



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**DISEÑO DE FÁRMACOS BASADO
EN LA ESTRUCTURA**

Autor: SARA FONSECA GARCÍA

D.N.I.: 53665800S

Tutor: Mercedes Villacampa Sanz

Convocatoria: FEBRERO

1. RESUMEN

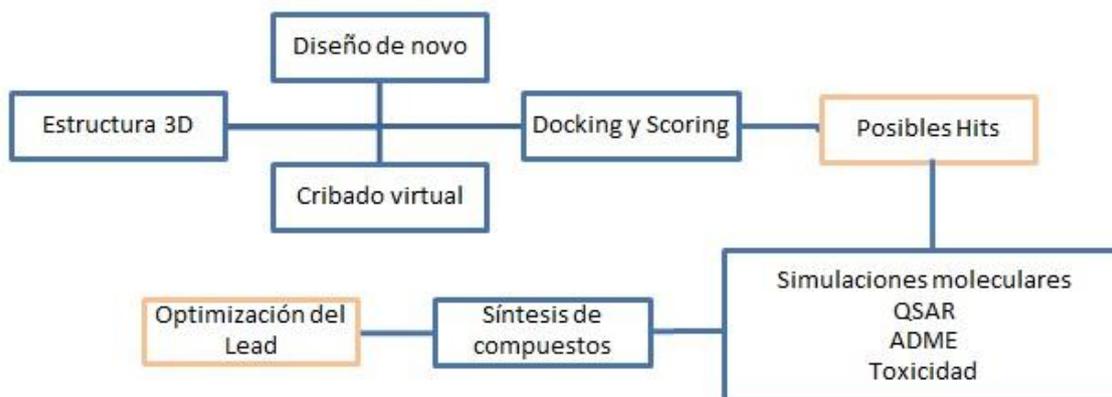
Gracias a los avances en cristalografía de rayos-x y en la resonancia magnética nuclear, es posible obtener las estructuras tridimensionales de distintas dianas terapéuticas. Con esta información se han desarrollado distintos métodos que permiten avanzar en el descubrimiento de nuevos fármacos a través de un diseño racional. Por un lado, es posible realizar búsquedas en bibliotecas de compuestos químicos para localizar estructuras que puedan unirse a las proteínas diana (virtual screening). También, es posible diseñar moléculas a partir de fragmentos capaces de interactuar con las dianas, conocido como síntesis de novo. Por otro lado, los programas de docking y scoring informan sobre las posibles conformaciones que pueden adoptar las moléculas candidatas, así como su afinidad por la proteína. De esta forma, se consigue diseñar fármacos con mayor afinidad y especificidad por las dianas, para así reducir los efectos adversos y conseguir terapias más dirigidas. Para ilustrar el funcionamiento de estos procesos, se pone de ejemplo el diseño de dos fármacos: RN486, para el tratamiento de la artritis reumatoide, e imatinib, utilizado en el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los métodos para el descubrimiento de fármacos han ido evolucionando desde 1960, junto con los avances en química orgánica, química analítica, bioquímica, farmacología, biología molecular y medicina, entre otras disciplinas. Anteriormente, se aislaban principios activos de plantas, en su mayoría alcaloides, para utilizarlos como base en la síntesis química (*Papaver somniferum*, *Atropa belladonna*, *Digitalis purpurea*,...).¹

Con los nuevos avances tecnológicos se ha conseguido facilitar el diseño de fármacos en varias etapas del proceso, reduciendo el número de posibles ligandos así como disminuyendo el coste y el tiempo. El diseño de fármacos basado en la estructura (structure-based drug design o SBDD) es un método que se centra en el conocimiento de la estructura 3D de la diana biológica. Ésta información se puede obtener a partir de distintas bases de datos, como Protein Data Bank (PDB). No se descubren fármacos directamente, sino que se descubren moléculas denominadas “lead” o “cabezas de serie”. Son compuestos que tienen unas características deseables para un fármaco pero que pueden tener algunos inconvenientes, como alta toxicidad, poca absorción u otras

actividades biológicas. Mediante modificaciones en su estructura podemos corregir estas características y obtener así un fármaco.²



El diseño de fármacos comienza con la identificación y validación de la estructura de la diana. La estructura tridimensional se puede obtener gracias a la cristalografía de rayos-x o la resonancia magnética nuclear (RMN). En los casos en los que no se disponga de la estructura, es posible predecir una similar mediante modelos de homología. Estos consisten en construir una estructura 3D a partir de proteínas homólogas. Existen diversos programas que realizan dichas predicciones. Una vez que disponemos de la estructura de la diana, se tiene que identificar el centro activo. A pesar de que es un trabajo difícil, debido a que pueden adoptar distintas conformaciones, se dispone de programas computacionales capaces de identificar los residuos del centro activo. Esta identificación se puede realizar de forma más rápida cuando se dispone de la estructura tridimensional del complejo de la diana con un ligado, ya sea agonista, antagonista o inhibidor. De esta forma se pueden observar directamente las interacciones que tienen lugar entre ambos.

El siguiente paso es la identificación de hits. Éstos son compuestos que tienen afinidad por la diana. Es posible que tengan una baja potencia y afinidad, pero mediante modificaciones se puede mejorar la actividad y distintas propiedades (solubilidad, toxicidad,...). Para identificar posibles hits se pueden buscar en bibliotecas de compuestos que interactúen con la diana, pero éstas son tan extensas que ralentizan el trabajo. Debido a esto hay dos métodos para la identificación de posibles hits: cribado virtual (o virtual screening) y síntesis de novo.

Cribado virtual

Son estudios en los que, a partir de bases de datos de moléculas, se buscan compuestos que cumplan unos requisitos necesarios para la actividad. Para ello se filtran en función de la energía de unión a la diana. A su vez, el cribado virtual se puede dividir en dos métodos: en función de la estructura (métodos directos) o en función del ligando (métodos indirectos). El primero es útil cuando se dispone de la estructura de la diana, mientras que el segundo usa modelos predictivos de la actividad de los compuestos.

Diseño de novo

Se basa en la construcción de una molécula a partir de pequeñas estructuras químicas con el fin de que pueda interactuar con el centro activo de la diana. El número de fragmentos que se pueden emplear en la construcción de la molécula y las posibles combinaciones es enorme. A la hora de diseñar los compuestos candidatos se tiene que tener en cuenta una serie de restricciones, que se obtienen a partir de la información proporcionada por las estructuras 3D de la diana y del ligando. En función de esto, el diseño estará basado en la diana o en el ligando.

– Diseño basado en la diana. Lo principal es conocer el centro activo, para así comprobar las restricciones que tiene que cumplir el ligando, así como las posibles interacciones que pueden tener lugar. Dichas interacciones pueden ser mediante enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o interacciones hidrofóbicas.

– Diseño basado en el ligando. Cuando no está disponible la estructura tridimensional de la diana pero se conocen la de distintos ligandos, se puede realizar el diseño del fármaco en función de éstos.

El diseño de las moléculas se puede realizar partiendo de átomos o de fragmentos. Por una parte, si se realiza a partir de átomos, hay una gran variedad de productos resultante, pero esto aumenta a su vez la dificultad de encontrar una molécula candidata. Por otro lado, si se parte directamente de fragmentos, se disminuye la búsqueda de compuestos. La forma de unión de los fragmentos puede ser por linking o growing.

- Linking: se añaden pequeños fragmentos a distintos residuos del centro activo de la diana. Después estos fragmentos se unen mediante linkers para formar un solo compuesto.

- Growing: se coloca un único fragmento en el centro activo y se va completando la molécula en función de la complementariedad con la diana y buscando el mayor número de interacciones posibles.

Docking y Scoring

Una vez que tenemos el ligando diseñado, el siguiente paso son los estudios de docking. Este proceso consiste en predecir la conformación y orientación del ligando dentro de la estructura de la diana. De esta forma podemos precisar el modo en que interacciona con la diana así como obtener datos acerca de la actividad.

El docking comienza colocando la molécula en el centro activo. El programa se puede configurar de tres modos: ligando y proteína rígidos, ligando flexible y proteína rígida, o ligando y proteína flexibles. El método más común es el de ligando flexible y proteína rígida. El programa mueve el ligando por el centro activo de la diana y, a su vez rota los enlaces. Para cada conformación, denominadas poses, se añaden algoritmos que predicen la actividad biológica evaluando las interacciones entre el ligando y la proteína.

El proceso se completa añadiendo unas funciones que evalúan la afinidad que tiene el ligando por la diana. Este proceso complementario recibe el nombre de scoring, cuyo objetivo es determinar las mejores conformaciones o poses.

Una vez terminados estos procesos, si los resultados de los estudios son favorables y se piensa que las moléculas resultantes son posibles hits, se pasa a realizar simulaciones moleculares, en las que se continúa evaluando las distintas poses. A continuación, se cuantifica la relación entre la estructura de la molécula y la actividad (QSAR) y se estudia su farmacocinética y la toxicidad. El siguiente paso consistiría en la síntesis de los compuestos y su uso en ensayos biológicos. Si dichos ensayos resultan satisfactorios y los fármacos tienen la potencia deseada sólo faltaría optimizar el lead y realizar los ensayos experimentales.³⁻⁵

3. OBJETIVOS

Este trabajo consiste en una pequeña revisión bibliográfica acerca del diseño de fármacos basada en la estructura. A modo de ilustrar el funcionamiento del proceso y el

razonamiento que se sigue, se han buscado dos ejemplos que sirven de modelo de métodos directos e indirectos del diseño racional de fármacos.

4. METODOLOGÍA

A través de búsquedas en distintas bases de datos informatizadas se han obtenido artículos científicos para la realización del trabajo. Dichas bases de datos son PubMed, ScienceDirect, BUCea y Google Académico. Además, se han consultado libros de química farmacéutica y farmacología.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para ilustrar la información detallada en la introducción, se detallan unos ejemplos del diseño de fármacos basado en la estructura de la diana o del ligando.

5.1. Método directo: Diseño en función de la estructura de la proteína

5.1.1. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una patología autoinmune que cursa con dolor, inflamación, rigidez y pérdida de la función de las articulaciones, principalmente de las muñecas y los dedos. Aunque hay distintos tratamientos biológicos, existe la necesidad de descubrir nuevos fármacos para los pacientes que no responden a las terapias actuales. Se ha considerado como diana terapéutica la proteína kinasa de Bruton (BTK), la cual está implicada en el desarrollo, diferenciación y señalización de los linfocitos B.

Cuando BTK está activada, mediante fosforilación previa por otras kinasas, es capaz de activar a su vez a la fosfolipasa C- γ (PLC- γ). Esto conduce al inicio de diversos procesos, como el transporte de calcio, la activación de NF- κ B y la generación de anticuerpos. Se piensa que BTK también es mediadora en la señalización de la inflamación.⁶

5.1.2. Diseño de RN486

Debido a que ya se habían sintetizado inhibidores de BTK, se partió del complejo ligando-diana cristalografiado en PDB con distintos inhibidores. Se estudió en concreto la interacción del compuesto 1 con BTK. Se observó que había varios grupos

importantes en la interacción con la diana: el grupo benzamida terciario, el grupo fenilo que sirve como unión entre la pirazina y la amida, el t-butilo y la amida secundaria.

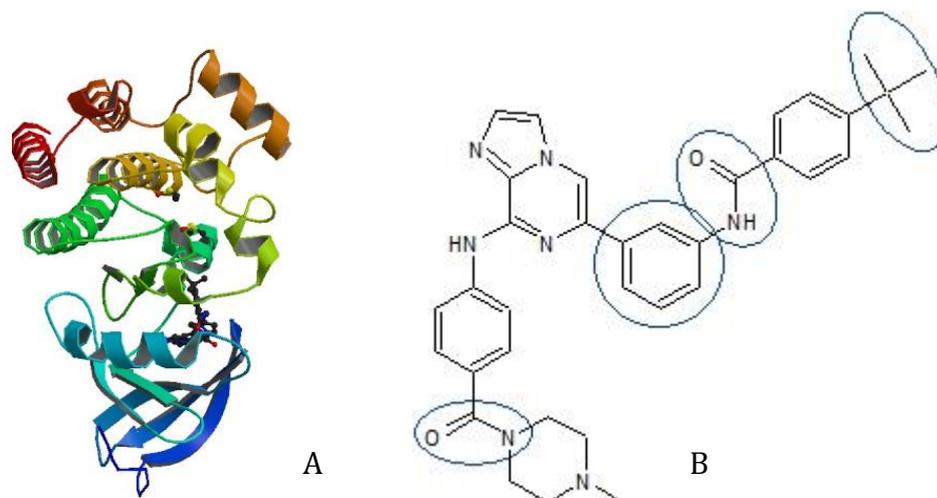
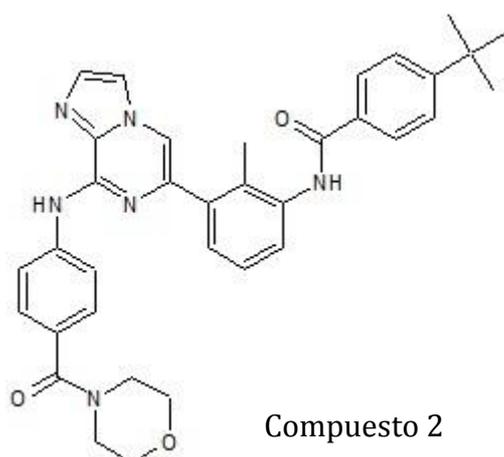


Figura 1: **A.** Compuesto 1 cristalografiado con la proteína BTK (PDB referencia 4OT5). **B.** Compuesto 1 con los principales grupos responsables de la interacción con la diana resaltados.

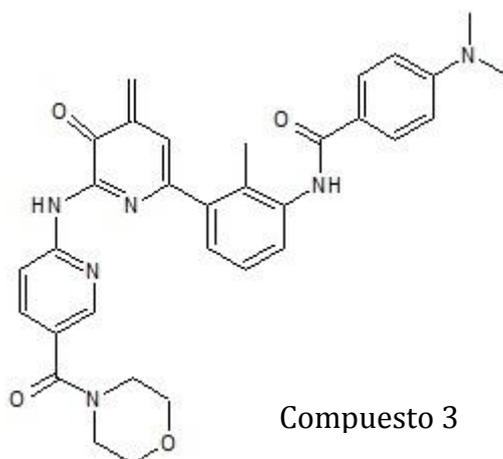
Después se llevaron a cabo una serie de modificaciones en la estructura. Primero se intentó sustituir el grupo t-butilo, pero se observó que perdía afinidad y especificidad por BTK. Después se observó que la introducción de un grupo metilo aumentaba la potencia, pero con una baja absorción debido a la alta lipofilia y elevado peso molecular (compuesto 2).



Compuesto 2

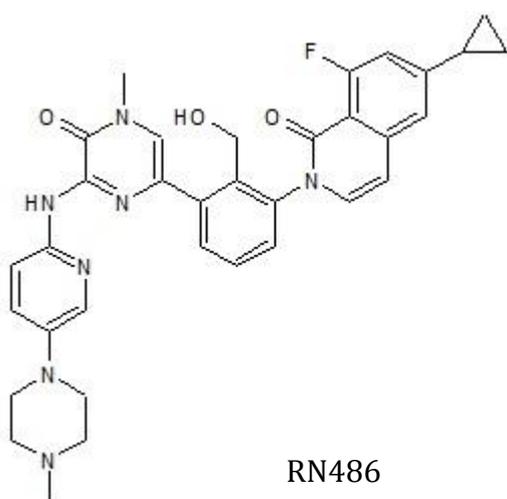
Debido a que este compuesto tenía una buena selectividad por la diana, se realizaron cambios en su estructura para disminuir la lipofilia, y así conseguir una mejor solubilidad. Se obtuvieron distintos derivados en los que se modificaron el anillo de pirazina, la morfolina y el grupo t-butilo. Se encontraron entonces con diversos

inconvenientes, como la disminución de la actividad o la rápida metabolización. Se estudió el compuesto 3 con el fin de encontrar nuevas modificaciones que aumentaran el número de interacciones con la proteína.



Compuesto 3

Dado el compuesto 3, se añadió un grupo hidroxilo al metilo del anillo central para que pudiera interactuar mediante enlaces de hidrógeno. Esta modificación conllevó un aumento de la afinidad. Sin embargo, en una posterior identificación de los metabolitos, se observó que se formaba una anilina a partir de la hidrólisis de la amida secundaria. Debido a que las anilinas tienen un conocido riesgo de mutagenicidad se estudiaron distintos bicíclicos para evitar esta toxicidad. También se cambió el anillo de morfolina por una N-metilpiperazina para aumentar la solubilidad, ya que contiene una amina terciaria ionizable. El grupo N,N-dimetil se sustituyó por un ciclopropilo para evitar la oxidación, y se añadió un átomo de flúor que interactúa de forma electrostática con la proteína. De esta forma, obtuvieron el compuesto 4, denominado RN486.⁷



RN486

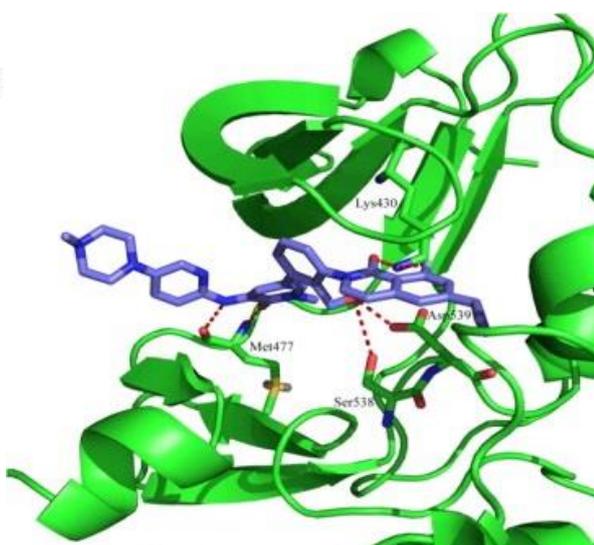


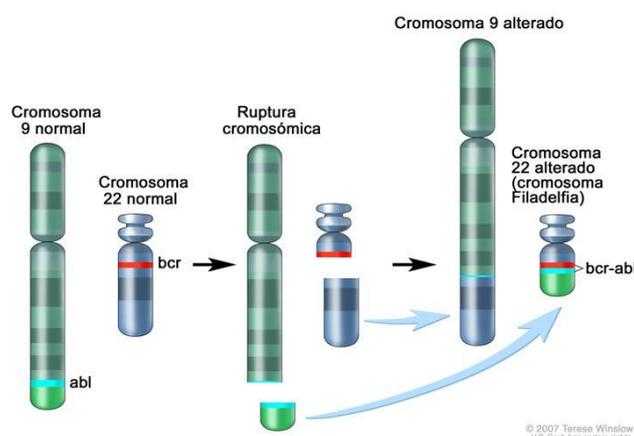
Figura 3: Interacción de RN486 con BTK.⁸

RN486 ha demostrado mantener la potencia y la selectividad en ensayos celulares, y se ha visto que es activo en roedores. Previene el efecto inflamatorio, el daño de los cartílagos y la resorción ósea.⁹

5.2. Método indirecto: Diseño en función de la estructura del ligando

5.2.1. Leucemia mieloide crónica

El imatinib (Glivec® o Gleevec®) es un inhibidor de tirosina kinasa empleado en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). Ésta enfermedad se caracteriza por una excesiva proliferación de células mieloides. En condiciones normales, el gen *abl* (presente en el cromosoma 9) codifica la proteína cABL, la cual tiene un papel fundamental en la proliferación celular, la adherencia y la apoptosis. En la LMC, se produce una translocación entre los cromosomas 9 y 22 de las células madre hematopoyéticas. La versión corta del cromosoma 22 se conoce como “cromosoma Philadelphia”. Este acortamiento tiene como consecuencia la creación del gen *bcr-abl*, que codifica una proteína (BCR-ABL) con una elevada actividad tirosina kinasa. Dicha proteína se ha encontrado en el 95% de los pacientes con LMC.¹⁰

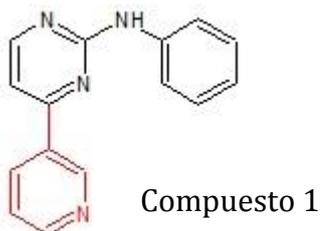


La consecuencia de dicha mutación implica un fallo en la regulación de la proliferación, la disminución de la capacidad de adherencia de las células al estroma de la médula ósea y una disminución de la apoptosis cuando se dan estímulos mutagénicos. Al no desarrollarse los granulocitos en linfocitos maduros, hay una disminución de células maduras en sangre y, por lo tanto, una mayor susceptibilidad a infecciones.¹¹

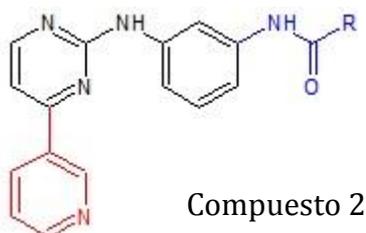
Existen un elevado número de serina/treonina y tirosina kinasas, las cuales tienen como ligando el ATP. El sitio de unión está bastante conservado, por lo que es bastante complicado encontrar una molécula que inhiba sólo a una kinasa.

5.2.2. Diseño del imatinib

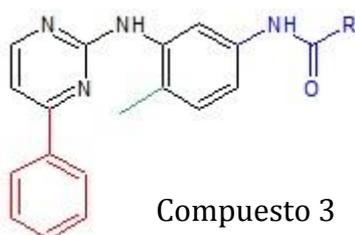
Lo primero que se hizo para buscar un posible lead fue un cribado entre los inhibidores de la proteína kinasa C (PKC), entre los que se encontró un derivado de 2-fenilaminopirimidina con un resto 3'-piridil en la posición 4 de la pirimidina (compuesto 1).



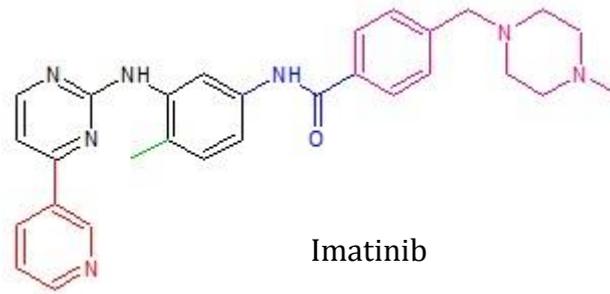
Se buscaron modificaciones para conferir a la molécula actividad inhibitoria de tirosinas kinasas. Para ello se añadió un grupo amida en el resto fenilo (compuesto 2).



Buscaron entonces aumentar la selectividad y la potencia frente a BCR-ABL kinasa introduciendo un grupo metilo (compuesto 3). Este cambio eliminó la actividad inhibitoria frente a PKC pero mantuvo la actividad frente a la tirosina kinasa.



Llegados a este punto se observó que la molécula resultante tenía poca biodisponibilidad oral y baja solubilidad en agua. Para mejorarlo se adicionó un grupo N-metilpiperazina. Para eliminar el potencial mutagénico del fragmento de anilina, se introdujo un grupo metilo entre el resto fenilo y el átomo de nitrógeno, quedando como molécula resultante el imatinib.



Después de sintetizar el fármaco, se realizaron estudios de docking y cristalografía de rayos-x, que reflejaron que el Imatinib se une al sitio de unión del ATP. También se vió que se une con gran especificidad a la forma inactiva de la enzima, y que el grupo N-metilpiperazina (cuya finalidad era mejorar la biodisponibilidad) se une fuertemente a la proteína mediante enlaces de hidrógeno.

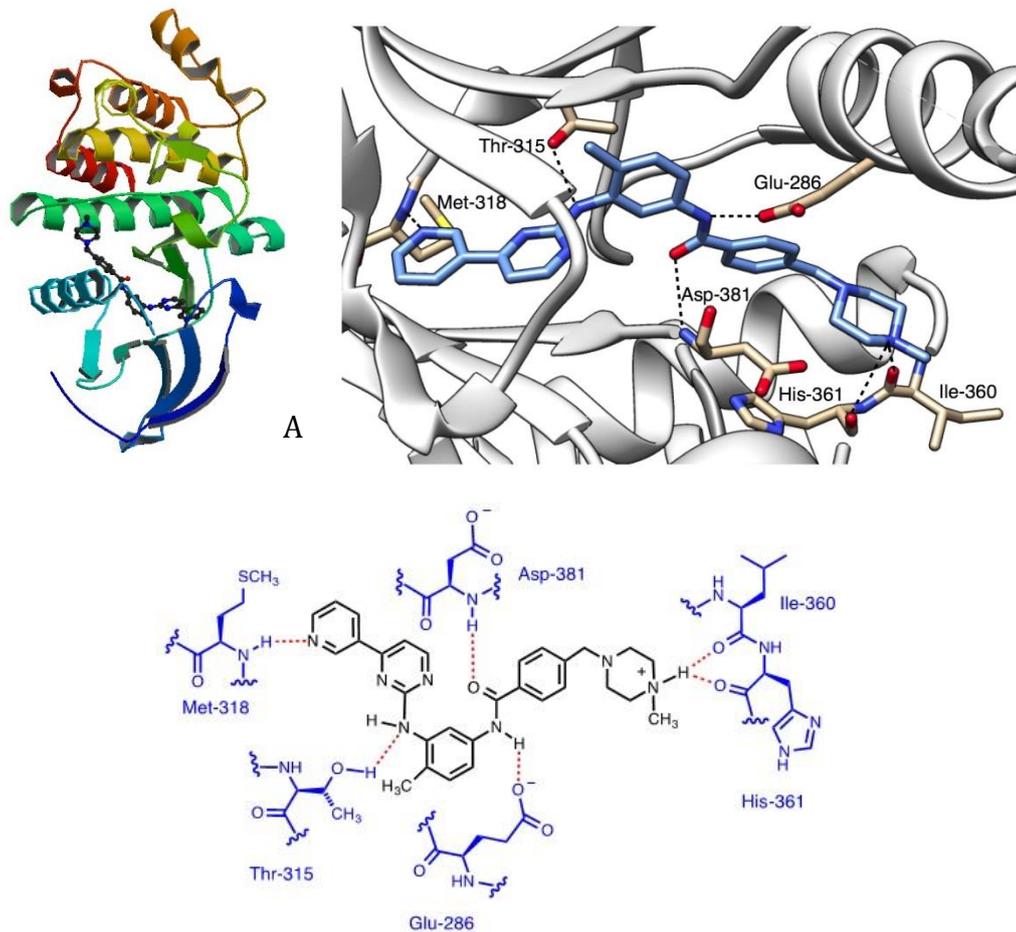


Figura 2: **A**, **B**. Estructura recogida de PDB que se corresponde al complejo BCR-ABL-imatinib (referencia 2HYY). **C**. Interacciones que tienen lugar entre el imatinib y la enzima.

Además de inhibir a la Bcr-Abl kinasa, también se une al receptor PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y al receptor Kit (presente en grandes concentraciones en células tumorales).

En ensayos posteriores se pudo ver que el imatinib produce la apoptosis en líneas celulares BCR-ABL positivas. Además, induce la muerte celular en células leucémicas primarias de pacientes con cromosoma Philadelphia y pacientes con leucemia linfoblástica aguda.^{11,12}

Actualmente, hay varios inhibidores de tirosina kinasa aprobados por la AEMPS para el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica. El imatinib es el tratamiento de elección debido a la amplia experiencia de uso y a los menores efectos adversos que produce en comparación con el resto.

6. CONCLUSIONES

Después de realizar una breve revisión bibliográfica acerca del diseño de fármacos, se puede concluir que el avance en las tecnologías facilita mucho el proceso, tanto a nivel del conocimiento de las dianas terapéuticas, como a la hora de determinar las interacciones entre las moléculas y las proteínas. De esta forma se pueden diseñar fármacos con una mayor afinidad, especificidad y menores efectos adversos.

A pesar de que se ha avanzado mucho en los últimos años, todavía hay aspectos que se pueden mejorar. Por ejemplo, estos métodos no prevén posibles cambios que puede sufrir la proteína cuando el ligando se une, ni la participación que pueden tener las moléculas de agua en las interacciones. Además, en ocasiones se pueden diseñar moléculas que luego en la práctica son muy complicadas de sintetizar.

De todas formas no hay lugar a dudas de que el diseño de fármacos basado en la estructura es un método que permite unos grandes avances en la terapéutica. Esto lo hemos podido comprobar con los dos ejemplos expuestos en este trabajo. Por un lado, RN486 está en estudio y parece tener buenas características de cara al tratamiento de la artritis reumatoide. Y, por otro lado, el imatinib es un fármaco ya utilizado desde hace años en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica con buenos resultados, siendo el fármaco de elección.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Vogel, H., editor. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. 2nd ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; **2002**.
2. Silverman, R. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. 2nd ed.: Elsevier; **2014**.
3. 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** 11;3(11):935-949.
4. Kalyaanamoorthy, S.; Chen, Y. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov Today* **2011** 9;16(17-18):831-839.
5. Schneider, G.; Fechner, U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 649-663
6. Pan, Z.; Scheerens, H.; Li, S.; Schultz, B. E.; Sprengeler, P. A.; Burrill, L. C.; Shyr-Jiann, L.; Mendoca, R. V.; Sweeney, M. D.; Scott, K. C. K.; Grothaus, P. G.; Jeffery, D. A.; Spoerke, J. M.; Honigberg, L. A.; Young, P. R.; Dalrymple, S. A.; Palmer, J. T. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* **2007** 2(1):58-61.
7. Lou, Y.; Han, X.; Kuglstatler, A.; Kondru, R. K.; Sweeney, Z. K.; Soth, M.; McIntosh, J.; Litman, R.; Suh, J.; Kocer, B.; Davis, D.; Park, J.; Frauchiger, S.; Dewdney, N.; Zecic, H.; Taygerly, J. P.; Sarma, K.; Hong, J.; Hill, R. J.; Gabriel, T.; Goldstein, D. M.; Owens, T. D. Structure-based drug design of RN486, a potent and selective Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, for the treatment of rheumatoid arthritis. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 512-516
8. Zhao, X.; Xin, M.; Huang, W.; Ren, Y.; Jin, Q.; Tang, F.; Jiang, H.; Wang, Y.; Yang, J.; Mo, S.; Xiang, H. Design, synthesis and evaluation of novel 5-phenylpyridin-2(1H)-one derivatives as potent reversible Bruton's tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 23 (**2015**) 348-364
9. Xu, D.; Kim, Y.; Postelnek, J.; Vu, M. D.; Hu, D. Q.; Liao, C.; Bradshaw, M.; Hsu, J.; Zhang, J.; Pashine, A.; Srinivasan, D.; Woods, J.; Levin, A.; O'Mahony, A.; Owens, T. D.; Lou, Y.; Hill, R. J.; Narula, S.; DeMartino, J.; Fine, J. S. RN486, a selective

Bruton's tyrosine kinase inhibitor, abrogates immune hypersensitivity responses and arthritis in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* **2012**, 341, 90-103.

10. Druker, B. J.; Lydon, N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **2000**, 105, 3-7.

11. Manley, P. W.; Cowan-Jacob, S. W.; Buchdunger, E.; Fabbro, D; Fendrich, G; Furet, P.; Meyer, T.; Zimmermann, J. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur. J. Cancer* **2002** 9;38, Supplement 5:S19-S27.

12. Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002** 07;1(7):493.