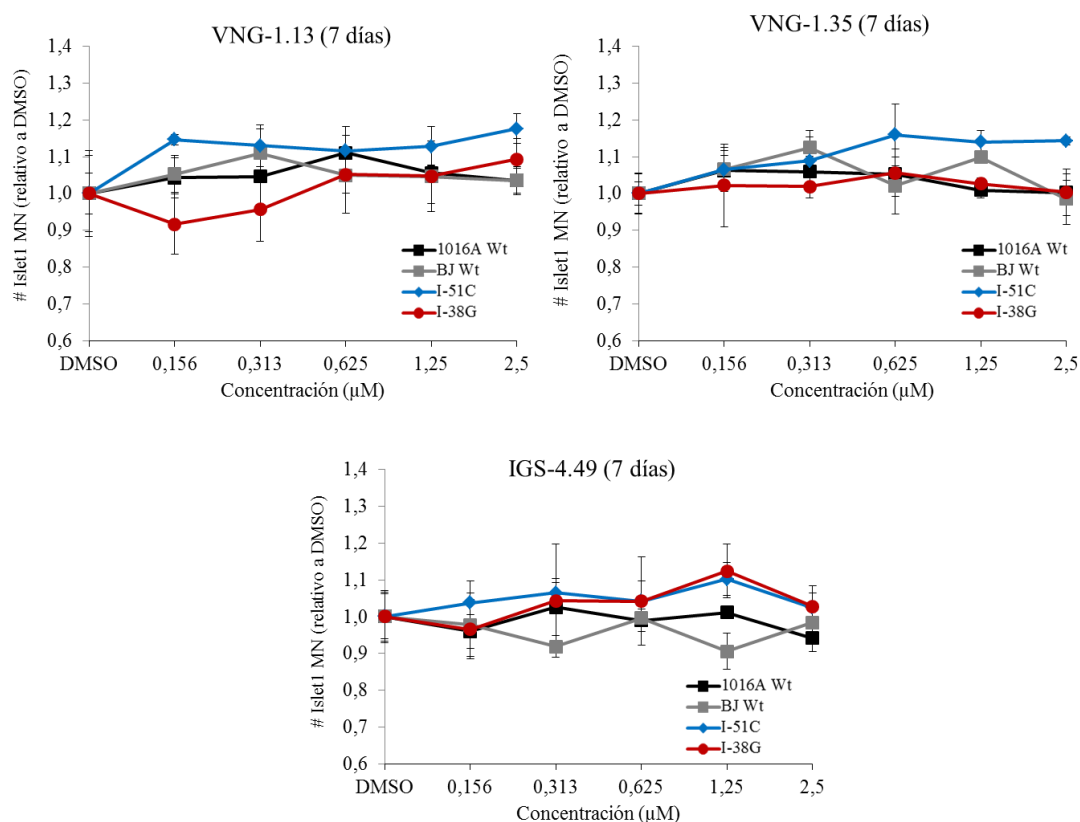


Figura 3.19. Cuantificación de motoneuronas (marcadas con Islet1) diferenciadas a partir de iPSCs derivadas de pacientes AME tipos 1 y 2, tratadas con DMSO o concentraciones crecientes de los compuestos **VNG-1.13**, **VNG-1.35** e **IGS-4.49** tras siete días. El número de motoneuronas Islet1 positivas fue calculado como el ratio de las motoneuronas supervivientes tratadas con fármaco frente a las motoneuronas tratadas con DMSO para cada línea celular.

En primer lugar, estos experimentos muestran que los tres compuestos ensayados no poseen toxicidad sobre estos cultivos celulares a concentraciones de hasta 2.5 μM. Además, de manera preliminar, estos experimentos *in vitro* sugieren una tendencia positiva de los inhibidores **VNG-1.13** y **VNG-1.35** en la promoción la supervivencia de motoneuronas de AME tipo 2, frente a las motoneuronas de AME tipo 1, a lo largo de los 7 días del experimento. Estos experimentos preliminares sugieren la posibilidad de que los inhibidores de MLK3 **VNG-1.13** y **VNG-1.35** pueden tener un papel neuroprotector en AME tipo 2. Esta hipótesis inicial abre un campo de acción en el desarrollo de un nuevo proyecto de Química Médica en la búsqueda y optimización de inhibidores más potentes y selectivos de MLK3 como terapia en patologías neurodegenerativas. Estos experimentos son también el punto de partida de un conjunto de ensayos, que se encuentran en desarrollo, para la validación de MLK3 como diana terapéutica para el tratamiento de AME.

4. CONCLUSIONES

La cascada de señalización de JNK3 es una interesante diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades que cursen con neurodegeneración y neuroinflamación. La proteína quinasa MLK3, que es una de las MAP3K encargadas de la activación de JNK3, es una diana terapéutica validada para el tratamiento de EP y trastornos cognitivos asociados al VIH, en la que sólo se conocen dos familias químicas diversas de inhibidores. Por todo ello, la identificación de nuevos compuestos inhibidores de esta diana es un interesante objetivo.

El dominio quinasa de la proteína MLK3 no tiene una estructura tridimensional resuelta experimentalmente. En este trabajo, y mediante la aplicación de técnicas de modelado molecular, se ha conseguido obtener un modelo por homología del dominio quinasa de MLK3. Este modelo, tras sucesivas etapas de refinamiento, ha mostrado mejores características geométricas, obteniéndose dos modelos representativos de MLK3. Estos dos modelos muestran un comportamiento flexible de los residuos de Lys144 y Arg203, que concuerda con lo descrito en la bibliografía para la proteína homóloga MLK1. La obtención de estos dos modelos refinados nos permitió, mediante una aproximación basada en la estructura, realizar un cribado virtual de compuestos. El resultado de este cribado virtual aportó nueve nuevos compuestos inhibidores de MLK3, con valores de actividad que varían en el rango submicromolar a micromolar. Estos nueve compuestos poseen diversidad estructural (siete esqueletos químicos diferentes) y diversidad en su actividad, resultando como un interesante punto de inicio de un nuevo proyecto de Química Médica en la búsqueda y optimización de inhibidores selectivos y potentes de MLK3.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Modelado y refinamiento

5.1.1 Construcción del modelo del dominio quinasa de MLK3

La secuencia de los dominios quinasa de MLK1 (UniProt ID P80192; residuos del 144 al 412) y MLK3 (UniProt ID Q16584; residuos del 117 al 379) se extrajo de la base de datos UniProt⁴⁴, en formato fasta. El alineamiento de ambas secuencias se llevó a cabo utilizando Clustal Omega 1.2.4²⁷ mediante la aplicación *online* del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI)⁴⁵.

Para desarrollar el modelo del dominio quinasa de MLK3, se utilizó el programa Swiss-Model⁴⁶, tomando para ello como molde la estructura del dominio quinasa de MLK1 (PDBID 3dtc²⁶) y utilizando el alineamiento de secuencias previamente calculado. Swiss-Model calcula modelos mediante modelado por homología basado en ProMod3. ProMod3 extrae información estructural inicial de la estructura molde. Las inserciones y eliminaciones, definidas mediante el alineamiento de secuencias, se resuelven buscando primero candidatos viables en una base de datos estructural. Los candidatos finales se seleccionan usando potenciales estadísticos de los métodos de puntuación de fuerza promedio. Si no se pueden encontrar candidatos, se realiza una búsqueda del espacio conformacional, utilizando para ello las técnicas de mecánica molecular Monte Carlo. Las cadenas laterales no conservadas se modelan utilizando la biblioteca de rotámeros del grupo Dunbrack⁴⁷. La configuración óptima de los rotámeros se estima utilizando el algoritmo TreePack⁴⁸ mediante la minimización de la función de energía SCWRL4⁴⁹. Como paso final, las pequeñas distorsiones estructurales o las interacciones desfavorables introducidas durante el proceso de modelado se resuelven mediante la minimización energética de la estructura. ProMod3 utiliza, para realizar los cálculos la biblioteca OpenMM⁵⁰, y para la parametrización el campo de fuerza CHARMM27⁵¹.

Tras la construcción del modelo, se realizaron análisis energéticos y geométricos del modelo. En primer lugar se tomó el valor de QMEAN obtenido tras el modelado. El gráfico de Ramachandran muestra los ángulos de torsión ϕ - ψ para todos los residuos del modelo, siendo una de las mejores guías para la calidad estereoquímica. Además, los modelos han sido evaluados usando Verify3D⁵², un servidor web que comprueba la precisión energética del modelo tridimensional.

5.1.2 Refinamiento y validación del modelo

Para comprobar la capacidad del modelo obtenido para reproducir la pose teórica del compuesto CEP-6331 se realizó un estudio de *docking* en utilizando Glide³² con precisión XP. El compuesto fue seleccionado ya que es el ligando cristalizado en la estructura 3dtc (la estructura utilizada como molde en nuestro estudio), presuponiendo que el modo de unión en ambas dianas debe ser similar. El ligando fue dibujado con el módulo 2D Sketcher de Maestro⁵³, ionizándose a $\text{pH} = 7.2 \pm 0.2$ y calculando las cargas atómicas utilizando el campo de fuerzas OPLS2005⁵⁴. La estructura del modelo fue preparado utilizando el módulo *Protein Preparation Wizard*⁵⁵, ajustando los órdenes de enlace, ionizando la estructura a $\text{pH} = 7.2$ y refinando las interacciones de enlace de hidrógeno intramoleculares. Una malla de tamaño interno $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}$ y externo $35 \times 35 \times 35 \text{ \AA}$ fue calculada centrándose en los residuos que forman el bolsillo de unión de ATP. Para este estudio se usó el campo de fuerzas OPLS2005, obteniendo un máximo de 50 poses. Las mejores poses energéticas fueron analizadas visualmente.

Para realizar un refinamiento inicial del modelo, se superpusieron las estructuras del dominio quinasa de MLK1 (PDB ID 3dtc) y el modelo de MLK3, ubicando el ligando CEP-6331 en el interior de la cavidad de nuestro modelo. El complejo generado CEP-6331/MLK3 fue refinado utilizando Prime⁵⁶ mediante técnicas de Monte Carlo híbrido, un modelo de solvatación VSGB2.0⁵⁷ y el campo de fuerzas OPLS2005, llevando a cabo 100 etapas de refinamiento a una temperatura de 300 K. Monte Carlo híbrido, también conocido como Hamiltonian Monte Carlo, es un procedimiento que mezcla los métodos tradicionales de cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) con dinámica molecular, adopta la dinámica del sistema físico, en lugar de una distribución de probabilidad, para proponer futuros estados en la cadena de Markov. Esto permite la exploración de la distribución de una forma mucho más eficiente, resultando en una convergencia más rápida.

Una vez refinado el complejo CEP-6331/MLK3 se repitió el protocolo de *docking* previamente utilizado para comprobar el modo de unión predicho. Además, se realizó un cálculo de energía libre (MM/GBSA) de la estructura cristalográfica 3dtc, el modelo refinado mediante el método Monte Carlo híbrido y la solución obtenida del *docking* utilizando el programa Prime⁵⁶. Estos cálculos se realizaron utilizando el modelo de solvatación continua VSGB2.0.

El complejo obtenido del *docking* de CEP-6331 y MLK3 fue utilizado como punto de partida para un refinamiento final mediante dinámica molecular. La geometría del ligando se optimizó utilizando el programa Gaussian09⁵⁸, usando el método HF6-311++(d,p), calculando las cargas RESP, para su posterior parametrización utilizando Antechamber⁵⁹. Los estudios de MD se realizaron utilizando el programa AMBER14³⁰ con el código implementado para el

cálculo en GPU⁶⁰, utilizando el campo de fuerzas ff14SB⁶¹ para la proteína, con un modelo de TIP3P para las moléculas de agua⁶². Se añadieron las moléculas de agua en una caja periódica con una distancia de 10 Å con los átomos de soluto. Las interacciones de largo alcance se calcularon utilizando Particle mesh Ewald⁶³. Las interacciones de van der Waals se truncaron a 10 Å con un modelo continuo aplicando corrección de largo alcance para la energía y presión del sistema. Los enlaces de hidrógeno fueron restringidos aplicando SHAKE⁶⁴. Las simulaciones se calentaron hasta 300 K utilizando el termostato de Langevin. El baróstato de Berendsen⁶⁵ se usó para ajustar la densidad del sistema a presión constante de 1 bar, equilibrando el sistema a lo largo de 1 ns. Finalmente, la simulación de 10 ns de dinámica molecular se calculó a presión y temperatura constantes. Energías y coordenadas fueron grabadas cada 1 ps. Las simulaciones se llevaron a cabo en una estación de trabajo Asus 1151 h170LVX-GTX-980Ti con procesadores Intel Core i7-6500K (12 M Cache, 3.40 GHz) y 16 GB DDR4 2133 MHz RAM. La simulación fue visualizada con VMD⁶⁶ y analizada utilizando el módulo cpptraj⁶⁷.

5.2 Identificación de nuevos inhibidores de MLK3

5.2.1 Validación del protocolo

Doce compuestos, inhibidores de MLK3 cuya información se encuentra depositada en la base de datos *Binding Data Base*³⁴, fueron seleccionados como controles y fueron utilizados para la generación de compuestos “señuelo”. La base de datos *Database of Useful Decoys* (Base de datos de compuestos “señuelo” útiles) busca 50 compuestos existentes que tengan similitud fisicoquímica (logP, masa molecular y número de grupos dadores/aceptores de enlace de hidrógeno) con el compuesto control, pero cuya estructura molecular sea muy diferente. De este modo, se consigue generar un conjunto de compuestos “señuelo” que en un protocolo de cribado virtual sirvan para valorar la capacidad de la metodología para filtrar los compuestos activos frente a los “señuelos”. Los 600 compuestos generados y los 12 compuestos activos fueron utilizados para evaluar la calidad de los modelos 1 y 2 en el protocolo de *docking*.

La estructura de los modelos 1 y 2 fue preparada utilizando *Protein Preparation Wizard* de manera idéntica al modelo inicial. La malla y el protocolo de *docking* llevados a cabo se calcularon siguiendo los pasos previamente descritos. Las poses resultantes del *docking* en ambos modelos fueron clasificadas por su puntuación de *docking*, y se calculó la curva ROC utilizando Maestro.

5.2.2 Cribado virtual y selección de compuestos

Para la realización del cribado virtual, se llevó en primer lugar el cálculo de los Fragment Hotspot Maps³³ para el modelo 1. El cálculo de estos mapas permitió observar las posibles

interacciones de enlace de hidrógeno que se podrían formar con los residuos de Lys144, Glu194, Ala196, Asn245 y Asp267. La interacción con los residuos de la zona “bisagra”, Glu194 y Ala196 fue seleccionada como la fundamental para el anclaje de los compuestos a seleccionar, por lo que fue aplicada posteriormente como filtro en el proceso de cribado virtual.

La quimioteca MBC³¹ fue utilizada para el cribado de compuestos. Para ello se preparó utilizando la herramienta LigPrep de manera análoga a los compuestos previamente estudiados. Tanto la malla, como el protocolo de *docking* utilizado fueron idénticos a los usados previamente. Las poses resultantes del *docking* se clasificaron por su puntuación de *docking*, y se filtraron los compuestos que pudieran interactuar mediante enlace de hidrógeno con los residuos de Glu194 y Ala196. Los compuestos resultantes de esta etapa de filtrado se superpusieron con las mapas FHM, seleccionándose finalmente de modo visual los compuestos que mejor se ajustasen a estas regiones.

5.2.3 Evaluación biológica

Para el cálculo del porcentaje de inhibición de MLK3 a una concentración de 10 μM se llevó a cabo el protocolo estándar de la Universidad de Dundee. El principal método utilizado es un ensayo de unión a un filtro radiactivo que utiliza ³³P ATP³⁶. Este método es sensible, preciso y proporciona una medida directa de la actividad.

Del mismo modo, los siete compuestos con mejores valores de inhibición a 10 μM fueron seleccionados para el cálculo de su IC₅₀. Este experimento se llevó a cabo, por duplicado, siguiendo el mismo protocolo que el anterior, en este caso calculando las curvas a diferentes concentraciones: 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 μM .

5.3 Protección en motoneuronas derivadas de iPSC

Ensayos *in vitro* se llevaron a cabo para evaluar el posible papel de los inhibidores de MLK3 en la neuroprotección en la AME. Para ello se realizaron cultivos celulares de motoneuronas humanas derivadas de células madre pluripotentes (iPCS) obtenidas de una línea de pacientes sanos (1016A y BJ), pacientes de SMA tipo I (I-38G) y pacientes SMA tipo II (I-51C). Los cultivos de motoneuronas disociadas, fueron plaquetadas sobre astrocitos primarios de ratón. Se trataron diariamente después de plaquetar, durante 3, 7 y 15 días. Los compuestos ensayados fueron VNG-1.35, VNG-1.13 e IGS-4.49, a concentraciones que variaron entre 156nM y 2.5 μM . Los cultivos fueron fijados y marcados para Islet1 (marcador de motoneuronas). Las imágenes fueron tomadas en vivo mediante Operetta automático de campo amplio con 20 aumentos. La cuantificación del número de motoneuronas de la imagen y de la intensidad de la expresión de proteína SMN se llevó a cabo automáticamente usando el *Columbus Image Data Storage and Analysis System* (PerkinElmer).

6. REFERENCIAS

1. Borsello, T.; Forloni, G. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharm Des* **2007**, *13*, 1875-86.
2. Mohit, A. A.; Martin, J. H.; Miller, C. A. p493F12 kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron* **1995**, *14*, 67-78.
3. Bozyczko-Coyne, D.; Saporito, M. S.; Hudkins, R. L. Targeting the JNK pathway for therapeutic benefit in CNS disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **2002**, *1*, 31-49.
4. Morishima, Y.; Gotoh, Y.; Zieg, J.; Barrett, T.; Takano, H.; Flavell, R.; Davis, R. J.; Shirasaki, Y.; Greenberg, M. E. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* **2001**, *21*, 7551-60.
5. Shoji, M.; Iwakami, N.; Takeuchi, S.; Waragai, M.; Suzuki, M.; Kanazawa, I.; Lippa, C. F.; Ono, S.; Okazawa, H. JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. *Brain Res Mol Brain Res* **2000**, *85*, 221-33.
6. Zhu, X.; Raina, A. K.; Rottkamp, C. A.; Aliev, G.; Perry, G.; Boux, H.; Smith, M. A. Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **2001**, *76*, 435-41.
7. Ferrer, I.; Blanco, R.; Carmona, M.; Puig, B.; Barrachina, M.; Gomez, C.; Ambrosio, S. Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *J Neural Transm (Vienna)* **2001**, *108*, 1383-96.
8. Hunot, S.; Vila, M.; Teismann, P.; Davis, R. J.; Hirsch, E. C.; Przedborski, S.; Rakic, P.; Flavell, R. A. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 665-70.
9. Wang, W.; Shi, L.; Xie, Y.; Ma, C.; Li, W.; Su, X.; Huang, S.; Chen, R.; Zhu, Z.; Mao, Z.; Han, Y.; Li, M. SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* **2004**, *48*, 195-202.
10. Lotharius, J.; Falsig, J.; van Beek, J.; Payne, S.; Dringen, R.; Brundin, P.; Leist, M. Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *J Neurosci* **2005**, *25*, 6329-42.
11. Burghes, A. H.; Beattie, C. E. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci* **2009**, *10*, 597-609.
12. Genabai, N. K.; Ahmad, S.; Zhang, Z.; Jiang, X.; Gabaldon, C. A.; Gangwani, L. Genetic inhibition of JNK3 ameliorates spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **2015**, *24*, 6986-7004.
13. Maroney, A. C.; Finn, J. P.; Connors, T. J.; Durkin, J. T.; Angeles, T.; Gessner, G.; Xu, Z.; Meyer, S. L.; Savage, M. J.; Greene, L. A.; Scott, R. W.; Vaught, J. L. Cep-1347 (KT7515), a semisynthetic inhibitor of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 25302-8.
14. Jaeschke, A.; Davis, R. J. Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases. *Mol Cell* **2007**, *27*, 498-508.
15. Sathyanarayana, P.; Barthwal, M. K.; Kundu, C. N.; Lane, M. E.; Bergmann, A.; Tzivion, G.; Rana, A. Activation of the Drosophila MLK by ceramide reveals TNF-alpha and ceramide as agonists of mammalian MLK3. *Mol Cell* **2002**, *10*, 1527-33.
16. Leung, I. W.; Lassam, N. Dimerization via tandem leucine zippers is essential for the activation of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MLK-3. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 32408-15.
17. Mishra, R.; Barthwal, M. K.; Sondarva, G.; Rana, B.; Wong, L.; Chatterjee, M.; Woodgett, J. R.; Rana, A. Glycogen synthase kinase-3beta induces neuronal cell death via direct phosphorylation of mixed lineage kinase 3. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 30393-405.
18. Sweeney, Z. K.; Lewcock, J. W. ACS chemical neuroscience spotlight on CEP-1347. *ACS Chem Neurosci* **2011**, *2*, 3-4.
19. Wang, L. H.; Besirli, C. G.; Johnson, E. M., Jr. Mixed-lineage kinases: a target for the prevention of neurodegeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2004**, *44*, 451-74.
20. Davis, M. I.; Hunt, J. P.; Herrgard, S.; Cicceri, P.; Wodicka, L. M.; Pallares, G.; Hocker, M.; Treiber, D. K.; Zarrinkar, P. P. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 1046-51.
21. Murakata, C.; Kaneko, M.; Gessner, G.; Angeles, T. S.; Ator, M. A.; O'Kane, T. M.; McKenna, B. A.; Thomas, B. A.; Mathiasen, J. R.; Saporito, M. S.; Bozyczko-Coyne, D.; Hudkins, R. L. Mixed lineage kinase activity of indolocarbazole analogues. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 147-50.

22. Goodfellow, V. S.; Loweth, C. J.; Ravula, S. B.; Wiemann, T.; Nguyen, T.; Xu, Y.; Todd, D. E.; Sheppard, D.; Pollack, S.; Poleskaya, O.; Marker, D. F.; Dewhurst, S.; Gelbard, H. A. Discovery, synthesis, and characterization of an orally bioavailable, brain penetrant inhibitor of mixed lineage kinase 3. *J Med Chem* **2013**, *56*, 8032-48.
23. Saporito, M. S.; Brown, E. M.; Miller, M. S.; Carswell, S. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons In vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, *288*, 421-7.
24. Eggert, D.; Dash, P. K.; Gorantla, S.; Dou, H.; Schifitto, G.; Maggirwar, S. B.; Dewhurst, S.; Poluektova, L.; Gelbard, H. A.; Gendelman, H. E. Neuroprotective activities of CEP-1347 in models of neuroAIDS. *J Immunol* **2010**, *184*, 746-56.
25. Parkinson Study Group, P. I. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology* **2007**, *69*, 1480-90.
26. Hudkins, R. L.; Diebold, J. L.; Tao, M.; Josef, K. A.; Park, C. H.; Angeles, T. S.; Aimone, L. D.; Husten, J.; Ator, M. A.; Meyer, S. L.; Holskin, B. P.; Durkin, J. T.; Fedorov, A. A.; Fedorov, E. V.; Almo, S. C.; Mathiasen, J. R.; Bozyczko-Coyne, D.; Saporito, M. S.; Scott, R. W.; Mallamo, J. P. Mixed-lineage kinase 1 and mixed-lineage kinase 3 subtype-selective dihydronaphthyl[3,4-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5-ones: optimization, mixed-lineage kinase 1 crystallography, and oral in vivo activity in 1-methyl-4-phenyltetrahydropyridine models. *J Med Chem* **2008**, *51*, 5680-9.
27. Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947-8.
28. Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 343-50.
29. Lovell, S. C.; Davis, I. W.; Arendall, W. B., 3rd; de Bakker, P. I.; Word, J. M.; Prisant, M. G.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. *Proteins* **2003**, *50*, 437-50.
30. Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham, I., T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Gusarov, S.; Homeyer, N.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kolossváry, I.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K. M.; Paesani, F.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Salomon-Ferrer, R.; Seabra, G.; Simmerling, C. L.; W., S.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Kollman, P. A. *AMBER 14*, University of California, San Francisco, 2014.
31. Sebastian-Perez, V.; Roca, C.; Awale, M.; Reymond, J. L.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N. E. Medicinal and Biological Chemistry (MBC) Library: An Efficient Source of New Hits. *J Chem Inf Model* **2017**, *57*, 2143-2151.
32. Schrödinger Release 2015-4: Glide, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
33. Radoux, C. J.; Olsson, T. S.; Pitt, W. R.; Groom, C. R.; Blundell, T. L. Identifying Interactions that Determine Fragment Binding at Protein Hotspots. *J Med Chem* **2016**, *59*, 4314-25.
34. Gilson, M. K.; Liu, T.; Baitaluk, M.; Nicola, G.; Hwang, L.; Chong, J. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, D1045-53.
35. Mysinger, M. M.; Carchia, M.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking. *J Med Chem* **2012**, *55*, 6582-94.
36. Hastie, C. J.; McLauchlan, H. J.; Cohen, P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 968-71.
37. Brzustowicz, L. M.; Lehner, T.; Castilla, L. H.; Penchaszadeh, G. K.; Wilhelmsen, K. C.; Daniels, R.; Davies, K. E.; Leppert, M.; Ziter, F.; Wood, D.; et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* **1990**, *344*, 540-1.
38. Arnold, W. D.; Kassar, D.; Kissel, J. T. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve* **2015**, *51*, 157-67.
39. Campbell, L.; Potter, A.; Ignatius, J.; Dubowitz, V.; Davies, K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* **1997**, *61*, 40-50.
40. Liu, Q.; Dreyfuss, G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* **1996**, *15*, 3555-65.
41. Park, G. H.; Maeno-Hikichi, Y.; Awano, T.; Landmesser, L. T.; Monani, U. R. Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene. *J Neurosci* **2010**, *30*, 12005-19.

42. Lotti, F.; Imlach, W. L.; Saieva, L.; Beck, E. S.; Hao le, T.; Li, D. K.; Jiao, W.; Mentis, G. Z.; Beattie, C. E.; McCabe, B. D.; Pellizzoni, L. An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell* **2012**, 151, 440-54.
43. Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **2000**, 103, 239-52.
44. The UniProt, C. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **2017**, 45, D158-D169.
45. Li, W.; Cowley, A.; Uludag, M.; Gur, T.; McWilliam, H.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Lopez, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* **2015**, 43, W580-4.
46. Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Gallo Cassarino, T.; Bertoni, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **2014**, 42, W252-8.
47. Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L., Jr. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure* **2011**, 19, 844-58.
48. Xu, J.; Jiao, F.; Berger, B. A tree-decomposition approach to protein structure prediction. *Proc IEEE Comput Syst Bioinform Conf* **2005**, 247-56.
49. Krivov, G. G.; Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L., Jr. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *Proteins* **2009**, 77, 778-95.
50. Eastman, P.; Swails, J.; Chodera, J. D.; McGibbon, R. T.; Zhao, Y.; Beauchamp, K. A.; Wang, L. P.; Simmonett, A. C.; Harrigan, M. P.; Stern, C. D.; Wiewiora, R. P.; Brooks, B. R.; Pande, V. S. OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. *PLoS Comput Biol* **2017**, 13, e1005659.
51. Mackerell, A. D., Jr.; Feig, M.; Brooks, C. L., 3rd. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* **2004**, 25, 1400-15.
52. Eisenberg, D.; Luthy, R.; Bowie, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol* **1997**, 277, 396-404.
53. Schrödinger Release 2015-4: Maestro S, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
54. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11225-11236.
55. Schrödinger Release 2015-4: Schrödinger Suite 2015-4 Protein Preparation Wizard; Epik S, L., New York, NY, 2015; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
56. Schrödinger Release 2015-4: Prime S, L., New York, NY, 2015. Maestro, Schrödinger.
57. Li, J.; Abel, R.; Zhu, K.; Cao, Y.; Zhao, S.; Friesner, R. A. The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins* **2011**, 79, 2794-812.
58. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Tossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision A.02. *Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016*.
59. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model* **2006**, 25, 247-60.
60. Gotz, A. W.; Williamson, M. J.; Xu, D.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R. C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *J Chem Theory Comput* **2012**, 8, 1542-1555.
61. Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput* **2015**, 11, 3696-713.
62. Jorgensen, W. L.; Chandrasekar, J.; Madura, J.; Impey, R.; Klein, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*. **1983**, 79, 926-935.
63. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, 98, 10089.

64. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **1977**, *23*, 327-341.
65. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, *81*, 3684.
66. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**, *14*, 33-8, 27-8.
67. Roe, D. R.; Cheatham, T. E., 3rd. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 3084-95.

CONCLUSIONES

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.”

Gregorio Marañón

En esta memoria, se han desarrollado diferentes proyectos de Química Médica en la identificación y optimización de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas mediante la aplicación de diversas herramientas de modelado molecular. El modelado molecular, un campo en continuo avance y desarrollo desde la mitad del pasado siglo, se encuentra cada vez más arraigado en el mundo multidisciplinar del descubrimiento de fármacos. La integración de técnicas como los estudios de acoplamiento molecular o *docking*, dinámica molecular, predicción de propiedades fisicoquímicas de compuestos orgánicos o estudio de cavidades y predicción de posibles sitios de unión de ligandos, permite que los proyectos de Química Médica presenten un flujo de trabajo más racional, acortando tiempos, costes y minimizando riesgos.

El desarrollo de esta tesis doctoral ha permitido concluir lo siguiente:

- Mediante el estudio de los bolsillos de *hAChE*, se han identificado tres posibles cavidades alostéricas del enzima (*Sitios 2, 3 y 4*). De estas tres cavidades, dos de ellas comparten residuos con puertas de salida de los productos de degradación de ACh, pudiendo ser bolsillos interesantes para la modulación indirecta de la actividad catalítica.
- La aplicación de PELE, estudios de *docking* y dinámica molecular han permitido un exhaustivo estudio del comportamiento de varios compuestos, híbridos de tacrina y donepezilo, inhibidores no competitivos de AChE. Mediante estos estudios se ha podido realizar una hipótesis sobre el modo de unión y mecanismo de acción del compuesto **TC04** en el *Sitio 2*.
- El cribado virtual de compuestos en los *Sitios 2 y 3* de AChE ha permitido la identificación de 2 compuestos moduladores alostéricos del enzima, los compuestos **SC242** y **VP2.33**. Estos compuestos inhiben la función catalítica de AChE en el rango

micromolar, pudiendo ser interesantes herramientas farmacológicas para el estudio de las funciones no clásicas de *hAChE*.

➤ Mediante estudios de modelado molecular y experimentos de RMN, se ha podido estudiar el comportamiento de los compuestos **FD44** y **FD16**. Gracias a los estudios de dinámica molecular se ha podido identificar la interacción con el residuo de Tyr52 como una interacción clave del compuesto **FD44** en la unión con *dNCS-1*.

➤ Los estudios teóricos para estudiar el comportamiento de la hélice H10 de *dNCS-1* han permitido observar el reconocimiento de la cavidad hidrófoba por parte de la hélice H10. Este puede ser un mecanismo auto-regulatorio de la misma proteína, y la estabilización de esta conformación mediante una molécula pequeña conlleva una afectación del reconocimiento de Ric8a.

➤ La integración de los datos obtenidos en estudios teóricos al protocolo de cribado virtual ha permitido identificar dos nuevas moléculas, **IGS-1.76** e **IGS-3.31**, como dos compuestos capaces de inhibir la interacción entre *NCS-1* y Ric8a, presentando una mayor afinidad que **FD44**, el compuesto referencia hasta el momento. La identificación de estas dos nuevas moléculas abre el camino para el desarrollo de nuevas moléculas más afines por *NCS-1*, y aporta nuevas herramientas farmacológicas para posteriores estudios en modelos animales.

➤ Mediante la aplicación de técnicas de modelado molecular, se ha conseguido obtener un modelo por homología del dominio quinasa de MLK3. Tras su refinamiento con métodos de Monte Carlo híbrido y dinámica molecular este modelo ha mostrado mejores características geométricas, obteniéndose dos modelos representativos del dominio quinasa de MLK3.

➤ La realización de un cribado virtual de compuestos basado en la estructura modelada identificó nueve nuevos compuestos inhibidores de MLK3, con diversidad estructural entre ellos y valores de actividad que varían en el rango submicromolar a micromolar. Esta identificación ha permitido el inicio de un nuevo proyecto de Química Médica en la búsqueda y optimización de inhibidores selectivos y potentes de MLK3.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

*“Nuestras convicciones más arraigadas,
más indubitables, son las más sospechosas.*

*Ellas constituyen nuestro límite,
nuestros confines, nuestra prisión.”*

José Ortega y Gasset

Durante el desarrollo de ésta tesis doctoral se han publicado los siguientes trabajos:

PUBLICACIONES

Sebastián-Pérez, V.; Roca, C.; Awale, M.; Reymond, J. L.; Martínez, A.; Gíl, C.; Campillo, N. E. Medicinal and biological chemistry (MBC) library: An efficient source of new hits. *J Chem Inf Model.* **2017**;57(9):2143-2151

Ponzoni, I.; Sebastián-Pérez, V.; Requena-Triguero, C.; Roca, C.; Martínez, M. J.; Cravero, F.; Díaz, M. F.; Páez, J. A.; Arrayás, R. G.; Adrio, J.; Campillo, N. E. Hybridizing feature selection and feature learning approaches in QSAR modeling for drug discovery. *Sci Rep.* **2017**;7(1):2403

Palomo, V.; Pérez, D. I.; Roca, C.; Anderson, C.; Rodríguez-Muela, N.; Pérez, C.; Morales-Garcia, J. A.; Reyes, J. A.; Campillo, N. E.; Perez-Castillo, A. M.; Rubin, L. L.; Timchenko, L.; Gil, C.; Martínez, A. Subtly modulating glycogen synthase kinase 3 β : Allosteric inhibitor development and their potential for the treatment of chronic diseases. *J Med Chem.* **2017**;60(12):4983-5001

Chierrito, T. P. C.; Pedersoli-Mantoani, S.; Roca, C.; Requena, C.; Sebastian-Perez, V.; Castillo, W. O.; Moreira, N. C. S.; Pérez, C.; Sakamoto-Hojo, E. T.; Takahashi, C. S.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, F. J.; Campillo, N. E.; Martínez, A.; Carvalho, I. From dual binding site acetylcholinesterase inhibitors to allosteric modulators: A new avenue for disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* **2017**;139:773-791

Chierrito, T. P. C.; Pedersoli-Mantoani, S.; Roca, C.; Sebastian-Pérez, V.; Martínez-Gonzalez, L.; Pérez, D. I.; Pérez, C.; Canales, A.; Cañada, F. J.; Campillo, N. E.; Carvalho, I.; Martínez, A. Chameleon-like behavior of indolylpiperidines in complex with cholinesterase targets: Potent butyrylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem.* **2018**;145:431-444

LIBROS

Roca, C.; Sebastián-Pérez, V.; Campillo, N. E. In silico Tools for Target Identification and Drug Molecular Docking in Leishmania en Drug Discovery for Leishmaniasis. Ed. L. Rivas and C. Gil. *Royal Society of Chemistry.* **2018**, 130-152

