

Estrategias *in silico* para el diseño y selección de compuestos con potencial aplicación en la enfermedad de Alzheimer

••• La enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades más devastadoras de nuestra sociedad, y debido a su creciente incidencia en la población, un importante problema de salud pública. La falta de agentes terapéuticos y de diagnóstico, unívocos y rigurosos para dicha enfermedad requiere un enfoque multidisciplinar donde la química computacional puede tener un papel relevante en el desarrollo de nuevos fármacos.

Cristina Rodríguez-Rodríguez, Albert Rimola, Jorge Alí-Torres, Pilar González-Duarte,* Mariona Sodupe*

Departamento de Química, Universidad Autónoma de Barcelona, Red de Referencia en Química Teórica y Computacional (XRQTC)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia neurodegenerativa, afectando directamente alrededor del 10% de la población a los 65 años de edad y hasta el 40% a partir de los 85 años.¹ Se caracteriza por una alteración progresiva e irreversible de las funciones cognitivas debido a la muerte neuronal. El análisis histopatológico del cerebro afectado por la EA permite observar la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares y las placas seniles formadas por depósitos extracelulares del péptido beta-amiloide (A β).^{2,3} Estas placas son las lesiones más abundantes observadas en cerebros *post-mortem* de pacientes afectados por la EA y su análisis muestra que contienen altas concentraciones (~

mM) de iones metálicos (Fe³⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺),⁴ lo que sugiere que la agregación del péptido A β podría estar mediada por algunos de estos iones esenciales. Adicionalmente, estudios *in vitro* han revelado que la presencia de iones metálicos en el medio promueve la agregación del péptido A β ,⁵⁻⁷ y que los depósitos proteínicos formados pueden ser disgregados por agentes quelantes capaces de secuestrar estos iones metálicos.^{8,9} Las evidencias aportadas sobre la participación de los iones metálicos en la precipitación del péptido A β han abierto la posibilidad de utilizar dichos iones metálicos como posibles dianas terapéuticas.^{8,10-14} De entre los diferentes agentes quelantes estudiados hasta la fecha, el clioquinol (HCQ, 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinoleína) ha resultado ser particularmente eficiente no sólo en experimentos *in vitro* sobre tejidos cerebrales sino también en estudios preliminares de ensayos clínicos.¹⁵ A pesar de que la toxicidad observada ha impedido que se continuaran las pruebas clínicas, los resultados

obtenidos han impulsado con fuerza una nueva línea de investigación para el tratamiento de la EA basada en el desarrollo de agentes quelantes multifuncionales, una nueva generación de ligandos que incluyen un fragmento capaz de coordinar a los iones metálicos y a su vez contienen otros grupos funcionales que facilitan la llegada a la diana terapéutica y aseguran su eficacia. Las estrategias *in silico* tienen un papel muy importante durante la etapa de diseño de dichas moléculas multifuncionales puesto que ayudan a identificar y eliminar aquellas moléculas con pocas probabilidades de éxito, reduciendo así de forma considerable los costes económicos y el tiempo asociado a la obtención de un nuevo fármaco.

Estrategias *in silico* para el diseño de ligandos multifuncionales.

El estudio computacional de las propiedades coordinantes de ligandos con metales de transición requiere el uso de métodos químico-cuánticos. Por otra

parte, los ligandos seleccionados, además de comerciales, deben cumplir una serie de propiedades farmacocinéticas. En este artículo se describe una metodología de trabajo *in silico* que combina los procedimientos usados habitualmente en el diseño de fármacos con cálculos químico-cuánticos para seleccionar compuestos comerciales con propiedades farmacocinéticas adecuadas para actuar como agentes quelantes en la EA. Este protocolo sigue básicamente cuatro etapas: a) diseño del esqueleto molecular, b) búsqueda de compuestos que contengan dicho esqueleto en bases de datos comerciales, c) aplicación de técnicas quimioinformáticas para el cribado virtual y d) determinación de la estructura electrónica y molecular de los complejos formados por los ligandos seleccionados con el ión metálico a estudiar y de sus constantes de estabilidad mediante cálculos químico-cuánticos. Como ejemplo de aplicación de este protocolo, a continuación se detallan los pasos seguidos para la selección de

compuestos quelantes de Cu(II), un catión metálico que además de estar implicado en la agregación del péptido β -amiloidé, tiene un papel relevante en la formación de especies reactivas de oxígeno y en la muerte neuronal progresiva.

Diseño del esqueleto básico del ligando

El punto de partida para el diseño de agentes quelantes tiene en cuenta las propiedades de coordinación y la química bioinorgánica del metal a secuestrar. Así, de acuerdo con la química de coordinación del Cu(II), éste tiene tendencia a formar complejos plano-cuadrados así como a enlazarse a átomos donadores de N u O. Estudios experimentales sobre el complejo de Cu(II)-A β indican que el catión metálico puede interactuar con el péptido A β a través de los átomos de N provenientes de los residuos de histidina (His6, His13 e His14), y de átomos de O provenientes de un grupo carboxilato o de un grupo carbonil peptídico.¹⁶⁻¹⁸ Como se ha comentado anteriormente, el HCQ, un compuesto derivado de la 8-hidroxi-quinoleína, con un N pirimidínico y un grupo OH, se propuso como agente terapéutico en la EA gracias a sus excelentes propiedades coordinantes.

Con el propósito de obtener un compuesto multifuncional, el agente quelante puede diseñarse para incorporar, además de propiedades coordinantes, propiedades antioxidantes que permitan reducir la neurotoxicidad de la EA y propiedades intercalantes a las fibras amiloides, para poder ser utilizado como agente de diagnóstico.

En base a lo anterior, el punto de partida para diseñar el esqueleto molecular básico fue una de las moléculas más ampliamente utilizadas como agente de tinción para detectar placas seniles,¹⁹ gracias a sus propiedades fluorescentes y a su gran afinidad por los agregados de

A β : la tioflavina-T (ThT). Con la intención de proporcionar a la molécula un entorno de coordinación adecuado para el ión Cu(II) nos inspiramos en el mencionado HCQ, obteniendo el esqueleto molecular M1 (Figura 1), que combina las excelentes propiedades fluorescentes de la ThT así como las propiedades coordinantes del HCQ (zona resaltada en la Figura 1). M1, además, no tiene carga positiva, hecho que incrementa su hidrofobicidad facilitando su paso a través de la barrera hematoencefálica.

Selección de los mejores compuestos comerciales mediante cribado virtual

La búsqueda de moléculas con unas determinadas características en distintas bases de datos es un proceso muy habitual en el diseño racional de fármacos, ya que reduce costes y tiempo.²⁰⁻²² En el caso que aquí nos concierne, el cribado virtual se divide en dos etapas sucesivas: i) identificar en varias bases de datos todas aquellas moléculas comerciales que contengan M1 en su estructura y ii) de entre todas las moléculas seleccionadas en la etapa anterior eliminar todas aquellas que no cumplan una serie de requisitos químicos y farmacocinéticos necesarios para tratar la EA.

El primer cribado se ha realizado usando eMolecules Inc.,²³ un portal web que permite la búsqueda de compuestos químicos entre un total de unos 8 millones de estructuras químicas procedentes de unos 150 proveedores. En la Tabla 1 se muestra que el número total de compuestos comerciales encontrados que contienen M1, para X = O, S, y NH y R = OH y NH₂ es 2881. Una vez generada la quimioteca virtual con los compuestos comerciales que contienen M1, debe realizarse un cribado virtual, mediante la aplicación de determinados filtros, que permita seleccionar los

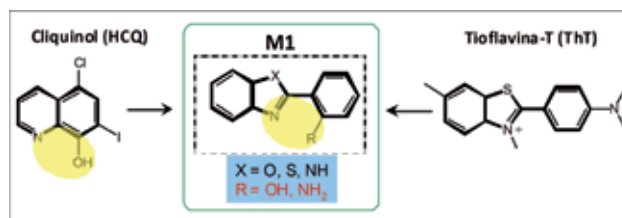


Figura 1. La combinación de las principales características de la ThT como agente intercalante y del HCQ como agente quelante proporcionan el esqueleto molecular M1 con propiedades intercalantes y coordinantes.

M1	X					
	O		S		N	
R	OH	NH ₂	OH	NH ₂	OH	NH ₂
Número de compuestos comerciales ^[a]	1986	9	804	11	61	10
Filtro 1	676	6	247	4	16	5
Filtro 2 MW=450	398	6	173	2	15	5
Filtro 3 Reglas de Lipinski ^[b]	300	6	81	2	15	5
Filtro 4 Log BB ^[c]	19	5	5	0	5	2

Tabla 1. Número de compuestos comerciales que contienen el esqueleto molecular M1 (ver Figura 1) y satisfacen las distintas restricciones impuestas. [a] búsqueda realizada mediante eMolecules (febrero 2008). [b] Reglas de Lipinski: clogP \leq 5; HBD $<$ 5; HBA $<$ 10 (HBD i HBA se definen en el texto). [c] log BB = $-0.0148 \cdot \text{TPSA} + 0.152 \cdot \text{clogP} + 0.139$

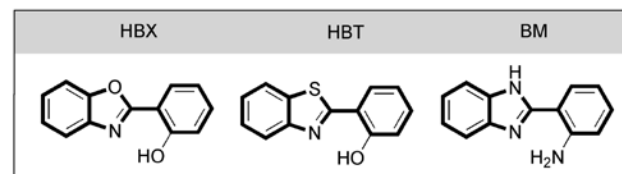


Figura 2. Compuestos comerciales seleccionados

mejores candidatos para su uso posterior en medios fisiológicos. El primer filtro establece que la posición *para* con respecto a R del anillo bencénico tiene que estar libre para poder ser yodada, de modo que los compuestos resultantes puedan ser utilizados para detección radioisotópica.

El segundo filtro está inspirado en las reglas de Lipinski,²⁰ comúnmente utilizadas para determinar si un compuesto químico con actividad farmacológica puede utilizarse como fármaco. Estas reglas establecen que todos los compuestos que satisfagan las siguientes propiedades pueden ser potenciales fármacos (*drug-like*): masa molecular inferior a 450, coeficiente de partición octanol/agua (clogP) menor que 5 y número de átomos donadores (HBD) y

aceptores (HBA) de enlaces de hidrógeno inferior a 5 y a 10, respectivamente.^{21,24} El tercer filtro implica el cálculo de log BB, una medida habitual sobre la capacidad de un compuesto para atravesar la barrera hematoencefálica (Blood-Brain Barrier, BBB). Este parámetro se calcula mediante la ecuación de Clark²¹ ($\log \text{BB} = -0.0148 \cdot \text{TPSA} + 0.152 \cdot \text{clogP} + 0.139$, donde TPSA (“topological polar surface area”) es un descriptor que se correlaciona muy bien con el transporte a través de membranas^{25,26} y a partir del cual se ha establecido que moléculas con valores de log BB ≥ -0.3 son capaces de cruzar la BBB.²⁷ Aplicando estos tres filtros al conjunto de compuestos que contienen el esqueleto M1, el número de moléculas se reduce a 36 (ver

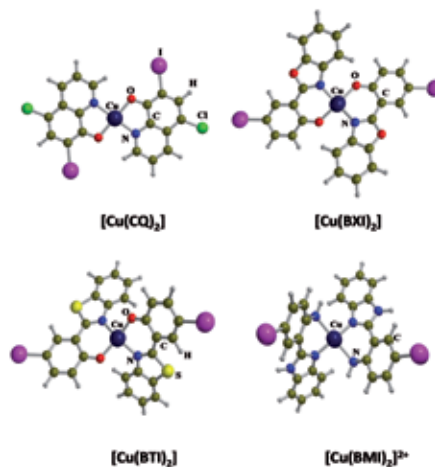


Figura 3. Estructura molecular de los complejos CuL_2 ($L=CQ$, BXI , BTI y BMI) determinada con el método químico-cuántico B3LYP. Los ligandos HCQ , $HBXI$, $HBTI$ desprotonan al formar el complejo.

Tabla 1.) De entre todos estos productos, y basándonos en criterios de simplicidad, se han escogido los tres cabezas de serie mostrados en la Figura 2: 2-(2-hydroxyphenyl)-benzoxazole (HBX), 2-(2-hydroxyphenyl)-benzothiazole (HBT), y el 2-(2-aminophenyl)-1H-benzimidazole (BM).

Caracterización químico-cuántica de los complejos de Cu(II) con los ligandos seleccionados.

Una vez seleccionados los agentes quelantes, la química cuántica nos permite caracterizar los complejos que estos ligandos formarán con el Cu(II), es decir, determinar su estructura electrónica y molecular. Asimismo, a partir de estos datos se pueden estimar valores de constantes de estabilidad ($\log \beta_2$). En la Figura 3 se muestran las estructuras determinadas con el método DFT/B3LYP para los compuestos de Cu(II) con los ligandos seleccionados y con el clioquinol.

A partir de estos cálculos se ha podido determinar que la coordinación del Cu(II) en los complejos $[Cu(BXI)_2]$ y $[Cu(BTI)_2]$ tiene lugar a través de los átomos de N y O y no a través del O o del S de los fragmentos oxazol y tiazol,

respectivamente, mientras que en el $[Cu(BMI)_2]^{2+}$ la coordinación es a través de los átomos de N de los fragmentos imidazol y anilina. Las geometrías optimizadas muestran efectivamente una disposición de tipo plano-cuadrado en el entorno del Cu(II) aunque moderadamente distorsionada, tal y como nos

revela el ángulo diedro entre los anillos metalados (3, 13 y 26 grados en el $[Cu(BXI)_2]$, $[Cu(BTI)_2]$ y $[Cu(BMI)_2]^{2+}$, respectivamente). Esta distorsión resulta de la naturaleza del ligando y determina en parte la estabilidad del complejo. Asimismo, los cálculos químico-cuánticos permiten analizar la estructura electrónica del complejo y los cambios inducidos al introducir heteroátomos en el fragmento indol, que modulan las capacidades coordinantes del ligando. Por otra parte, además de proporcionar información sobre su estructura molecular y electrónica, los cálculos químico-cuánticos permiten estimar el valor de las constantes de estabilidad de los complejos de Cu(II). Los valores calculados indican que estos compuestos tienen una buena capacidad quelante y que ésta sigue la tendencia: $HCQ \sim HBXI > HBTI > BMI$, en buen acuerdo con los resultados experimentales, lo que valida el protocolo seguido para la determinación de las constantes de estabilidad.

Conclusión

Este artículo pone de manifiesto la utilidad de la química computacional en el desarrollo de nuevos fármacos. En par-

ticular, se describe una metodología basada en técnicas *in silico* que permite identificar compuestos comerciales con propiedades adecuadas para su potencial aplicación en la EA. Dicha estrategia combina herramientas habitualmente utilizadas en el diseño de fármacos, como son el cribado virtual de bases de datos con cálculos químico-cuánticos. Ello nos ha permitido seleccionar, de entre todas las moléculas que contiene una base de datos comercial, aquellas que presentan una mayor probabilidad de éxito para nuestro propósito. Como resultado de dicho proceso se han seleccionado tres compuestos multifuncionales, HBX, HBT y BM, cuyo esqueleto molecular presenta propiedades quelantes-intercalantes, además de propiedades farmacocinéticas adecuadas para su uso como fármaco, como por ejemplo la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Adicionalmente, la presencia de un anillo fenol o anilina en su estructura les confiere propiedades antioxidantes y facilita su yodación para su potencial aplicación en el tratamiento y diagnóstico de la EA. La capacidad coordinante de los compuestos seleccionados en presencia de iones Cu(II) ha sido demostrada mediante ensayos de turbidimetría.²⁸ Asimismo, medidas de fluorescencia de dichos compuestos en presencia de fibras de amiloides han puesto de manifiesto sus propiedades intercalantes y, por tanto, su potencial aplicación en la detección radioisotópica de depósitos A β en el cerebro. En resumen, los compuestos comerciales escogidos mediante estrategias *in silico* tienen las características de hidrofobicidad, de coordinación y capacidad de yodación adecuadas para su aplicación como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico en la EA.

Referencias:

- http://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_figures.asp, 2010.
- Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* 2002, 297, 353-356.
- Selkoe, D. J. *Physiol. Rev.* 2001, 81, 741-766.
- Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R. *J. Neuro. Sci.* 1998, 158, 47-52.
- Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Huang, X.; Scarpa, R. C.; Bacarra, N. M. E.; Romano, D. M.; Hartshorn, M. A.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 12817-12826.
- Mantyh, P. W.; Ghilardi, J. R.; Rogers, S.; Demaster, E.; Allen, C. J.; Stimson, E. R.; Maggio, J. E. *J. Neurochem.* 1993, 61, 1171-1174.
- Esler, W. P.; Stimson, E. R.; Jennings, J. M.; Ghilardi, J. R.; Mantyh, P. W.; Maggio, J. E. *J. Neurochem.* 1996, 66, 723-732.
- Cherry, R. A.; Atwood, C. S.; Xilinas, M. E.; Gray, D. N.; Jones, W. D.; McLean, C. A.; Barnham, K. J.; Voltakis, I.; Fraser, F. W.; Kim, Y.-S.; Huang, X.; Goldstein, L. E.; Moir, R. D.; Lim, J. T.; Beyreuther, K.; Zheng, H.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *Neuron* 2001, 30, 665-676.
- Cherry, R. A.; Legg, J. T.; McLean, C. A.; Fairlie, D. P.; Huang, X. D.; Atwood, C. S.; Beyreuther, K.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 23223-23228.
- Liu, G.; Men, P.; Harris, P. L. R.; Rolston, R. K.; Peery, G.; Smith, M. A. *Neuroscience Letters* 2006, 406, 189-193.
- Scott, L. E.; Orvig, C. *Chem. Rev.* 2009, 109, 4885-4910.
- Hindo, S. S.; Mancino, A. M.; Braymer, J. J.; Liu, Y. H.; Vivekanandan, S.; Ramamoorthy, A.; Lim, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 16663-+.
- Barnham, K. J.; Cherry, R. A.; Cappai, R.; Melov, S.; Masters, C. L.; Bush, A. I. *Drug Des. Rev. - Online* 2004, 1, 75-82.
- Bush, A. I.; Pettingell, W. H.; Multhaup, G.; Parradi, M. d.; Vonsattel, J.-P.; Gusella, J. F.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E. *Science* 1994, 265, 1464-7.
- Ritchie, C. W.; Bush, A. I.; Mackinnon, A.; Macfarlane, S.; Mastwyk, M.; MacGregor, L.; Kiers, L.; Cherry, R.; Li, Q. X.; Tammer, A.; Carrington, D.; Mavros, C.; Voltakis, I.; Xilinas, M.; Ames, D.; Davis, S.; Voltakis, I.; Xilinas, M.; Ames, D.; Davis, S.; Beyreuther, K.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L. *Archives of Neurology* 2003, 60, 1685-1691.
- Drew, S. C.; Masters, C. L.; Barnham, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 8760-8761.
- Dorlet, P.; Gambarelli, S.; Faller, P.; Hureau, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 9273-9276.
- Hureau, C.; Coppel, Y.; Dorlet, P.; Solari, P. L.; Sayer, S.; Guillon, E.; Sabater, L.; Faller, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 9522-9525.
- Levine, H.; 3rd Protein. *Sci.* 1993, 2, 404-410.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Del. Rev.* 1997, 23, 3-25.
- Clark, D. E.; Pickett, S. D. *Drug Discov. Today* 2000, 5, 49-58.
- Hann, M. M.; Oprea, T. I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, 8, 255-263.
- eMolecules Inc., (www.emolecules.com/).
- Waterbeemd, H. v. d.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A. *J. Drug Targeting* 1998, 6, 151-165.
- Clark, D. E. *J. Pharm. Sci.* 1999, 88, 815-821.
- Goodwin, J. T.; Clark, D. E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 315, 477-483.
- Mestres, J., comunicación personal.
- Rodríguez-Rodríguez, C.; de Groot, N. S.; Rímola, A.; Alvarez-Larena, A.; Lloveras, V.; Vidal-Gancedo, J.; Ventura, S.; Vendrell, J.; Sodupe, M.; Gonzalez-Duarte, P. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 1436-1451.

Acreditación, la fuerza de la confianza

Sólo los servicios de las organizaciones acreditadas por ENAC aportan a productos y servicios el nivel de confianza que todos exigimos.

La Entidad Nacional de Acreditación mediante un proceso de evaluación independiente, riguroso y reconocido en más de 50 países avala esa confianza.

Acreditación nacional

Reconocimiento internacional

ENAC acredita laboratorios de ensayo y de calibración, laboratorios clínicos, entidades de inspección y certificación, verificadores medioambientales, organismos de control...