

Tesi Doctoral

NMR IN DRUG DISCOVERY. FROM SCREENING TO STRUCTURE-BASED DESIGN OF  
ANTITUMORAL AGENTS

Ricard A. Rodríguez Mias



Departament de Química Orgànica

Facultat de Química

Universitat de Barcelona

Barcelona, Juliol 2006

## **6 RESUMEN**



## 6.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los tiempos en los que la resonancia magnética nuclear jugaba un papel meramente analítico en el proceso de descubrimiento de fármacos restan en el olvido. En la actualidad, el uso de técnicas de DNA recombinante y expresión de proteínas junto con la evolución de componentes en los espectrómetros han permitido el desarrollo de una amplia lista de experimentos para el estudio de macromoléculas de interés biológico cada vez mayores.

En la actualidad, la RMN disfruta de una madurez saludable y nos ofrece una gran variedad de usos tanto en la clásica caracterización estructural de proteínas, como en el campo de fenómenos transitorios o dinámicos. En efecto, gracias a esto, durante los últimos años han florecido multitud de esfuerzos en el campo de la genómica estructural utilizando tanto RMN como rayos X en la resolución masiva de estructuras de proteínas. En su faceta dinámica, más allá de la resolución de estructuras, la resonancia magnética esta participando activamente en el estudio funcional de enzimas y proteínas y de otros fenómenos como el plegamiento de proteínas.

Otro de los campos donde se ha extendido el uso de la RMN es en el estudio de procesos de reconocimiento molecular, como por ejemplo en complejos proteína-proteína o proteína-ligando de bajo peso molecular. En particular, se han descrito numerosos experimentos que permiten cosechar información tanto estructural como cinética y termodinámica sobre el equilibrio químico que rige la formación de un complejo. Esto es posible gracias a la variedad de parámetros mesurables que se ven afectados, aunque en general los experimentos empleados en la medida de dichos parámetros se clasifican según qué parte del complejo observemos: el receptor (proteína) o el ligando.

### 6.1.1.1 EXPERIMENTOS BASADOS EN LA OBSERVACIÓN DEL RECEPTOR

Dentro de esta categoría, quizás el experimento conceptualmente más sencillo y, seguramente, más extendido en su uso se conoce como perturbación de desplazamientos químicos (CSP). Brevemente, este método consiste en monitorizar, en general mediante experimentos de heterocorrelación bidimensionales, las resonancias de una proteína convenientemente enriquecida en  $^{15}\text{N}$  o  $^{13}\text{C}$  frente la presencia de potenciales ligandos. El desplazamiento químico es un parámetro que contiene abundante información estructural, aunque no siempre sea accesible, además es extremadamente sensible a cambios ambientales: pH, temperatura, desnaturalización y cómo no, fenómenos de reconocimiento molecular. En cuanto a estos últimos, sus efectos suelen presentarse como cambios en el desplazamiento químico de HN o CH, preferentemente alrededor de la zona de unión del ligando, por lo que si se dispone de la asignación de estas resonancias no sólo podremos detectar la formación del complejo y determinar su afinidad, sino que además será posible mapear sobre la estructura de la proteína el sitio de unión de dicho ligando.

A pesar de su indudable potencial el CSP tiene ciertas limitaciones. En primer lugar se requieren cantidades considerables de proteína marcada, lo cual incluso con los avances en la tecnología de DNA recombinante y expresión de proteínas no es siempre factible y en cualquier caso encarece enormemente el ensayo, sobretodo tratándose de cribados masivos. Por otro lado, la observación de macromoléculas de elevado tamaño (léase mayores de 40 kD) es harto complicada debido principalmente a fenómenos de relajación, pero también como consecuencia de la congestión espectral que dificulta enormemente su análisis. Y aunque estos inconvenientes se han paliado en cierto modo con el uso conjunto de

experimentos de tipo TROSY, metodologías de deutерación y marcaje selectivo de proteínas el rango de peso molecular abordable mediante estos experimentos sigue siendo limitado.

#### 6.1.1.2 EXPERIMENTOS BASADOS EN LA OBSERVACIÓN DEL LIGANDO

Los experimentos que detectan los efectos de la formación del complejo en el ligando son más numerosos y variados que sus antagonista que los que observan el receptor. A menudo se aprovechan de los cambios en la movilidad del ligando derivados de la interacción con la proteína receptora; en general, el ligando en estado complejado deja de comportarse como una molécula de peso molecular reducido y experimenta un incrementote tamaño aparente que se traduce en cambios considerables en varios parámetros: coeficientes de difusión, relajación longitudinal y transversal, así como en sus propiedades de transferencia de magnetización; todos ellos mesurables mediante experimentos de RMN.

Sin embargo, al contrario que homólogos que observan el receptor, estos experimentos no requieren de ningún marcaje especial en la proteína, y por lo general las concentraciones de ésta en cada muestra suelen situarse alrededor de 50  $\mu\text{M}$ , muy por debajo de las cantidades necesarias para medir HSQCs; lo que supone una enorme ventaja en cuanto a coste. Desafortunadamente, este tipo de experimentos sufren de una limitación importante en cuanto al rango de afinidades detectables, por lo que tan solo se pueden detectar aquellos ligandos en régimen de intercambio rápido, o lo que es lo mismo, compuestos con constantes de disociación entre  $\mu\text{M}$ -mM. Además, aunque son capaces de detectar estas interacciones por lo general estos experimentos no ofrecen información estructural sobre el sitio de unión del ligando, a menos que se lleve a cabo su versión de competición.

Con todo, gracias a su bajo coste este tipo de experimentos han encontrado un nicho en etapas tempranas del descubrimiento de fármacos, en particular en el cribado masivo de compuestos. Entre estos experimentos cabe destacar aquellos que miden los parámetros de relajación R1 y R2, enormemente sensibles a los cambios aparentes de tamaño sufridos por el ligando; también aquellos que como el STD o WaterLOGSY se aprovechan de fenómenos de transferencia de saturación para diagnosticar la presencia de ligandos en una mezcla de compuestos.

#### 6.1.2 OBJETIVOS

A la luz del interés que despierta el uso de la resonancia magnética nuclear en las diversas etapas del proceso de descubrimiento y caracterización de fármacos, y tomando como modelo diferentes sistemas relacionados con cáncer, los objetivos de la presente tesis doctoral son los siguientes:

- 1- Familiarización e implementación de metodologías de RMN para la caracterización de fenómenos de interacción intermolecular, basadas en receptor y en ligando, y posterior integración en programas de desarrollo de fármacos. Para ello emplearemos como sistemas modelo proteínas involucradas en apoptosis (XIAP y Bcl-XL);
- 2- Aplicación de las técnicas anteriores al diseño y desarrollo de moléculas antiangiogénicas, inhibitoras de la interacción entre VEGF y sus receptores. Para este fin, deberemos producir VEGF en cantidades suficientes y empleando los marcajes isotópicos apropiados; para posteriormente diseñar y obtener los potenciales ligandos que en última instancia serán sometidos a ensayos de RMN para detectar su unión a proteína.

- 3- Caracterización estructural por RMN de Kahalalido F, un depsipéptido de origen marino que en la actualidad se encuentra en fases clínicas de desarrollo contra varios tipos de cáncer. Se aplicarán varias metodologías de RMN empleadas en el estudio de péptidos flexibles de tamaño mediano y se exploraran varias condiciones para determinar sus preferencias conformacionales e intentar establecer así una relación entre su estructura y actividad biológica.

## 6.2 CAPÍTULO 1: RMN EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

El trabajo presentado en este primer capítulo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Pellecchia en el Instituto Burnham en San Diego (CA) durante una estancia en el año 2002. El laboratorio del Dr Pellecchia centra su interés en el desarrollo y uso de metodologías de RMN aplicadas al descubrimiento de fármacos, muy especialmente destinadas a la inhibición de la formación de complejos proteína-proteína.

En su vertiente más educativa, esta visita representa una oportunidad excelente como primera toma de contacto con los experimentos de RMN utilizados en la detección y estudio de interacciones ligando-proteína. Por otro lado, desde una perspectiva más aplicada, se utilizaron estas tecnologías para el desarrollo de moléculas con potencial antitumoral concretamente dirigidas a la inhibición de proteínas con actividad antiapoptótica.

El proceso conocido como apoptosis o bien muerte celular programada es crucial en organismos pluricelulares: en el desarrollo y homeostasis de sus tejidos. En concreto este proceso se controla mediante una delicada red de señales y estímulos pro y antiapoptóticos; en general mediados por multitud de proteínas que establecen un equilibrio dinámico entre sus efectos antagónicos. Normalmente, como respuesta a situaciones de estrés, daños celulares o bien otros estímulos, este equilibrio se descompensaría dando lugar a una mayor concentración de factores pro-apoptóticos y eventualmente conllevando al suicidio celular. Sin embargo fallos en la regulación del proceso apoptótico pueden provocar situaciones patológicas como el cáncer, en el caso de ser éste insuficiente, o enfermedades neurodegenerativas cuando sucede en demasía.

### 6.2.1 MARCAJE SELECTIVO DE TRIPTÓFANO EN EL DOMINIO BIR3 DE XIAP

La proteína XIAP ejerce un papel muy relevante en el control del proceso apoptótico, en particular ésta y otros miembros de su familia participan como agentes antiapoptóticos inhibiendo la actividad enzimática de una familia de cisteína proteasas conocidas como caspasas por su predilección por cortar enlaces peptídicos adyacentes a residuos aspartato. En particular, XIAP inhibe la actividad enzimática de la caspasa-9 interaccionando con el motivo tetrapeptídico N-terminal de ésta e impidiendo el acceso de sustratos al sitio activo de dicha enzima. La interacción entre XIAP y la enzima está mediada principalmente por el tercer dominio BIR de XIAP para el cual se ha descrito actividad inhibitoria en solitario. En cualquier caso, en ausencia de inhibidor, caspasa-9 se encargaría de procesar y activar otro miembro de la familia (caspasa-3) actuando como relé y amplificando la señal de muerte celular. BIR3 es por lo tanto una diana terapéutica interesante dado que la inhibición de su interacción con caspasa-9 conlleva la inducción del suicidio celular; más aún si tenemos en cuenta que las células tumorales frecuentemente sobre-expresan XIAP como mecanismo para atenuar las señales de suicidio celular.

Mas allá de su indudable interés terapéutico el dominio BIR3 de XIAP sirve también como banco de pruebas para el desarrollo de nuevas metodologías de marcaje selectivo, tremendamente útiles en programas de cribado masivo de compuestos. En este sentido y después del análisis estructural de la interacción entre caspasa-9 y XIAP, observamos que gran parte de la energía de interacción proviene de contactos con dos triptófanos en el dominio BIR3 de XIAP. Este no es un hecho aislado y en efecto varios trabajos sugieren que este aminoácido (el menos abundante en proteínas) aparece sobre-representado en los *hot spots* de las superficies proteicas involucradas en interacciones proteína-proteína y que junto a tirosina y arginina suele

acarrear gran parte de la energía en este tipo de complejos. Esta observación hace del Trp un aminoácido muy atractivo para la introducción de isótopos observables mediante RMN; convirtiéndolos en sondas excelentes para monitorizar fenómenos de reconocimiento molecular. Así pues nos planteamos desarrollar métodos para la introducción de isótopos sobre Trp para su posterior observación en experimentos de RMN, en concreto  $^{13}\text{C}$  y  $^{19}\text{F}$ .

#### 6.2.1.1 MARCAJE SELECTIVO: $^{13}\text{C}$ -TRP

En *E. coli* las dos últimas reacciones biosintéticas en la producción de triptófano las lleva a cabo un complejo enzimático conocido como triptófano sintetasa. Éste está constituido por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), ambas con una actividad enzimática propia. Así pues, mientras la subunidad  $\alpha$  se encarga de catalizar la transformación de IGP (3-indol-D-glicerol-3'-fosfato) en indol y G3P (D-gliceraldehído-3'-fosfato), la subunidad  $\beta$  se encarga de condensar indol y serina para producir triptófano con la ayuda del cofactor piridoxal-5'-fosfato. Como podemos ver las últimas etapas en la producción de Trp pasan por el indol como intermedio. Este hecho, junto con la accesibilidad comercial de derivados marcados de éste nos permiten el uso de indol como precursor de la cadena lateral de Trp en la introducción selectiva de isótopos.

En primer lugar, la viabilidad de esta estrategia se comprobó utilizando un esquema de marcaje reverso que consistía en la expresión y purificación de  $^{15}\text{N}$ -BIR3-XIAP en presencia de indol  $^{14}\text{N}$  en el medio de cultivo. Posteriormente se compararon los experimentos de  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC para el anterior lote de proteína con uno uniformemente marcado producido normalmente. En dicha comparación se apreció como la presencia de indol  $^{14}\text{N}$  induce la desaparición de 4 señales en el espectro de heterocorrelación, éstas pertenecen a las cadenas laterales de Trp y nos indican que efectivamente el indol  $^{14}\text{N}$  se ha incorporado en la biosíntesis de este residuo aromático.

Posteriormente se utilizó una estrategia similar para producir BIR3-XIAP con introducción selectiva de isótopos  $^{13}\text{C}$  en las cadenas laterales de Trp, en particular en las posiciones  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_4$  del anillo indólico. Para ambos esquemas el rendimiento de expresión fue excelente y la incorporación de los isótopos  $^{13}\text{C}$  se acreditó mediante la adquisición de experimentos de heterocorrelación  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  bidimensionales, también en sus versiones mono-dimensionales:  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$ -filtrado- $^{13}\text{C}$ -desacoplado.

Ambas estrategias de marcaje selectivo, a pesar de producir espectros extremadamente sencillos, permiten detectar y caracterizar la interacción del motivo tetrapeptídico AVPI sobre la superficie de BIR3, inclusive con ciertas ventajas sobre el marcaje uniforme con  $^{15}\text{N}$ . En general, ambos marcajes de  $^{13}\text{C}$  alivian notablemente los fenómenos de flexibilidad en XIAP-BIR3, tan nocivos para los experimentos de heterocorrelación  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ . Además, dada su sencillez y sensibilidad, dichos esquemas de marcaje selectivo se podrían utilizar el campo del cribado masivo de compuestos combinados con los experimentos de  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$ -filtrado- $^{13}\text{C}$ -desacoplado. Por último, el marcaje selectivo en Trp- $^{13}\text{C}_2$  es ciertamente interesante dada la capacidad de recopilar información referente a la exposición al disolvente de  $\text{NH}\epsilon$  además de su posible implicación en puentes de hidrógeno.

#### 6.2.1.2 MARCAJE SELECTIVO: $^{19}\text{F}$ -TRP

Otro de los métodos de marcaje desarrollados consiste en la introducción de análogos fluorados de triptófano en BIR3-XIAP en lugar de su homónimo natural. La introducción de  $^{19}\text{F}$  en macromoléculas



despierta un enorme interés gracias a varias propiedades ventajosas que ofrece este isótopo: fundamentalmente su enorme sensibilidad y abundancia natural junto con su amplio rango de ppm y sensibilidad para detectar cambios sutiles en su ambiente electrónico. Además, cabe destacar su virtual ausencia en muestras biológicas lo que en general se traduce en experimentos de RMN muy sencillos y sin ruido de fondo.

La introducción de 5-fluorotriptófano en BIR3 en lugar de su homólogo nativo se llevó a cabo combinando el uso de ácido indolacrílico con el suplemento de fluoroTrp en el medio. Para el ácido indolacrílico se ha descrito una actividad inhibidora de la biosíntesis de triptófano; y aunque no hay consenso entre los autores, se cree que este podría afectar a la actividad del complejo triptófano sintetasa mimetizando uno de sus intermedios de reacción e induciendo en las bacterias hambruna de triptófano y por ende el secuestro de su crecimiento. El efecto, sin embargo, es reversible y el suplemento del aminoácido recupera el crecimiento celular. Este bloqueo químico de la biosíntesis de Trp puede utilizarse para análogos no naturales de este aminoácido introducir en proteínas, como hemos demostrado incluyendo 5-fluorotriptófano en el dominio XIAP-BIR3.

A tenor de los experimentos de MALDI-TOF MS y RMN  $^{19}\text{F}$ , la sustitución de Trp en XIAP-BIR3 por su homólogo fluorado ha sido un éxito y los rendimientos de incorporación éste son comparables a la utilización de cepas de *E. coli* autótrofas y, sin duda, superiores a otras metodologías de inhibición química anteriormente publicadas. Además, al igual que los marcajes de  $^{13}\text{C}$ , el uso de fluoroTrp y  $^{19}\text{F}$  RMN nos permite monitorizar de forma barata y efectiva los eventos de interacción entre BIR3-XIAP y sus ligandos.

### 6.2.2 ESTRATEGIAS DE CRIBADO MEDIANTE RMN APLICADAS A BCL-XL

Bcl-XL es la segunda diana terapéutica tratada durante nuestra visita al laboratorio del Dr Pellecchia. Esta proteína antiapoptótica suele aparecer en grandes cantidades en muchos tumores donde ejerce su labor patológica acallando las señales de muerte celular. Esta labor no consiste en modular la actividad de caspasas como en el caso de XIAP, sino en controlar o inhibir la liberación de factores pro-apoptóticos desde la mitocondria. La mitocondria es uno de los puntos claves en el control del proceso de suicidio celular, en concreto es el responsable de la liberación de varias señales de muerte, lo cual constituye un evento central en el proceso de apoptosis. Entre las señales liberadas, sin duda la más importante es el citocromo c, que una vez liberado al endotelio se organiza junto con pro-caspasa-9 y Apaf-1 para dar lugar al apoptosoma un complejo enzimático que se encarga de amplificar la señal de muerte a través de su actividad proteolítica. La liberación de citocromo c a través de la membrana mitocondrial externa viene controlada por un fenómeno de oligomerización e inserción en esta membrana de dos proteínas, miembros de la familia Bcl-2 y a la que también pertenece Bcl-XL: Bak y Bax. En concreto se cree que Bcl-XL evita tal inserción en la membrana mitocondrial, formando un complejo con el oligómero Bak/Bax e interaccionando con un motivo helicoidal (BH3) común en esta familia de proteínas. Consecuentemente, la inhibición de esta interacción (Bcl-XL con el dominio helicoidal BH3) contrarrestaría el desajuste antiapoptótico inducido por la presencia excesiva de Bcl-XL, causando la muerte de estas células. Se trata por lo tanto de una potencial terapia antitumoral.

Se diseñó una librería de fragmentos utilizando los conceptos SHAPES introducidos por Hajduk y colaboradores. De entre los fármacos comerciales, se eligieron los esqueletos más recurrentes, y para cada uno de los esqueletos se seleccionaron algunas moléculas representativas. Posteriormente esta

librería de fragmentos se ensayó con nuestro receptor (Bcl-XL) utilizando experimentos basados en la observación del ligando, por ejemplo: STD y WaterLOGSY.

Mediante esta estrategia conseguimos identificar dos nuevos fragmentos capaces de interactuar con Bcl-XL, además pudimos ratificar la interacción de un tercer compuesto mencionado con anterioridad por Wagner y colaboradores. Posteriormente, mediante el uso de experimentos de STD de competición e iLOE pudimos confirmar que BH3-I (compuesto descrito por Wagner y colaboradores) y 2A4 (uno de los compuestos de la librería) no sólo se unen a la proteína en cuestión, sino que además lo hacen en sitios adyacentes y por lo tanto ambos ligandos serían susceptibles de ser unidos químicamente para producir un compuesto dual con mayor afinidad.

## 6.3 CAPÍTULO 2: DISEÑO DE ANTAGONISTAS DE VEGF

La formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) es un evento crucial tanto en la etapa de embriogénesis como durante el desarrollo del organismo; y aunque la angiogénesis fisiológica también ocurre en organismos adultos esto sucede a un nivel mucho menor, circunscrita principalmente a la reparación de tejidos y mantenimiento del sistema circulatorio. La angiogénesis también aparece implicada en varios procesos patológicos; como por ejemplo la degeneración macular relacionada con la edad, o en el desarrollo y metástasis de tumores primarios. En este último caso, las masas tumorales suelen reclutar vasos sanguíneos próximos con el fin de obtener oxígeno y nutrientes suficientes para su desarrollo, además de permitir la invasión de tejidos sanos a través del torrente sanguíneo.

En cualquier caso tanto la angiogénesis fisiológica como patológica está controlada por un gran número de factores de crecimiento entre los que cabe destacar el bFGF, que actúa a nivel de fibroblastos, o las metaloproteasas, con un efecto más amplio. Pero sin duda, uno de los más importantes es el factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF o VEGF-A; perteneciente a la familia PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) que incluye varios homólogos como VEGF-B, VEGF-C, etc. VEGF-A en su forma más común aparece como una glicoproteína homodimérica formada por monómeros de 165 aa; aunque también existen varias isoformas. Todas éstas conservan el mismo dominio N-terminal encargado de interactuar con los receptores de membrana de las células endoteliales: VEGFR-1 y VEGFR-2; en general la interacción de VEGF con su receptor induce la dimerización de este último, desencadenándose su función quinasa seguida por la fosforilación de varios sustratos y la activación de rutas de señalización que regulan procesos como: migración, proliferación y supervivencia celular.

Dada la relevancia que tiene la formación de nuevos vasos sanguíneos para el desarrollo de las patologías mencionadas anteriormente, varios autores han propuesto estrategias antiangiogénicas para atajarlas. En particular para el tratamiento del cáncer, han aparecido inhibidores de metaloproteasas o inclusive de la actividad quinasa para los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2. Otra de las dianas exploradas consiste en la inhibición de la interacción VEGF-VEGFR, para la cual se han desarrollado moléculas de tipo anticuerpo como Avastin, actualmente aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer colorectal. En este sentido, durante este segundo capítulo pretendimos utilizar metodologías de RMN, tanto de cribado como de diseño, para el desarrollo de moléculas capaces de inhibir la interacción de VEGF con su receptor, y por lo tanto con potencial actividad antitumoral.

### 6.3.1 QUIMIOTECAS

En nuestra búsqueda de inhibidores utilizamos dos aproximaciones diametralmente opuestas; para cada una de ellas tanto el tipo de moléculas ensayadas como los experimentos utilizados en el cribado fueron diferentes.

#### 6.3.1.1 DIPÉPTIDOS

La primera aproximación consistía en la adaptación de una estrategia de diseño de fármacos a partir de fragmentos. La peculiaridad de esta estrategia radicaba fundamentalmente en el tipo de compuestos que conformaban la quimioteca de fragmentos. Ésta estaba constituida por un conjunto de dipéptidos, que con el fin de mejorar su estabilidad frente a proteasas, se construyeron con D-aminoácidos. La selección de los

dipéptidos de la quimioteca se llevó a cabo utilizando dos criterios diferentes: en primer lugar se utilizó un ligando peptídico ya descrito para inspirar un primer grupo de dipéptidos; y posteriormente se seleccionó otro grupo de compuestos atendiendo a su diversidad química. Una vez sintetizados, estos dipéptidos se ensayarían utilizando experimentos de observación de ligando: STD y/o WaterLOGSY. Eventualmente, si encontramos ligandos, se procedería a la caracterización de su modo de interacción para luego construir ligandos más fuertes, preferentemente mediante la fusión de varios fragmentos.

#### 6.3.1.2 *EXTRACTOS DE PLANTAS USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL CHINA*

La segunda estrategia pretendía identificar moléculas procedentes de extractos de plantas con capacidad para inhibir la interacción entre VEGF y VEGFR. En concreto centramos nuestra búsqueda en un grupo de plantas utilizadas frecuentemente en el folclore chino para tratar multitud de dolencias. Dado que la medicina tradicional china es una de las fuentes de conocimiento botánico más extensas y mejor documentadas del mundo; pero además porque en nuestro laboratorio disponíamos de una pequeña librería de extractos.

Debido a la complejidad de estos extractos y por lo tanto a la dificultad en la deconvolución de eventuales positivos, además de la más que probable identificación de extractos con ligandos potentes, decidimos ensayar esta librería utilizando experimentos basados en la detección del receptor en particular mediante la estrategia de mapeo de desplazamientos químicos (CSP).

### 6.3.2 ENSAYO Y RESULTADOS

Una vez construidas las librerías de compuestos que pretendíamos ensayar, se procedió a la expresión y purificación de la proteína en cuestión. Posteriormente se ensayaron los compuestos usando los respectivos experimentos.

#### 6.3.2.1 *DIPÉPTIDOS*

Desafortunadamente el uso de WaterLOGSY o STD no nos reportó ningún resultado satisfactorio, y no pudimos detectar la interacción de ninguno de los dipéptidos ensayados con VEGF.

#### 6.3.2.2 *DISOLVENTES ORGÁNICOS*

A pesar de que no pudimos detectar ningún dipéptido que se uniera a VEGF, durante los experimentos de cribado se hizo una observación casual interesante: se detectó que el DMSO presentaba afinidad residual hacia el epítipo de VEGF responsable de la interacción con su receptor. Esta observación se estudió con mayor detalle, realizándose titulaciones de otros disolvente sobre VEGF usando experimentos de heterocorrelación HSQCs  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ .

Al parecer, todos ellos presentan cierta afinidad hacia la misma zona de la proteína, aunque tanto la magnitud como el tipo de cambios inducidos, es diferente para cada disolvente. El mapeo de los desplazamientos químicos inducidos por estos disolventes sugiere la presencia de varios sub-sitios de interacción en la superficie de VEGF, y sorprendentemente estos sub-sitios corresponden con algunos de los aminoácidos identificados como calientes (o energéticamente importantes) mediante estudios de mutagénesis. Además, la coincidencia entre la localización de tales sub-sitios con el epítipo de interacción con el receptor, sugeriría que la afinidad residual hacia disolventes orgánicos podría ser una propiedad

intrínseca de los *hot spots* de proteínas; de manera que estas metodologías de mapeo de la superficie proteica con disolventes pueden ser utilizadas para la definición de sitios de interacción de ligandos

### 6.3.2.3 EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA MEDICINA TRADICIONAL CHINA

Se ensayó la librería de extractos de plantas utilizando un esquema extremadamente sencillo y barato que combina el uso de proteína marcada selectivamente (*metilo*- $^{13}\text{C}$ -Met VEGF) junto con el experimento de  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$ -desacoplado- $^{13}\text{C}$ -filtrado. La comparación de los espectros en presencia y ausencia de compuestos nos permitió identificar dos extractos ( X19, X1 ) en los cuales se encuentran ligandos débiles de VEGF.

Purificación y análisis, mediante MS y RMN, de el producto mayoritario de *Radix Scutellariae* (X19) sugieren que el compuesto responsable de la interacción con VEGF es la baicalina, un derivado glucurónico de la familia de las flavonas. Experimentos posteriores nos permitieron estimar la  $K_D$  de la baicalina (alrededor de 5 mM), así como identificar otros miembros de la familia de los flavonoides capaces de interaccionar con VEGF. En particular se identificó la quercetina-3- $\beta$ -glucósido como el mejor de los ligandos de la familia, mejor inclusive que la baicalina ( $K_D=1.9$  mM). Y gracias a la información recopilada mediante experimentos de STD y al mapeo diferencial de desplazamientos químicos pudimos proponer un modelo de interacción para las flavonas. Según este modelo el esqueleto flavonoide se situaría alrededor del residuo 47 insertado en la interfaz de dimerización de VEGF; rodeado por la la 2ª hebra  $\beta$ , la  $\alpha$ -hélice N-terminal y el lazo que conecta las hebras 5 y 6 de la proteína. Mientras el carbonilo del esqueleto flavonoide estaría orientado hacia el interior y el grupo glucurónico de la baicalina se situaría expuesto al disolvente en dirección hacia la  $\alpha$ -hélice N-terminal.

## 6.4 CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE KAHALALIDO F

El océano cubre tres cuartas partes del globo y constituye cerca del 90% del total de la biosfera del planeta. Se trata de un entorno extremadamente competitivo en el cual multitud de formas de vida han florecido y adaptado a las más inhóspitas condiciones; dando lugar a una enorme diversidad de organismos de todos los reinos. Este entorno populoso conlleva inexorablemente el establecimiento de una red de relaciones entre sus habitantes, relaciones de competencia, simbiosis, depredación, parasitismo, etc. Frecuentemente, estas relaciones se establecen mediante mensajeros químicos; esto es incluso más cierto si cabe, para un amplio grupo de invertebrados como las esponjas, tunicados, etc., que se caracterizan por disponer de esqueletos y movilidad limitadas, y cuya supervivencia depende casi por completo de su arsenal químico. Como consecuencia, este tipo de organismos han despertado gran interés como fuentes de entidades químicas novedosas, atrayendo el escrutinio de multitud de esfuerzos farmacéuticos en busca de compuestos con potencial terapéutico diverso, entre los que destacan: anticancerígenos, antivirales, antibacterianos...

Las Kahalalidos son una familia diversa de péptidos aislados de el molusco *Elysia rufescens* y en menor cantidad de un alga presente en su dieta: *Bryopsis sp.* Varios de los miembros de la familia presentan un esqueleto cíclico (Kahalalido A-F,K,O) mientras que otros son acíclicos; aun así el miembro más relevante de la familia es Kahalalido F. Este último presenta propiedades citotóxicas peculiares por lo que es útil en el tratamiento de varios tumores sólidos, encontrándose en fases clínicas de desarrollo como fármaco para melanoma y cáncer de próstata entre otros. Además, también se le atribuyen propiedades antiinfectivas y antibacterianas.

Kahalalido F fue aislada por primera vez por Hamman y Scheuer, estableciendo su secuencia primaria como un polipéptido formado por 13 aminoácidos y un ácido metilhexanoico en su extremo N-terminal. Después de algunas discrepancias iniciales, respecto a la configuración de varios de sus centros quirales, el trabajo sintético realizado en nuestro laboratorio por López-Macià y colaboradores estableció inequívocamente su estructura química. Kahalalido F incluye varias modificaciones no proteínogénicas entre las que caben destacar la quiralidad invertida de D-Val2, D-Val5, D-Pro6, D-alloIle8, D-alloThr9, D-alloIle10 y D-Val11; además de la presencia de aminoácidos como ornitina o  $\alpha$ - $\beta$  didehidroaminobutírico. En ambos extremos contiene modificaciones no ortodoxas en péptidos como son el acilo N-terminal y el enlace depsipeptídico entre la cadena lateral de D-alloThr y el carbonilo C-terminal.

A pesar del detallado conocimiento químico del que disponemos para Kahalalido F, no existe consenso en cuanto a cómo este compuesto ejerce su labor antitumoral. Kahalalido F es citotóxica ante un amplio panel de células, produciendo oncosis e induciendo perturbaciones importantes en la arquitectura celular y localización de organelos. Pero más allá de estas observaciones, no se ha conseguido identificar su diana o dianas terapéuticas, aunque varios estudios descartan un tipo de muerte celular dependiente de caspasas u otras proteínas proapoptóticas. Algunos autores sugieren que Kahalalido F podría actuar de un modo más inespecífico; su actividad ocurriría a nivel de la membrana lipídica, de un modo parecido a como actúan algunos péptidos antimicrobianos, desestabilizándola e induciendo permeabilidad en ésta y en última instancia provocando la muerte celular.

El análisis estructural de Kahalalido F puede ayudarnos a esclarecer alguno de los interrogantes relativos a su modo de acción; eventualmente la información extraída podría utilizarse para diseñar compuestos más

potentes que el original. Por esta razón durante este capítulo utilizó RMN en la caracterización estructural de este agente tumoral de interés.

#### 6.4.1 ESTUDIOS PRELIMINARES EN H<sub>2</sub>O Y DMSO

En primer lugar decidimos explorar las preferencias conformacionales del péptido tanto en H<sub>2</sub>O como en DMSO; dos disolventes con una constante dieléctrica elevada, habituales en el estudio de péptidos y capaces de reproducir algunos de los entornos donde podría llevar a cabo su función. Para ello procedimos a asignar los protones de Kahalalido F utilizando la metodología clásica de Wüthrich y colaboradores. Posteriormente se determinaron satisfactoriamente algunos parámetros con información estructural relevante, como son  $^3J_{\alpha N}$ , coeficientes de temperatura y contactos nOe.

La información obtenida sugiere tendencias estructurales parecidas para Kahalalido F en ambos entornos. La ausencia relativa de nOes de media y larga distancia sugieren que se el compuesto esta desorganizado, especialmente en su sección N-terminal para la que en su mayor parte sólo se observan contactos de nOe secuenciales. El macro-ciclo C-terminal, por otro lado, parece ser más rígido observándose en esta sección evidencias de puentes de hidrógeno transanulares (bajos coeficientes de temperatura), junto con algunos valores atípicos para las constantes de acoplamiento  $^3J_{\alpha N}$ , y correlaciones nOe entre aminoácidos en lados opuestos del ciclo.

Durante el transcurso de nuestros análisis, especialmente en aquellos experimentos llevados a cabo en H<sub>2</sub>O, se observó que el péptido era altamente anfipático. Y tanto a nivel macroscópico como microscópico (mediante experimentos de microscopía de transmisión electrónica) se comprobó el carácter dual de esta molécula, una propiedad que podría favorecer la formación de agregados supramoleculares.

#### 6.4.2 ANÁLISIS CONFORMACIONAL EN MEDIOS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS LIPÍDICAS

Tras la observación del carácter anfipático del péptido, junto a la escasez de información estructural tanto en H<sub>2</sub>O como en DMSO, decidimos estudiar el comportamiento del péptido en entornos también anfipáticos. En particular optamos por realizar un estudio estructural en presencia de micelas de detergente en medio acuoso; unas condiciones biológicamente relevantes dada su semejanza con entornos de membranas lipídicas.

Como detergente, decidimos optar por el SDS-d<sub>25</sub>, asequible económicamente en su forma deuterada. Así se exploraron varias preparaciones acuosas modificando las proporciones de peptido y detergente. Los experimentos de RMN llevados a cabo para estas muestras sugieren que Kahalalido F sólo es soluble en presencia de SDS cuando el detergente se encuentra por encima de su concentración micelar crítica. Esta observación sugiere que el péptido interacciona con los agregados de detergente, un hecho que además justifica las importantes discrepancias observadas entre los espectros de Kahalalido F en agua y H<sub>2</sub>O/SDS.

A tenor de los resultados anteriores decidimos profundizar en este estudio, asignándose las señales del péptido en H<sub>2</sub>O/SDS; utilizando para ello la metodología ya mencionada. Además de la asignación, se obtuvo información estructural relevante gracias a varios experimentos NOESY; también se evaluó el grado de exposición al disolvente de las amidas del peptido determinándose tanto sus coeficientes de temperatura como su velocidad de intercambio con el disolvente y PF (coeficientes de protección). Esta información se utilizó con éxito para llevar a cabo el cálculo de la estructura del péptido en este medio.

Concretamente los contactos nOe extraídos de los experimentos NOESY se introdujeron en un protocolo de *templado simulado* (*simulated annealing*) dando lugar una familia de estructuras compatibles con nuestros datos experimentales.

Finalmente, se realizaron experimentos en presencia de compuestos paramagnéticos que nos ayudaron a establecer la situación relativa de los protones del péptido en el interior de la micela de detergente; permitiéndonos construir un modelo estructural completo de Kahalalido F en entornos anfipáticos. Este modelo sugiere que en estas condiciones el péptido se inserta en las micelas adoptando una estructura considerablemente rígida para una molécula de su tamaño. En este caso, la sección N-terminal de Kahalalido F adopta un giro alrededor de Pro6 que coloca la cadena lateral de Orn7 cerca de la interfaz agua/micela, orientado la carga de éste hacia las cabezas polares del detergente. Por otro lado el ácido hexanóico N-terminal permanecería preferentemente en el interior hidrofóbico de la partícula de detergente. En cuanto al macro ciclo C-terminal, en este entorno se establece el mismo patrón de puentes de hidrógeno dando lugar a dos horquillas y a una geometría de anillo inusualmente plana; un anillo que se situaría parcialmente embebido en la micela de detergente



## 6.5 CONCLUSIONES

A tenor de los experimentos presentados a lo largo de los capítulos anteriores podemos extraer las siguientes conclusiones de la presente tesis doctoral:

### 6.5.1 CAPÍTULO 1

- Se han desarrollado con éxito dos nuevos esquemas de marcaje para la observación selectiva de Trp; un residuo enormemente atractivo dada su elevada frecuencia en sitios biológicamente relevantes de superficies proteicas. En primer lugar, el amplio conocimiento sobre la biosíntesis de aminoácidos nos ha permitido utilizar versiones isotópicamente marcadas de indol para enriquecer en  $^{13}\text{C}$  las posiciones  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_4$  de la cadena lateral de Trp. Por otro lado, el uso conjunto de inhibidores biosintéticos de Trp (IAA) y análogos fluorados de este aminoácido nos permiten la incorporación y posterior observación de  $^{19}\text{F}$  en estas posiciones. Ambas estrategias se han llevado a la práctica con el tercer dominio BIR de la proteína inhibidora de apoptosis XIAP, permitiéndonos detectar su interacción con un ligando peptídico natural y ofreciéndonos indudables ventajas con respecto al marcaje uniforme con  $^{15}\text{N}$
- Se han utilizado experimentos de WaterLOGSY en el ensayo de una quimioteca de fragmentos en busca de ligandos para la proteína Bcl-XL. Como resultado se han identificado dos nuevos motivos estructurales que se unen débilmente a la proteína en cuestión; uno de los cuales lo hace de forma no competitiva con respecto a un ligando ya descrito anteriormente (BH3I-1). La orientación relativa entre estas dos moléculas en la superficie de Bcl-XL se ha determinado utilizando experimentos de iLOE, lo que nos ha permitido diseñar ligandos duales que incorporan ambos motivos.

### 6.5.2 CAPÍTULO 2

- Se ha conseguido sobre-exresar y purificar satisfactoriamente VEGF<sub>10-109</sub> enriquecida isotópicamente en varios formatos según las necesidades de varios experimentos:  $^{15}\text{N}$  VEGF, *metilo*- $^{13}\text{C}$ -Met VEGF y  $^{15}\text{N}$ - $^2\text{H}$ -VEGF. El marcaje uniforme con  $^{15}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ - $^2\text{H}$  se ha conseguido utilizando *E. coli* además de métodos estándar con la salvedad que en el segundo caso el medio de cultivo estaba compuesto por  $\text{D}_2\text{O}$  y glucosa perdeuterada en el obteniéndose un rendimiento total de deuteración del 98%. Para el marcaje selectivo en metioninas utilizamos una cepa auxótrofa de *E. coli* junto con el aminoácido marcado isotópicamente.
- En cuanto a los potenciales ligandos de VEGF, la filosofía del escrutinio de fragmentos subyace en el diseño de dos librerías de dipéptidos constituidos por D-aminoácidos. Para el diseño de estas quimiotecas se han aplicado criterios estructurales y de diversidad para reducir el número total de dipéptidos escrutados. Ambas librerías se han ensayado mediante experimentos de observación de ligando (STD y WaterLOGSY) sin éxito aparente; lo que sugiere que a pesar de su accesibilidad y modularidad estos oligopéptidos no sean fragmentos apropiados para este tipo de estrategias.

- Los experimentos de heterocorrelación  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC para VEGF en presencia de varios disolventes orgánicos sugieren que la proteína presenta cierta afinidad hacia estas moléculas. Y aunque en las titulaciones llevadas a cabo con ACN, DMSO, iPrOH, dioxano y DMF la interacción se produce para todos ellos en la superficie de interacción con el receptor de VEGF; tanto en la magnitud como en el tipo de perturbaciones cada disolvente tiene sus particularidades. El análisis de estas perturbaciones nos ha permitido identificar varios sub-sitios de interacción en la superficie proteica. A grandes trazos estos sub-sitios coinciden con análisis de mutagénesis anteriores y por lo tanto parecen apoyar el uso de este tipo de titulaciones como método general para diagnosticar sitios de interés en proteínas.
- El uso conjunto de marcaje selectivo de metioninas en VEGF y un experimento de  $^1\text{H}$  filtrado y desacoplado en  $^{13}\text{C}$  conforman un método de cribado eficiente y barato para esta proteína; gracias principalmente a la dispersión de las señales de metionina y a la enorme sensibilidad del experimento. Este esquema se ha utilizado con éxito para ensayar mezclas de compuestos muy complejas como son los extractos acuosos de varias plantas utilizadas frecuentemente en la medicina tradicional china, diagnosticándose la presencia de ligandos para VEGF en dos de estos extractos.
- El componente mayoritario del extracto acuoso de *Radix Scutellariae* se ha aislado e identificado satisfactoriamente como el responsable de la interacción con VEGF. El análisis espectroscópico de masas y RMN para este compuesto corresponden con los esperados para un compuesto flavonoide: la baicalina. Por otro lado, estos datos están en concordancia con los experimentos llevados a cabo con otros miembros de la familia de los flavonoides que nos han permitido identificar otro ligando de VEGF: quercetina-3- $\beta$ -glucósido. Las titulaciones para ambos compuestos (baicalina y quercetina-3- $\beta$ -glucósido), así como los experimentos de STD nos han permitido determinar su afinidad además de proveernos con un modelo para interacción entre VEGF y compuestos flavonoides. Este modelo sitúa a los compuestos entre la segunda hebra ( $2\beta$ ), la  $\alpha$ -hélice N-terminal y el giro situado entre  $3\beta$  y  $4\beta$ ; compitiendo así por el sitio de unión del péptido v107.
- El estudio de catequinas del te verde demuestran que estos flavonoides también reconocen la superficie de unión al receptor de VEGF; lo cual confirma las observaciones de varios autores que atribuyen su efecto antiangiogénico a su capacidad para interferir entre VEGF y su receptor. Según estos experimentos, y en particular para EGCG, las catequinas se unirían a VEGF de un modo semejante a quercetina-3- $\beta$ -glucósido.
- Se ha evaluado el uso de TROSY con saturación cruzada para el mapeo de superficies de contacto entre proteínas y ligandos débiles. Para ello, se ha implementado satisfactoriamente su secuencia de pulsos y aplicado al complejo v107-VEGF. Los resultados obtenidos para este complejo concuerdan con la estructura publicada para el complejo, sin embargo como consecuencia de la perdeuteración incompleta de la proteína el uso de este experimento en la caracterización de complejos proteína-ligando débiles parece limitado.

### 6.5.3 CAPÍTULO 3

- Se ha llevado a cabo la caracterización de las tendencias conformacionales de Kahalalido F en agua y en DMSO mediante experimentos de RMN. En ambos casos los resultados son parecidos; fundamentalmente se definen por tener una sección N-terminal desestructurada y carente de  $nOes$  a larga distancia; mientras que el macrocilo C-terminal estaría fuertemente restringido como consecuencia del enlace depsipeptídico y por la presencia de dos puentes de hidrógeno transanulares. Por otro lado, especialmente en medio acuoso, varias observaciones sugieren que este péptido tiene un fuerte carácter anfipático que podría inducir a su organización en superestructuras o agregados.
- También se han explorado las preferencias conformacionales de Kahalalido F en medios miméticos de membranas lipídicas, en concreto mediante el uso de detergentes. En presencia de concentraciones superiores a c.m.c de SDS el péptido se inserta en las micelas de detergente tal que su sección N-terminal adopta un giro alrededor de Pro<sup>6</sup> para disponer Orn<sup>7</sup> cerca de la superficie, orientándose la carga de ésta última hacia las cabezas polares del detergente y el solvente; por otro lado, el ácido hexanoíco N-terminal permanece preferentemente en el interior hidrofóbico de la partícula de detergente. En cuanto al macro ciclo C-terminal, se establece el mismo patrón de puentes de hidrógeno observado en H<sub>2</sub>O y DMSO, dando lugar a dos horquillas y a una geometría de anillo inusualmente plana; un anillo que se situaría parcialmente embebido en la micela de detergente.
- Los experimentos llevados a cabo nos permiten proponer un modelo estructural para la inserción monomérica de Kahalalido F en entornos de membrana lipídica; esto sugiere que parte de su actividad citotóxica ocurre a nivel de membrana para lo cual la formación de un giro  $\beta$  en la sección N-terminal del péptido también parece relevante. Sin embargo, seguramente se trata de un modelo incompleto al no tener en cuenta ni la toxicidad ni los efectos de los agregados supramoleculares de KF sobre la integridad de las membranas; un mecanismo de acción más que plausible dada la tendencia de este péptido a agregar en medios acuosos.

