

# Interacciones fármaco-diana. Bases para el diseño de nuevos fármacos

José L. López Pérez. Esther del Olmo Fernández. Arturo San Feliciano  
Departamento de Química Farmacéutica

## Correspondencia:

José L. López Pérez  
Departamento de Química Farmacéutica. Facultad de Farmacia  
Universidad de Salamanca. Campus Unamuno. E-37007 Salamanca. España

## Resumen

Las dianas de los fármacos comprenden una amplia variedad de componentes celulares que pueden estar presentes tanto en el hospedador como en el huésped en las enfermedades ocasionadas por un patógeno. Incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos o carbohidratos. La determinación estructural de estas dianas o de sus complejos con ligandos pueden llevarse a cabo por diversos procedimientos, fundamentalmente difracción de rayos-X y espectroscopia de RMN. La mejora de estas metodologías ha hecho que el número de complejos macromolécula-ligando resueltos y disponibles en la Base de Proteínas de Brookhaven aumente constantemente. Por esta razón, en la actualidad, el descubrimiento de nuevos fármacos se basa en la estructura de la diana en lugar de tomar como referencia la estructura de otros ligandos tal como se hacía en el pasado.

**Palabras clave:** Dianas de los fármacos. Sitio de unión. Interacción fármaco-diana. Diseño de fármacos.

## Abstract

The potential targets of drugs are as varied as the molecular components that make up the organism or pathogen. These include proteins, nucleic acids, lipids and carbohydrates. The structural information of these targets or complex target-ligand can be obtained by several procedures, mainly X-ray crystallography or nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). The improvement of the related technologies has made possible the constant increase of the number of macromolecule-ligand complexes available in the Protein Data Bank. As consequence, the discovery of the new drugs is today based in the structure of the target, instead of the structure of others ligands.

**Key words:** Target of drugs. Binding site. Drugs-target interaction. Drug design.

## Dianas de los fármacos

Los avances que han tenido lugar en los últimos años en el campo de la biología molecular han permitido identificar numerosas macromoléculas que desempeñan funciones vitales en el funcionamiento de la célula y cuya alteración está relacionada con ciertas enfermedades. Estas macromoléculas son las dianas potenciales de los fármacos. La formulación de una hipótesis de cómo modular su función relacionada con la enfermedad específica, puede dar pie al desarrollo de un nuevo fármaco; la confirmación de la hipótesis propuesta se conoce como validación de la diana.

Las dianas de los fármacos comprenden una amplia variedad de componentes celulares que pueden estar presentes tanto en el hospedador como en el huésped, en el caso de enfermedades ocasionadas por un patógeno. Incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos o carbohidratos. Puesto que las proteínas son los componentes macromoleculares más abundantes, no resulta sorprendente que éstas sean las dianas de los fármacos más frecuentes, como por ejemplo enzimas, receptores unidos a membrana, canales iónicos, proteínas transportadoras o estructurales.

El número de macromoléculas de las que se conoce su estructura 3D es escaso en comparación con aquéllas de las que sólo se conoce su secuencia. La secuenciación y caracterización del genoma humano hace presagiar el comienzo de una nueva era en la investigación biomédica, con implicaciones en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de las enfermedades. Se estima que el genoma humano comprende aproximadamente entre 30.000 y 35.000 genes, de los que más del 50% pueden estar correlacionados con una función biológica determinada. Estos genes contienen información para la síntesis de más de 100.000 proteínas<sup>1</sup>. Sin duda alguna, el desarrollo del conocimiento en estas áreas va a potenciar de forma considerable el diseño de fármacos basado en la estructura de las dianas.

En las enfermedades parasitarias, las dianas localizadas en los parásitos pueden tener su equivalente en el hospedador, de manera que la búsqueda de nuevos quimioterápicos deberá basarse principalmente en las diferencias estructurales entre ambas dianas. Así, los inhibidores de la dihidrofolatoreductasa, pirimetamina y proguanil, dos importantes fármacos antimaláricos, deben su utilidad a la relativa selectividad por la enzima del parásito. El estudio de estas dianas compartidas suele presentar algunas ventajas. A menudo la diana del hospedador es ya conocida, puesto que, con anterioridad, ha sido estudiada como diana terapéutica de otras enfermedades. Además, frecuentemente se dispone de diversos ligandos con afinidad. Este conocimiento previo incrementará las posibilidades de éxito en el desarrollo de fármacos para la nueva enfermedad. Otras dianas de los parásitos presentes también en humanos son, por ejemplo, las caspasas o la farnesil transferasa, enzimas para las que previamente se han diseñado sustancias útiles en el tratamiento de la osteoporosis o de cáncer respectivamente.

Otra alternativa consiste en seleccionar como dianas enzimas o rutas biosintéticas presentes exclusivamente en el parásito. El inconveniente de esta vía radica en que el desarrollo de un nuevo fármaco ha de comenzar desde cero. No obstante, esta desventaja queda compensada por su potencial selectividad en su acción sobre el parásito. A veces, se dispone de inhibidores para estas dianas, dado que se encuentran en otros organis-

mos patógenos. El chequeo previo de estos inhibidores es obligado, puesto que éstos ofrecen una mayor probabilidad de obtener posibles candidatos de forma más rápida. Así, por ejemplo, antibióticos como tetraciclinas y clindamicina, inhibidores de la síntesis proteica en bacterias, han mostrado actividad antimalárica debida a la inhibición de la unidad ribosómica 30S<sup>2</sup>.

Otra vía alternativa consiste en buscar dianas específicas y exclusivas de un determinado patógeno; con ello, se limitaría la transferencia de factores de resistencia. Este es el caso de la ADN-girasa, una topoisomerasa-II que desempeña funciones muy importantes relacionadas con la función biológica del ADN y sobre la que actúan distintas quinolonas. Recientemente se han clonado las girasa-A y -B de *M. tuberculosis*, cuyas secuencias presentan importantes diferencias con respecto a la girasa de *E. coli*. Esto permitiría el diseño de quinolonas específicas para una sola especie<sup>3</sup>.

## Métodos de obtención de información estructural

La difracción de rayos-X es el método más frecuentemente utilizado para obtener información estructural de macromoléculas. Presenta la ventaja de no ser limitante en cuanto al tamaño o la complejidad<sup>4</sup>, aunque sólo proporciona información estática de la macromolécula empaquetada dentro de un cristal. Un aspecto importante a tener en cuenta es la resolución, que se define como la habilidad para resolver 2 puntos separados a cierta distancia. En pequeñas moléculas, se alcanzan resoluciones de 1Å, mientras que en macromoléculas se suelen alcanzar resoluciones de 2-3Å, lo que no permite una resolución atómica verdadera. Para el diseño de fármacos se aconseja partir de estructuras con resoluciones de 2,5Å o inferiores. Este es el nivel mínimo requerido para describir las moléculas del agua estructural que desempeñan un papel importante en la estructura de las dianas y en sus interacciones con los ligandos; por encima de los 3Å la resolución es baja y no permite localizar las moléculas de agua.

Las técnicas utilizadas en la cristalización y resolución estructural de las macromoléculas han evolucionado sustancialmente, lo que ha conducido a la resolución de estructuras cada vez más complejas. Si en los años setenta se podían resolver únicamente proteínas sencillas como mioglobina, hemoglobina o lisocima, en los ochenta, el avance de las metodologías ha permitido resolver estructuras como anticuerpos e incluso virus enteros. En la década de los noventa se han resuelto, entre otras, las estructuras de la actina, del nucleosoma, de las subunidades ribosomales y, recientemente, de la bomba de calcio.

Las estructuras obtenidas mediante espectroscopia de RMN son también una fuente válida de información estructural<sup>5</sup> y, al estudiar a la diana en disolución, es posible interpretar sus propiedades dinámicas<sup>6</sup>. Este método tiene limitaciones en cuanto al tamaño, puesto que no es válido para proteínas superiores a 30kDa. A diferencia de los métodos de difracción de rayos-X, la espectroscopia de RMN proporciona conjuntos de conformeros que satisfacen las restricciones de distancias derivadas de los datos experimentales. La precisión de estas estructuras dependerá tanto de la cantidad como de la calidad de los nOes observados. Las partes de la estructura que presentan una mayor flexibilidad proporcionan un número menor de nOes lo que implica menos restricciones espaciales. Por esta razón, un número mayor de conformaciones pueden ajustarse a esas restricciones. Dada la dificultad de obtener medidas precisas en las intensidades de los nOes no es posible utilizar factores de fiabilidad análogos a los manejados en cristalografía.

Mientras que el número disponible de estructuras 3D de proteínas solubles es considerable y se incrementa de forma continua, la información

estructural de otras dianas como los receptores acoplados a la proteína G o a los canales iónicos, embebidas en las biomembranas --y, por tanto, difíciles de cristalizar-- es muy escasa. Una alternativa para resolver este tipo de estructuras es la difracción electrónica. Este método ha sido aplicado a proteínas incapaces de cristalizar y que sólo son capaces de formar pseudocristales. Este es el caso de la entrada 1BRD en PDB, que corresponde a bacteriorhodopsina y que ha servido de modelo para el modelado de distintos receptores de membrana.

La experiencia acumulada en el plegamiento de las proteínas junto con los avances en otras áreas científicas han mejorado los métodos predictivos basados en el modelado de homología de proteínas. Cuando no se dispone de un modelo 3D de una proteína, pero se conoce su secuencia primaria, se puede tomar como molde la estructura tridimensional de otra proteína homóloga y generar un modelo 3D de la diana en estudio<sup>7</sup>. Este procedimiento es más fiable si la identidad de la secuencia de la diana es superior al 40% con respecto al patrón y si, además, se puede obtener un buen alineamiento de secuencias<sup>8</sup>. No obstante, porcentajes bastante menores de homología han conducido a buenos resultados. Aproximadamente el 28% de las entradas de secuencias en las bases de datos comparten, al menos, un 25% de homología de secuencia con alguna de las proteínas presentes en la base de datos de proteínas de Brookhaven<sup>9</sup>. Por consiguiente, un tercio de las secuencias procedentes de las bases de datos se pueden someter a modelado de homología.

## Fuentes de información

El banco de datos de proteínas de Brookhaven (PDB), la fuente más importante de información tridimensional de macromoléculas, es de acceso libre en Internet<sup>10</sup>. PDB fue fundada en 1971 por el Brookhaven National Laboratory como un archivo de estructuras cristalinas de macromoléculas. Actualmente es mantenida por el RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics), un consorcio no lucrativo de investigadores y expertos procedentes de tres instituciones, Rutgers University; National Institute of Standards and Technology (NIST); y San Diego Supercomputer Center (SDSC) de University of California, San Diego (UCSD).

Esta entidad acepta depositar información concerniente a la estructura tridimensional de macromoléculas en forma de coordenadas cartesianas. Además de información acerca de proteínas, contiene también datos sobre ADN, ARN, virus y carbohidratos. Las macromoléculas pueden encontrarse aisladas o bien en forma de complejos: proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y macromolécula-ligandos. Hasta el año 2002 este banco de datos incluía modelos teóricos. En la actualidad los modelos depositados provienen fundamentalmente de difracción de rayos-X y en menor medida de espectroscopia de RMN. PDB contiene también algún modelo obtenido mediante difracción electrónica. La información estructural de las macromoléculas depositada en este banco de datos es esencial para el diseño de fármacos, la biotecnología, la bioquímica o la biología molecular. Todas las revistas prestigiosas de investigación exigen depositar las coordenadas de la macromolécula en formato PDB como un prerequisite para la aceptación de la publicación.

Los contenidos de esta base de datos son de calidades muy dispares; a veces la información puede ser redundante (aparecen muchas estructuras mutantes, como por ejemplo las de lisozima), o incompleta (faltan residuos o información acerca de las cadenas laterales o con diferentes factores de resolución). Por esto, se debería desarrollar programas informáticos apropiados para sistematizar toda la información depositada en esta base de datos que en la actualidad comprende cerca de 30.000

entradas y presenta un progresivo crecimiento (en la actualidad se añaden entre 50-100 nuevas estructuras cada semana). A cada una de las entradas se les asigna un código de identificación formado por 4 caracteres denominado "PDB ID".

Cada una de las macromoléculas es definida mediante un archivo de texto que puede ser modificado por cualquier editor de texto y que se identifica mediante su código. Estos archivos definen la posición de cada uno de los átomos de las moléculas y contienen, además, otras informaciones como pueden ser la secuencia primaria, la estructura secundaria, los datos acerca de la cristalización, las citas bibliográficas, así como los factores de la calidad de la estructura. El formato de estos archivos es interpretado por todos los paquetes de software de modelado molecular.

## Bancos de datos de secuencias

Muchas veces no se dispone de información tridimensional de una macromolécula, pero se conoce su secuencia primaria. A ésta se puede acceder libremente a través de la web de distintas entidades no lucrativas como son NCBI<sup>11</sup> (The National Center for Biotechnology Information) en USA, EBI<sup>12</sup> (The European Bioinformatics Institute) en Cambridge o ExPASy<sup>13</sup> (Expert Protein Analysis System) en Suiza. Estas organizaciones mantienen bases de datos con información masiva que actualizan constantemente; disponen de un conjunto de herramientas muy potentes que facilitan enormemente la tarea investigadora en el campo de la genómica y proteómica.

## Interacción ligando-diana

La interpretación de las interacciones entre ligandos y dianas resulta fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos. Con muy pocas excepciones, la mayoría de los fármacos actúan uniéndose a determinadas macromoléculas, de forma específica, en el sitio de unión. En la actualidad el número de fármacos diseñados a partir de la estructura de la diana es escaso debido a un nivel todavía insuficiente de conocimiento de las interacciones proteína-ligando.

A diferencia de las asociaciones entre proteínas que interaccionan a través de superficies planas, las moléculas de pequeño tamaño, como es el caso de los fármacos, tienden a incrustarse completamente dentro de la macromolécula y sus interacciones suelen ser más específicas: se establece una mayor proporción de enlaces de hidrógeno y las superficies de contacto son más complementarias.

Un problema añadido al estudio de estas interacciones es el grado de flexibilidad de las proteínas. Se han descrito algunos ejemplos de una misma proteína aislada y complejada que proporciona información muy valiosa acerca de su comportamiento conformacional cuando se une al ligando. En algunos casos, este cambio es casi insignificante, pero en otros, se aprecia una alteración importante. Por esta razón, para el diseño *de novo* se recomienda tomar como punto de partida una proteína complejada con un ligando. A veces es posible apreciar cambios en el tamaño y la forma del sitio de unión de una misma proteína cuando se ha cristalizado con distintos ligandos. Uno de los retos más importantes en el estudio de interacción ligando-proteína consiste en el conocimiento de los efectos de los ajustes inducidos durante la interacción de un ligando con una proteína.

Las interacciones que se establecen entre ligandos y proteínas comparten muchas características en común con las fuerzas responsables del plega-

miento de estas últimas, cuya estructura tridimensional es, en gran medida, consecuencia del efecto hidrofóbico<sup>14</sup>. De este modo, al plegarse, envuelven hacia dentro los restos hidrofóbicos, y exponen hacia el exterior los restos hidrofílicos que establecen contactos con el agua. No obstante, si algún grupo hidrofílico permanece en el interior, invariablemente estará apareado con otro residuo hidrofílico complementario mediante la formación de enlaces de hidrógeno, que compensan la desolvatación de ambas agrupaciones polares.

Las hendiduras que constituyen los sitios de unión representan imperfecciones durante el plegamiento de la proteína, pues contienen grupos funcionales no apareados desde el punto de vista energético. La interacción de ligandos en estos sitios está favorecida energéticamente dado que se establecen contactos electrostáticamente favorables con grupos hidrofílicos no apareados y parcialmente desolvatados de la proteína. Estas agrupaciones se encuentran en el interior de una hendidura donde el acceso al agua puede estar parcialmente impedido. Por ello, la unión de un ligando en el sitio puede considerarse como el último paso en el plegamiento de las proteínas. Consistente con este punto de vista, la unión de ligandos a las proteínas incrementa la resistencia térmica a su desnaturalización<sup>15</sup>. Como conclusión de estos hechos, se puede decir que las proteínas, al crear sitios de unión, sacrifican su estabilidad; pero ésta se ve compensada o incrementada cuando se une un ligando apropiado.

Al igual que en el caso del plegamiento de las proteínas, las principales fuerzas implicadas en la unión con los ligandos son las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que incluyen los enlaces de hidrógeno. Las primeras, que no son direccionales, contribuyen fundamentalmente a la afinidad, mientras que los enlaces de hidrógeno, de naturaleza altamente direccional, contribuyen principalmente a la especificidad<sup>16</sup>.

## El agua y las proteínas

El agua desempeña un papel importante en la estructura de las proteínas y en su unión con los ligandos, puesto que determina las preferencias conformacionales de ambos y modula las fuerzas de interacción. Las moléculas de agua situadas en la superficie de la diana y del ligando, son desplazadas durante la formación del complejo, lo que supone una contribución entrópica favorable. Debido a interacciones desfavorables, esta contribución es mayor si las moléculas de agua se encuentran situadas en las superficies apolares.

El estudio de los efectos de solvatación resulta fundamental para la comprensión de la interacción de los fármacos con sus dianas y para la predicción cuantitativa de las afinidades de unión. Tanto la difracción de rayos-X como la espectroscopia de RMN permiten investigar el efecto del agua en las macromoléculas. Los cristales de las macromoléculas contienen entre un 30-70% de agua y muchas de estas moléculas se pueden localizar mediante la difracción de rayos-X de alta resolución. Las moléculas de agua se pueden encontrar en las cavidades de la proteína<sup>17</sup>, en la interfase entre ligando y proteína<sup>18</sup>, y en la superficie de la proteína con la que se unen a través de enlaces de hidrógeno. Las que se unen a los grupos C=O o NH de la cadena principal detentan posiciones más definidas que las que se unen a las cadenas laterales<sup>19</sup>. Todas estas moléculas forman enlaces de hidrógeno entre diversos átomos pertenecientes a residuos alejados en la secuencia. Poseen una movilidad varios órdenes de magnitud menor que las moléculas de agua más externas y presentan factores de temperatura tan bajos como los de los átomos de la cadena central de la proteína. Esto indica que han quedado atrapadas cinéticamente en la interfase. Generalmente establecen el mayor número posible de enlaces de hidrógeno con el entorno llegando a formar enlaces débiles con el hidrógeno de las carbonos

alfa<sup>20</sup>. Aunque a veces, el papel que desempeñan ciertas moléculas de agua, es difícil de determinar, generalmente su presencia resulta determinante para la unión o la función. Tal es el caso de aquellas presentes en el sitio catalítico de las enzimas. Al facilitar la acomodación de las partes hidrofílicas en interfases hidrofóbicas, las moléculas de agua incrementan la promiscuidad de los sitios de unión.

Una de las técnicas utilizada en el diseño de los fármacos consiste en la incorporación de un átomo de oxígeno de una molécula de agua situada en el sitio activo en el ligando. Su localización se deriva de los datos cristalográficos de la diana solvatada. De esta manera, el incremento de la entropía del sistema aumenta la energía de unión. Así, ciertos inhibidores del VIH<sup>21</sup> surgieron mediante la incorporación del átomo de oxígeno de una molécula de agua coordinada con los residuos del sitio de unión de la proteasa. Su consideración es fundamental en los cálculos de interacción.

## Diseño basado en al estructura

En la actualidad se puede utilizar un gran número de estructuras 3D de macromoléculas como moldes para el diseño de nuevos fármacos. De hecho, algunos fármacos ya comercializados han sido diseñados a partir de la estructura de la diana<sup>22,23</sup>. El diseño de fármacos basado en la estructura consiste en el uso de la información estructural de macromoléculas obtenida mediante difracción de rayos-X o espectroscopia de RMN principalmente. Comienza con la observación gráfica del complejo y la determinación del tipo de interacciones que se producen entre el ligando y la diana. Este proceso debe continuar con la exploración de nuevos ligandos diseñados con la finalidad de optimizar sus interacciones con la diana.

El alto coste económico, tanto de los experimentos de unión diana-ligando como de los chequeos farmacológicos, ha conducido a la utilización de aproximaciones virtuales. La disponibilidad de estructuras 3D de dianas junto a quimiotecas de compuestos permiten llevar a cabo ensayos virtuales alternativos a los ensayos *in vivo* e *in vitro*. A este tipo de ensayos se les conoce como ensayos *in silico*.

## La elección de la diana

La elección de la diana debe de hacerse en función de consideraciones biológicas. Para llevar a cabo diseño de fármacos basado en la estructura, la diana ideal estará involucrada en una enfermedad y deberá unirse a pequeños ligandos para cumplir su función biológica. Deberá poseer un sitio de unión perfectamente definido. Si la enfermedad está causada por una disfunción de una proteína (receptores acoplados a proteína G, canales iónicos, enzimas, etc) la finalidad del diseño consistirá en el desarrollo de sustancias que modulen la función de esa proteína. Si la enfermedad está causada por un organismo patógeno, entonces el fármaco diseñado deberá provocar la inhibición total. La diana deberá ser esencial en algún punto del ciclo de vida del patógeno, de manera que su inhibición cause su muerte. Además, deberá ser única, lo que supone la inexistencia de otra ruta metabólica capaz de superar la presencia del inhibidor. Por último, la diana podrá ser inhibida mediante la unión de pequeñas moléculas. Una vez que la diana haya sido definida y seleccionada es necesario identificar el sitio de unión.

## El sitio de unión

En el diseño de fármacos basado en la estructura la localización del sitio de unión de la diana constituye un factor primordial. Esta información

topológica puede derivarse de estudios experimentales o de métodos teóricos. Una vez establecida la localización del sitio de unión, se puede recurrir a distintas técnicas computacionales, como el *docking* flexible, el diseño *de novo* o el cribado virtual de alta eficacia con el fin de optimizar posibles candidatos a fármacos. Estas aproximaciones racionales se basan en el concepto de llave-cerradura formulado por Emil Fischer hace más de un siglo. Idealmente el sitio de unión debe ser un bolsillo o hueco más o menos profundo con una serie de grupos funcionales en las cadenas de los residuos capaces de establecer enlaces de hidrógeno, bien como dadores o aceptores, con ciertas propiedades hidrofóbicas y de un volumen apropiado para acoger a los ligandos.

Las proteínas son biomoléculas que experimentan cambios conformacionales más o menos profundos cuando se complejan. Dada su flexibilidad, la aproximación al diseño de fármacos más fiable ha de tomar en consideración la estructura 3D de un complejo diana-ligando obtenido mediante cristalización o por espectroscopia de RMN. Si no se dispone del complejo, el sitio de unión se puede determinar mediante homología a partir otras proteínas similares o bien a través de datos bioquímicos disponibles. Sin embargo, a veces es preciso recurrir a las herramientas de modelado molecular. Criterios como el tamaño del hueco apropiado para acoger a un ligando o la flexibilidad e hidrofobicidad de estos huecos, son de gran importancia para determinar el sitio activo, puesto que éste suele ser más hidrofóbico y flexible que otros huecos presentes en la diana. Otra alternativa, en ausencia de la estructura de un complejo, consiste en llevar a cabo un análisis comparativo de unión de ligandos mediante estudios de mutagénesis dirigida. Este tipo de estudios puede dar una idea de la importancia de determinados residuos en el sitio activo.

Una vez definida la diana y determinado el sitio activo, las técnicas computacionales a aplicar pueden ser diversas. Una posibilidad consiste en el cálculo de la interacción de moléculas conocidas que se unen en el sitio y de su posterior modificación estructural para maximizar su afinidad<sup>24</sup>. Otra posibilidad es el *screening virtual* que consiste en evaluar, mediante técnicas computacionales, compuestos procedentes de quimiotecas frente a la diana considerada<sup>25</sup>. El ordenador proporciona un índice de complementariedad en función de las interacciones favorables en el sitio. Finalmente, el diseño *de novo* consiste en la inserción progresiva de pequeños fragmentos complementarios en el sitio de unión hasta llenar el hueco. La posterior unión de estos fragmentos genera una molécula que se ajusta al sitio de la diana<sup>26</sup>. Tanto la espectroscopia de RMN como los métodos de difracción de rayos-X se pueden utilizar también para los estudios de interacción de pequeños fragmentos con la diana<sup>27,28</sup>. Esta metodología permite identificar fragmentos moleculares que pueden ser utilizados para el diseño de un inhibidor. El estudio de interacción de pequeños fragmentos puede dar información más específica y fiable que la proporcionada por ligandos enteros. Por ejemplo, un estudio de la interacción de distintos anillos aromáticos heterocíclicos en el sitio de unión evidencia el papel desempeñado por los heteroátomos. En ligandos de mayor tamaño, estos efectos pueden quedar enmascarados por otras interacciones.

De los compuestos ensayados *in silico*, aquellos que mejor ajusten se sintetizarán posteriormente en el laboratorio. Con el fin de reducir el número de compuestos a preparar, se aplica la regla de los 5 de Lipinski que permite filtrar los compuestos con máxima probabilidad de resultar absorbibles por vía oral. Adicionalmente, se podrán considerar otros factores como la estabilidad química y metabólica y la asequibilidad sintética de los compuestos seleccionados. Finalmente, estos compuestos deberán ser evaluados biológicamente. Si los resultados biológicos se corresponden con las perspectivas teóricas, se llevarán a cabo estudios experimentales de determinación estructural del complejos. Estos procesos se pueden repetir de forma cíclica.

La vieja idea de sintetizar una gran cantidad de compuestos mediante la química combinatoria para su posterior ensayo biológico ha resultado una estrategia ineficiente debido a que, incluso por esta vía, la variabilidad estructural conseguida resulta infinitesimal en comparación con las posibilidades estructurales. La química combinatoria actual, en lugar de generar moléculas al azar, tiene en cuenta la estructura del sitio de unión de la diana como guía para generar compuestos. De esta manera, los compuestos sintetizados tienen más posibilidades de resultar atractivos y dan lugar a las denominadas quimiotecas focalizadas. Estas colecciones de compuestos pueden ser consideradas como un abstract del diseño de fármacos basado en la estructura. Así, dos metodologías consideradas *a priori* antagónicas, utilizadas de forma conjunta, han demostrado su eficacia para el diseño de fármacos.

Debido a su alto grado de selectividad, las quimiotecas focalizadas resultan mucho más útiles que las grandes colecciones de compuestos. Por ejemplo, una quimioteca focalizada frente a trisina, generada mediante química combinatoria, contiene fragmentos derivados de benzamidina, 4-aminopiridina y ciclohexilamina, junto a otros fragmentos como 2-aminoimidazol y 4-aminoimidazol<sup>29</sup>.

En consecuencia, los métodos virtuales utilizados en el diseño de fármacos representan una alternativa al cribado de alta eficacia utilizado por los farmacólogos. Permiten evaluar cantidades inmensas de compuestos de una forma más económica y proporcionan líderes con propiedades físico-químicas mejoradas. Por otra parte, las limitaciones del cálculo computacional se han resuelto mediante la puesta en marcha de proyectos de redes globalizadas. Estos proyectos intentan aprovechar la capacidad no utilizada de cálculo de los ordenadores personales conectados a la red. Un ejemplo de este tipo de proyectos es la iniciativa "World Community Grid" patrocinada por IBM y otras ONGs<sup>30</sup>.

## bibliografía

- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- Ralph SA, D'Ombain MC, McFadden GI. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist Updat* 2001;4:145-51.
- Tripathi RP, Tewari N, Dwivedi N, Tiwari VK. Fighting tuberculosis: An old disease with new challenges. *Med Res Rev* 2005; 25: 93-131.
- Blundell TL, Jhoti H, Abell C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:45-54.
- Homans SW. NMR spectroscopy tools for structure-aided drug design. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004;43:290-300.
- Pellecchia M, Sem DS, Wuthrich K. NMR in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:211-9.
- Johnson M.S., Srinivasan N., Sowdhamini R., Blundell T.L. Knowledge-based protein modeling. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994;29:1-68.
- Leach AR, Kuntz ID. Conformational analysis of flexible ligands in macromolecular receptor sites. *J Comput Chem* 1992;13:730-48.
- Chothia C. Proteins. One thousand families for the molecular biologist. *Nature* 1992; 357: 543-4.
- <http://www.rcsb.org/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.ebi.ac.uk/>
- <http://us.expasy.org/>
- Dill K.A. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 1990;29:7133-55.
- Morton A, Baase WA, Matthews BW. Energetic origins of specificity of ligand binding in an interior nonpolar cavity of T4 lysozyme. *Biochemistry* 1995;34:8564-75.
- Kollman P. Free energy calculations: Application to chemical and biochemical phenomena. *Chem Rev* 1993;93:2395-417.
- Williams MA, Goodfellow JM, Thornton JM. Buried waters and internal cavities in monomeric proteins. *Protein Sci* 1994;3:1224-35.
- Ladbury JE. Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem Biol* 1996; 3: 973-80.
- Thanki N, Thornton JM, Goodfellow JM. Influence of secondary structure on the hydration of serine, threonine and tyrosine residues in proteins. *Protein Eng* 1990;3: 495-508.
- Steiner T. Water molecules which apparently accept no hydrogen bonds are systematically involved in C-H...O interactions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1995;51: 93-7.
- Lam P, Jadhav P, Eyerman C, et al. Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science* 1994;263:380-4.
- Kaldor SW, Kalish VJ, Davies JF, 2nd, et al. Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease. *J Med Chem* 1997;40:3979-85.
- Lew W, Chen X, Kim CU. Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Curr Med Chem* 2000;7:663-72.
- Schapira M, Raaka BM, Samuels HH, Abagyan R. In silico discovery of novel retinoic acid receptor agonist structures. *BMC Struct Biol* 2001;1:1.
- Abagyan R, Totrov M. High-throughput docking for lead generation. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5:375-82.
- Cohen NC, Tschinke V. Generation of new-lead structures in computer-aided drug design. *Prog Drug Res* 1995;45:205-43.
- Stout TJ, Sage CR, Stroud RM. The additivity of substrate fragments in enzyme-ligand binding. *Structure* 1998;6:839-48.
- Nienaber VL, Richardson PL, Klighofer V, et al. Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1105-8.
- Blundell TL, Patel S. High-throughput X-ray crystallography for drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:490-6.
- <http://www.worldcommunitygrid.org/>